UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

DESNUTRIÇÃO E FUNÇÃO DO MACRÓFAGO

CONSEQÜÊNCIAS IN VITRO DE RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE SOBRE A ADESIVIDADE CELULAR E A ATIVIDADE FAGOCÍTICA

EDUARDO JOSÉ NEPOMUCENO MONTENEGRO

RECIFE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

DESNUTRIÇÃO E FUNÇÃO DO MACRÓFAGO

CONSEQÜÊNCIAS IN VITRO DE RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE SOBRE A ADESIVIDADE CELULAR E A ATIVIDADE FAGOCÍTICA

EDUARDO JOSÉ NEPOMUCENO MONTENEGRO

Tese de doutorado submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Doutor em Nutrição

RECIFE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

DESNUTRIÇÃO E FUNÇÃO DO MACRÓFAGO

CONSEQÜÊNCIAS IN VITRO DE RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE SOBRE A ADESIVIDADE CELULAR E A ATIVIDADE FAGOCÍTICA

EDUARDO JOSÉ NEPOMUCENO MONTENEGRO

ORIENTADORA

Dra. Célia Maria M. B. de Castro

Professor Adjunto do Departamento de Medicina Tropical
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco

CO-ORIENTADOR

Dr. Raul Manhães de Castro

Professor Adjunto do Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE
2004

DEDICATÓRIA

A Deus pela força, coragem e dedicação que foram imprescindíveis na conclusão desse trabalho.

A minha esposa Mirian Ferreira Nepomuceno Montenegro, cujo amor e a paciência foram indispensáveis na realização desse sonho.

Aos meus filhos Carlos Eduardo e Luiz Henrique que são o motivo principal de minha luta e dedicação à profissão.

A minha mãe Ivone Nepomuceno Montenegro que me ensinou o sentido da perseverança, da paciência e do amor pelo trabalho (in memorian).

A meu pai José Montenegro que com seu caráter e honestidade forjou o homem que sou hoje (in memorian).

Aos meus irmãos Tânia Lúcia Montenegro Stamford e Glielson Nepomuceno Montenegro pelo incentivo e apoio prestado nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Célia Maria Machado Barbosa de Castro e Prof. Raul Manhãs de Castro, pela orientação e apoio na realização desse trabalho.

Aos meus amigos Márcio Pedroza, Maria Dantas Costa e Paula Roberta Hirakawa que tiveram participações relevantes na realização do trabalho.

A Fátima, meu anjo da guarda que me deu todo o apoio necessário no Laboratório de Microbiologia Clínica instalado no LIKA.

Agradeço a Profa. Tânia Lúcia Montenegro Stamford pelo incentivo e orientações dadas na minha atividade de docente.

Ao Prof. Dr. Newton Perreira Stamford pela contribuição dada, com o seu conhecimento e experiência de vida.

A TV universitária pelo empréstimo dos equipamentos necessários para realização da tese.

Ao meu amigo Marcílio que nas horas difíceis sempre estava pronto a ajudar.

Aos colegas do Departamento de Fisioterapia pelo apoio e incentivo prestado.

RESUMO

Verificou-se “in vitro” o índice de aderência e a atividade fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos Wistar machos com 60 a 90 dias de vida, nutridos (LABINA) e desnutridos e recuperados (DBR) após a exposição à diatermia de ondas curtas pulsadas (DOCP) nas técnicas convencional em paralelo e Schliephake nas freqüências de 30Hz, 50Hz e 430Hz e ao campo magnético alternado em ultra baixa freqüência (60Hz). A desnutrição ocorreu durante o período de aleitamento havendo recuperação nutricional dos animais a partir do 21º dia de vida com ração LABINA. Os macrófagos dos animais nutridos apresentaram aumento significativo no índice de aderência celular na técnica de Schliephake, na técnica convencional (30Hz, 50Hz e 430Hz) e ao campo magnético alternado. À atividade fagocítica diminuiu significativamente na técnica de Schliephake na freqüência de 50Hz e nas freqüências de 30Hz, 50Hz e 430Hz na técnica convencional em paralelo. O CM de 60Hz também reduziu a atividade fagocitica. Os macrófagos dos animais desnutridos e recuperados apresentaram aumento significativo no índice de aderência celular apenas na técnica de Schliephake nas freqüências de 30Hz e 50Hz e ao campo magnético alternado. À atividade fagocítica diminuiu significativamente apenas na técnica de Schliephake na freqüência de 30Hz e 50Hz e ao campo magnético alternado. A DOCP que aumenta o índice de aderência e reduz a atividade fagocitica pode ter aplicações diretas em processos traumáticos agudos. Esses achados auxiliarão na escolha da modulação da DOCP durante o procedimento terapêutico, tendo em vista que esta forma de irradiação é largamente utilizada na Fisioterapia. A preocupação com a poluição eletromagnética ambiental é relevante a partir da constatação que campos magnéticos de 60Hz interferem em parâmetros funcionais das células de defesa.

ABSTRACT

The adherence index and the phagocytic activity of peritoneal macrophages “in vitro” in males “Wistar” rats 60 and 90 days old, using (LABINA) nutrients and without nutrients (DBR) and recuperated after exposition to diathermy of pulsate short waves (DPSW) were verified. The conventional technique in parallel, the Schiephake technique (30 Hz, 50Hz and 430 Hz frequency), and the alternated magnetic field in ultra short frequency (60Hz) were used. Malnutrition occurred during the lactation period recuperated at the 21st of life with ration LABINA. Macrophages of animals with normal nutrition have a significant increase of the cellular adherence index using the conventional technique, the Schliephake technique (30Hz, 50Hz and 430Hz) and alternated magnetic field. Phagocytic activity reduced significantly using the Schliephake technique in frequency 50Hz, and in the conventional technique with 30Hz, 50Hz and 430Hz frequency. The CM 60Hz also reduced phagocytic activity. Macrophages of animal in malnutrition regime and rehabilitated showed significant increase in cellular adherence index when used the Schliephake technique (30Hz and 50Hz) and in the alternated magnetic field. The DPSW that increase the adherence index and reduce the phagocytic activity may be directly applied in acute traumatic processes. These findings could be applied to choose the best DPSW modulation during the therapeutic attainment due to the large use of this kind of irradiation in physiotherapy. Regarding the aspect of electromagnetically environmental pollution this findings may be relevant because it is known that 60 Hz magnetic fields interfere in functional parameters of the cellular defense.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

π: equivale a 3,1415

μ: permeabilidade magnética do meio [Hm^{-1}]

∫: símbolo de Integração

μG: miliGauss

μT: microTesla

μW/cm^2: microWatt por centímetro quadrado

1L-12: Interleucina 12

^{3}H: timidina

$^{43}Ca^{2+}$: Íon cálcio marcado

A375: célula de melanoma maligno

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMPc: Adenosina 3´, 5´monofosfato cíclico

ATP: Adenosina Trifosfato

B_0 : densidade do campo magnético alternado ou contínuo.

B-CLL: Leucemia linfocítica crônica

C^0: Celsium

C3a: Complemento C3a

C5a: Complemento C5a

$CD4^+$: Linfócitos T Helper

$CD8^+$: Linfócitos T citotóxico

CEM: Campo eletromagnético

CMA: Campo Magnético Alternado

CMC: Campo Magnético Continuo

D.C: componente continuo do campo magnético ou elétrico

d: distância entre as cargas q^+ e q^-

DBR: Dieta básica regional

dl: comprimento de elemento de corrente [metro]

DLDI: células de carcinoma de cólon

DNA: Ácido dessoxiribonucleico

DOC: Diatermia de Ondas Curtas

DOCP: Diatermia de Ondas Curtas Pulsadas

E: Vetor do campo elétrico

ELF: Campos de freqüência ultra baixa (de 3 a 30kHz)

EMF: Campos eletromagnéticos

EPA: Agência de Proteção Ambiental

Ets: oncogeno membro da família de genes *Ets*

F: Força Elétrica ou Magnética

f: freqüência do campo magnético ou elétrico

Gauss (G): mensuração da densidade do campo magnético pelo sistema CGS

GDP: Guanosina difosfato

GHz: Gigahertz

GTP: Guanosina trifosfato

H4: célula de glioma

HL-60: Linhagem Promielocítica

I: corrente elétrica através do condutor [A]

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

k: constante de proporcionalidade do meio onde as cargas se encontram (k_0 é a constante no vácuo)

K-562: Leucemia mielogenose crônica

kDA: kilo Dalton

kV/m: kiloVolt por metro

LPS: Lipopolissacaridio

MCF-7: Célula de carcinoma de mama

MHz: Megahertz

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMRF: Campo de Ressonância Magnética Nuclear

PEMF: campo eletromagnético pulsado

PHA: fitohematoglutina

PKC: Proteina quinase C

PMF: campo magnético pulsado

q: resultante entre q^+ e q^-

r: distância entre as cargas elétricas

r**:** raio do material

RF: Radio Freqüência

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro

RPMI 1640: meio de cultura

SAR: Taxa de absorção específica

SD: Síndrome de Down

SE: Sistema Endócrino

sen (θ): ângulo formado pelo posicionamento entre as cargas q^+ e q^-

SI: Sistema Imune

SN: Sistema Nervoso

SNC: Sistema Nervoso Central

Tesla (T) : mensuração da densidade do campo magnético pelo SI. $1T=10^4G$

TM3 e **TM4**: células testiculares de camundongos

TNF-α: Fator alfa de necrose tumoral

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

v: Velocidade de deslocamento de uma carga elétrica submetida a um campo magnético

W/Kg: Watts por kilograma

WHO: Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....2
1.1. DESNUTRIÇÃO E SISTEMA IMUNE.....2
1.2. CAMPO ELÉTRICO E MAGNÉTICO.....8
1.2.1. CAMPO ELÉTRICO.....8
1.2.2. CAMPO MAGNÉTICO.....9
1.3. CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS.....13
1.3.1. ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS.....13
1.3.2. CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS E AS CÉLULAS IMUNOLÓGICAS.....19
1.3.3. MODELOS TEÓRICOS DE INTERAÇÃO DOS CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS COM O SISTEMA BIOLÓGICO.....24
1.3.4. USO TERAPÊUTICO DOS CEM.....25
1.3.5. CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS E DESNUTRIÇÃO.....30
1.3.6. Apresentação dos artigos de revisão bibliográfica …….....33
1.3.7. How does the malnutrition alter immune system ……..34
1.3.8. Efeitos dos campos eletromagnéticos não ionizantes no sistema imune.....37
2. OBJETIVOS.....42
2.1. GERAL.....42
2.2. ESPECÍFICO.....42
3. HIPÓTESES.....44
4. APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS.....46
4.1. PRIMEIRO ARTIGO.....46
4.2 SEGUNDO ARTIGO.....69
5. DISCUSSÃO.....96
6. CONCLUSÕES.....108
7. PERSPECTIVAS.....110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....112
9. ANEXO.....138

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição e Sistema Imune

A desnutrição emerge de múltiplos e complexos fatores, os quais, na sua grande maioria, estão associados à pobreza e a tudo que dela se origina. Fatores biológicos, sociais, econômicos e políticos interagem de tal forma na gênese e manutenção desta carência que, ainda hoje, o seu estudo se faz necessário e premente.

Aproximadamente 195 milhões de crianças menores de cinco anos são desnutridas no mundo (BROWN E POLLITT, 1996). A desnutrição infantil é um dos mais sérios problemas de saúde pública, pois impede o desenvolvimento físico e mental do indivíduo, acarretando seqüelas no adulto, comprometendo assim o crescimento econômico e social das comunidades (CHAVES, 1978). Esse estado de carência nutricional incide em grande parte da população mundial, principalmente nas áreas em desenvolvimento (CHAVES, 1978).

A desnutrição predispõe as infecções, principalmente por patógenos intracelulares; contudo, a base biológica desta evidência ainda não está totalmente esclarecida (SKERRET et al., 1990; BORELLI et al, 1998). É incontestável que os nutrientes possuem um importante papel no desenvolvimento e função das células que participam da resposta imunológica (MARCOS, 1997; KAWASAKI et al., 1999). A desnutrição calórica protéica está associada com o enfraquecimento da imunidade mediada pelas células, na função fagocítica, no sistema de complemento, na concentração de anticorpos e na produção de

citocinas (CHANDRA, 2002). Logo, prejuízos na imunocompetência podem ser um importante fator causal no aumento da susceptibilidade de indivíduos desnutridos às doenças infecciosas (LEHMANN, 1991; TESHIMA et al., 1992). A deficiência de nutrientes isolados como ferro, vitamina A, zinco e magnésio alteram a resposta imune (CHANDRA, 2002; MALPUECH-BURGER et al, 1998), mesmo quando se apresenta em pequenas proporções (CHANDRA, 2002, CUNNIGHAN-RUNDLES, 2002). Assim, um suprimento adequado e equilibrado de nutrientes é imprescindível para a manutenção do crescimento em todos os sistemas orgânicos e o desenvolvimento das suas funções fisiológicas (MORGANE et al., 1993, KAWAKAMI et al, 1999).

Atuando sobre o período de crescimento rápido do SN, a deficiência nutricional é capaz de alterar o padrão dos eventos morfogenéticos que ocorrem nesta fase, com conseqüências deletérias para o desenvolvimento e a aquisição dos padrões fisiológicos maduros do organismo (RESNICK et al., 1979). É bem estabelecido experimentalmente que a desnutrição provoca alterações estruturais no SN, tais como: redução do número (LEUBA e RABINOWICZ, 1979) e alterações na forma dos neurônios (RESNICK et al, 1979; PICANÇO-DINIZ et al., 1998); atraso no processo de mielinização e diminuição no peso cerebral (MARTIN et al., 1995). Alterações metabólicas são também referidas, a exemplo, dentre outras, da diminuição dos níveis séricos de glicose e corticosterona, com redução da capacidade funcional da proteína ligante do colesterol (BOXWELL, AYSON e RAMENOFSKY, 1993).

O desenvolvimento comum dos tecidos nervoso, endócrino e imune (HOMO-DELARGHE e DARDENE, 1993) é um argumento forte sobre a relevância de suas

eventuais ações mútuas. Diversos achados experimentais apontam para a presença importante de interações neuroimunoendócrinas anteriores e posteriores ao nascimento (HOMO-DELARGHE e DARDENE, 1993). É válido salientar que no caso do sistema nervoso central (SNC) durante os primeiros anos de vida, o processo de crescimento e desenvolvimento ocorre com grande intensidade, o que o torna vulnerável às agressões nutricionais, infecciosas e mesmo farmacológicas. Esse período é considerado crítico para o desenvolvimento neural e corresponde ao pico de eventos específicos como neurogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 1993). O período crítico de desenvolvimento do encéfalo varia entre as espécies; no homem, inicia-se no período pré-natal (último trimestre de gestação) continuando até os 3 a 4 anos de vida; no rato, corresponde as três primeiras semanas de vida pós-natal (MORGANE et al., 1978).

Há indícios de que a desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento do encéfalo pode acarretar danos no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune (BOCKMAN e KIRBY, 1984; HOMO-DELARGHE e DARDENE, 1993; LE DOUARIN e JOTEREAU, 1975).

As investigações têm demonstrado uma relação clara entre o encéfalo, a hipófise e o timo na fase embrionária, ou seja, entre o SN, SE e SI (HOMO-DELARGHE e DARDENE, 1993). Assim, após a decapitação parcial ou hipofisectomia, o número de grânulos secretórios nas células epiteliais tímicas aumentam; há hipotrofia tímica e redução de linfócitos (BOCKMAM e KIRBY, 1984). Por outro lado, a timectomia afeta profundamente a hipófise e, em particular**,** células produtoras de prolactina e hormônio do

crescimento (BOCKMAM e KIRBY, 1984). Outrossim, ablação de áreas definida da crista neural produz efeitos deletérios no desenvolvimento do timo (LE DOUARIN e JOTEREAU, 1975). Apesar de todas estas evidências, os estudos sobre seqüelas no SI de desnutrição neonatal seguida de recuperação nutricional são escassos (QUEIROS, 2000).

Tem aumentado o interesse dos cientistas pelos eventuais efeitos da privação de alimentos sobre a função imune (ALLENDE et al., 1998, MARCOS, 2000). Segundo CHANDRA (1997), na desnutrição, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo estão prejudicados. Assim, a infecção é a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos severamente desnutridos (MORGAN, 1997). São comuns na desnutrição os danos à imunidade inespecífica representada pela integridade física da barreira epitélial e mucosa e os fagócitos profissionais, os quais permitem o livre acesso de antígenos aos órgãos internos e a circulação, podendo assim aumentar a susceptibilidade às infecções (MORGAN, 1997; CHANDRA, 1997). Ratas com dieta baixa de proteína (4%) apresentam maior índice de infecção pulmonar, sendo revertido com uma administração extra de vitamina A e E, no qual deflagra um aumento na atividade de macrófagos alveolares, revertendo o quadro patológico (KISHINO, 1992). Tem-se um consenso que o estado nutricional tem um profundo impacto na função imune e que o sistema imune pode ser modulado através do uso de modos específicos de suporte nutricional (MAINOUS, 1994).

São estudadas com particular atenção, as alterações nos subgrupos de linfócitos envolvidos na defesa específica, na indução de genes produtores de citocinas ou na ativação dos linfócitos (ALLENDE et al, 1998). Assim por exemplo, a relação entre os subgrupos de linfócitos CD4+ e CD8+ é menor em indivíduos desnutridos (LEKE et al., 1996). Além

disso, experimentos têm demonstrado uma redução no número de células produtoras de anticorpos e na quantidade de imunoglobulinas secretadas (CHANDRA, 1997).

A cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria de macrófagos de animais com desnutrição calórica protéica apresentam diminuição de sua atividade, com conseqüente redução na produção de ATP (BRIET, 2003). A atividade das células é dependente da informação transduzida por segundos mensageiros que promovem o equilíbrio entre a fosforilação e desfosforilação em moléculas alvo dentro das células ativando ou inibindo processos específicos (BRIET, 2003). A biosíntese das proteínas de membrana com alto peso molecular (42-200 kDA) e sua fosforilação são reduzidas em macrófagos isolados de ratos submetidos à dieta baixa de proteína (4%) após estimulo com LPS (lipopolissacaridio) (MAINOUS, 1994). A maioria destes estudos é realizada em animais desnutridos, porém não recuperados.

Em contra partida, a restrição na ingestão calórica (diminuição do consumo alimentar de 5,1% até 21,9%), preserva a função imune e prolonga a vida de camundongos susceptíveis a autoimunidade (CHRISTADOSS, 1984; FERNANDES, 1976). Os efeitos incluem retardo na formação de tumores (ENGELMAN, 1995; SHIELDS, 1991), aumento na resistência para microrganismos (WING, 1980) elevada resposta para vacinas (ARMSTRONG-ESTHER, 1978) e redução na incidência de patologias dérmicas (PERKINS, 1998). A restrição calórica atenua a desregulação na geração de fator alfa de necrose tumoral (TNF-α) e de interleucina 6 (IL-6) provocada pelo envelhecimento. O conhecimento a respeito do efeito da restrição calórica na função do macrófago é esparso e

inconclusivo (PHILIP et al, 2001). Mas, estudos demonstram que a resposta efetuada por macrófagos de animais submetidos à restrição calórica, a estímulos, é dependente de vários fatores incluindo a extensão e duração da restrição, do modelo animal estudado e da área anatômica do isolamento dos macrófagos (PHILIP et al, 2001). Pode ser constatado que na relação da nutrição com o sistema imune a falta ou o excesso de nutrientes traz conseqüências deletérias para a função imunológica. Caso ocorra uma disponibilidade de todos os nutrientes em quantidades equilibradas para o individuo, como ocorre na restrição da ingestão calórica, que normalmente varia a sua percentagem de ingestão, o sistema imune é fortalecido.

No Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio da UFPE, a fim de estudar-se os efeitos da desnutrição sobre aspectos fisiológicos e comportamentais, em diversas pesquisas têm-se utilizado modelos experimentais da desnutrição (ANDRADE, 1988). A dieta básica regional (DBR) é um modelo dietético baseado na alimentação consumida por determinadas comunidades do Nordeste do Brasil, desenvolvida pelo Departamento de Nutrição da UFPE, levando em conta dados de inquéritos nutricionais realizados na Zona da Mata de Pernambuco. Embora a DBR reproduza grande parte das alterações observadas na desnutrição e algumas alterações no sistema nervoso já tenham sido demonstradas, este modelo foi pouco empregado no estudo da imunidade ou na relação entre SI e SN.

Há muito que se esclarecer sobre a defesa imune em organismos adultos que foram submetidos à desnutrição em período precoce da vida e recuperados posteriormente. Como respondem estes indivíduos em situações que perturbem a homeostase? BERCLER e

ZIPPERLING**,** 1990 referem que o estresse causado por diversos fatores, sendo, na maioria das vezes, de origem psicossocial (mas nem sempre) leva a uma sobre carga da capacidade adaptativa humana e com isso causa efeitos sobre o SI. Atualmente há uma grande preocupação no estresse causado por campos eletromagnéticos em sistemas biológicos. Como o sistema imune de um organismo desnutrido ou desnutrido e recuperado se comportam diante destes campos?.

1.2. Campo elétrico e magnético

1.2.1 Campo elétrico

As leis físicas que regem o comportamento da carga elétrica, do campo elétrico e magnético, também são aplicadas ao sistema biológico. Serão apresentadas a seguir as leis básicas desta interação campo-carga (HEWITT, 2002).

Em torno de toda carga elétrica estática existe um campo elétrico caracterizado pelo vetor E. Se uma carga puntiforme *q* for colocada num campo elétrico E ficará sujeita a uma força elétrica F dada por:

$$F = q \cdot E$$

A força de interação entre os campos destas cargas é determinada pela lei de Coulomb:

$$F = k_0 \frac{Q_1 . Q_2}{r^2}$$

Onde:

k é a constante de proporcionalidade do meio onde as cargas se encontram (k_0 é a constante no vácuo)

r é à distância entre as cargas

Q_1 e Q_2 são as cargas elétricas

Isto é aplicado quando uma carga positiva ou negativa (ou íons) se encontra dentro de um campo elétrico. Caso seja colocado um dipólo elétrico (molécula de H_2O e/ou proteínas) ao invés de uma carga elétrica, este sofrerá uma força dada por:

$$F = q \cdot d \cdot E \cdot \text{sen}(\theta)$$

Onde:

q é a resultante entre q^+ e q^-

d é distância entre as cargas q^+ e q^-

sen (θ) é o ângulo formado pelo posicionamento entre as cargas q^+ e q^-

Cargas elétricas em movimento produzem campo magnético através da distorção causada no campo elétrico pelo movimento, com isso o campo magnético se torna relativo já que o movimento é relativo. Cargas elétricas que se desloquem paralelas entre si não apresentam campo magnético, apenas campo elétrico. Esse fenômeno relativístico tem grande importância no estudo da física quântica, mas não se aplica a sistemas celulares que possuem maiores graus de complexidade (HEWITT, 2002).

1.2.2. Campo magnético

Uma carga q (carga eletricamente carregada e/ou íon) em movimento, com velocidade v, no interior de um campo magnético B sofrem uma força magnética F dada por:

$$F = q \cdot v \cdot B \cdot \text{sen}(\theta)$$

Onde:

sen (θ) é o ângulo formado entre o campo magnético B e a força magnética F.

A carga q que está se movimentando no sentido perpendicular ao campo magnético B sofre uma força magnética F desviando a carga q perpendicularmente as linhas do campo magnético e o sentido da velocidade da carga (HALLIDAY, RESNICK E WALKER, 1996).

Um campo elétrico é criado em qualquer região do espaço onde um campo magnético esteja variando com o tempo. A intensidade do campo elétrico induzido é proporcional a taxa na qual o campo magnético varia; sua direção forma um ângulo reto com a direção do campo magnético variável. Isto é conhecido como Lei de Faraday, que é dada por:

$$E = \pi \cdot r \cdot f \cdot B_0$$

Onde:

E é a intensidade do campo elétrico induzido pelo campo magnético.

π equivale a 3,1415

r é o raio do material no qual o campo elétrico é induzido pelo campo magnético.

f é a freqüência do campo magnético.

B_0 é a densidade do campo magnético alternado.

Lei de Biot-Savart

Através da equação, obtida experimentalmente, por Biot e Savart, pode-se calcular o vetor de indução magnética em qualquer ponto do espaço, de um campo magnético gerado por uma corrente elétrica em um condutor com forma conhecida. A equação é dada por:

$$B = \mu \cdot I/4\pi \int \text{sen}\,\theta / r^2 \cdot dl$$

Onde:

B é a indução magnética [Tesla]

μ é a permeabilidade magnética do meio [Hm^{-1}]

I é a corrente do condutor [A]

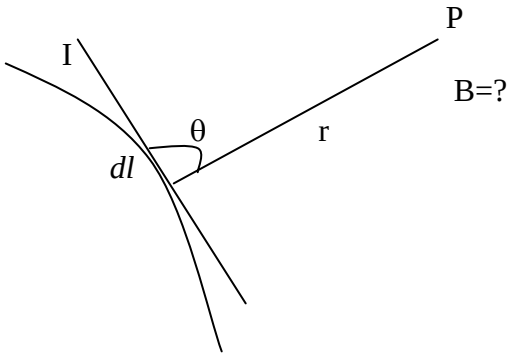
dl é a comprimento de elemento de corrente [metro]

r é à distância entre o elemento de corrente e o ponto P (corpo submetido ao CM) [metro]

θ é o ângulo medido, no sentido horário, entre a direção positiva da corrente ao longo de *dl* e o raio-vetor r que vai de *dl* a P.

$\int$ é o símbolo de Integração

No desenho vemos os vários elementos da equação, para o fio condutor considerado.



Atualmente são utilizadas duas formas de averiguação da densidade de campo magnético. A primeira é através de cálculo levando em consideração a configuração dos cabos de energia elétrica e a segunda é através da mensuração direta do campo através de

equipamentos específicos. Nos estudos epidemiológicos é de grande importância quantificar estes campos o qual pessoas e ou animais estão expostos.

Alguns modelos biofísicos estão sendo estudados e aplicados para tentar explicar o mecanismo de ação dos campos eletromagnéticos nas células, mas todos eles utilizam esses conhecimentos básicos citados acima, unidos com cálculo integral e diferenciação (derivadas) devido à complexidade do sistema celular (PANAGOPOULOS et al, 2002).

O estudo da interação e dos efeitos dos campos eletromagnéticos é de interesse de diversas linhas de pesquisa, tanto biólogos como físicos estão unidos nessa busca. Por isso Cadossi et al, 1992 elaboraram uma pequena tabela contendo termos físicos relacionados aos campos eletromagnéticos para que os biólogos tomassem ciência desses termos (tabela 1).

Tabela 1. Termos técnicos utilizados com maior freqüência.

	Explicação
ELF	campos de freqüência ultra baixa (de 3 a 30kHz)
EMF	campos eletromagnéticos
PMF	campo magnético pulsado
PEMF	campo eletromagnético pulsado
Forma de onda	forma que o campo eletromagnético se apresenta no tempo
Pulso	variações rápidas de subidas e descidas da forma de onda
Modulado	onda portadora (alta freqüência) unida a uma onda de baixa freqüência
Tesla (T)	densidade do campo magnético pelo Sistema Internacional.
Gauss (G)	densidade do campo magnético pelo sistema CGS. 10^4G=1T

D.C	componente continuo do campo magnético ou elétrico
Campo elétrico induzido	campo elétrico induzido através de um campo magnético alternado
Hertz	número de ciclos por segundo
Duração do pulso	largura do tempo do pulso
Taxa do ciclo	razão entre a parte ativa e inativa do sinal eletromagnético

1.3. Campos eletromagnéticos

1.3.1. Estudos epidemiológicos

Os efeitos induzidos pelos campos eletromagnéticos (CEM) sobre os seres vivos estão intimamente relacionados com a utilização da energia elétrica. Na década de 60 ocorreu o primeiro relato de Asanova e Racov (LIN, 1996) pesquisadores russos, que constataram, dores de cabeça, fadiga, irritabilidade, distúrbios gastrointestinais, insônia e distúrbios cardíacos em trabalhadores industriais submetidos a campos elétricos de 400-500kV/m. Após esse fato, diversas pesquisas foram realizadas demonstrando alterações no ritmo circadiano, na neuroquímica, no comportamento animal, interferência e promoção de tumores (FREY, 1995).

O primeiro relato da associação entre CEM, sistema imune e câncer surgiu do estudo de crianças e adolescentes que portavam a doença e da história pregressa das que faleceram em virtude dela. O estudo demonstrou que as que moravam em residências com CEM acima de 3 miliGauss tinham 2 a 3 vezes mais chance de desenvolver leucemia,

linfomas e tumores cerebrais em relação as que moravam em locais com campos eletromagnéticos inferiores (WEITHEMER e LEEPER, 1979).

Estudos posteriores observaram um elevado risco de leucemia entre eletricistas homens quando comparados com trabalhadores de outras áreas que não estava envolvida com campos elétricos (TENFOR 1996). Nas mulheres eletricistas ocorre um aumento de 40% na chance de desenvolverem câncer de mama, quando comparadas às mulheres que não possuem essa atividade (HAVARD MEDICAL SCHOOL HEALTH PUBLICATIONS GROUP, 1994). A exposição ocupacional de eletricistas tem demonstrado um elevado risco relativo de desenvolver leucemias e tumores cerebrais segundo 75% dos trabalhos publicados na área (TENFORDE, 1996). A incidência de tumores depende do tempo de exposição ao qual o individuo está submetido e da natureza eletromagnética do campo. Foi verificado que CEM variáveis pode induzir câncer nas glândulas mamárias com um índice maior que os campos estáticos (FREY, 1995).

Um estudo mais abrangente com um grupo amostral elevado de pessoas na faixa etária de até 16 anos cujas residências estava há menos de 300 metros das redes de transmissão de 220kV/m e 400kV/m, encontrou 142 casos de câncer, dentre eles 39 casos de leucemia e 33 casos de tumores no sistema nervoso. O risco relativo estimado para leucemia em campos na ordem de 0,3μT no estudo foi de 3,8 (FEYCHTING e AHLBOM, 1993). Uma estimativa feita a partir desta informação sugere que duas crianças por ano desenvolveriam leucemia devido ao fato de residirem próximo as redes de alta tensão (VERSHAEVE, 1997).

Incubadoras hospitalares com aquecimento elétrico gera campos magnéticos de 80 a 150mG (8μT a 15μT). As crianças que necessitarem do uso destas incubadoras estarão submetidas a campos magnéticos dezenas de vezes maiores que o encontrado nos estudos epidemiológicos e na fase de formação do seu sistema imunológico, endócrino e nervoso (BEARER, 1994).

A preocupação surge pelo fato de diversas fontes serem emissoras de campos elétricos e magnéticos. Linhas de transmissão de alta voltagem, monitores de vídeo, cobertores elétricos e procedimento de imagem de ressonância nuclear emitem campos que podem interagir com o corpo humano (GRUNDLER et al 1992). Em geral a exposição ocupacional é atribuída para a combinação tanto do campo elétrico como magnético, embora muito dos estudos epidemiológicos tenham limitado a exposição à mensuração do campo magnético que é capaz de penetrar prédios, árvores e outros objetos, em contraste com o campo elétrico que é facilmente bloqueado (FEYCHTING, 1996). Com isso a probabilidade do campo magnético penetrar no corpo e induzir pequenos campos elétricos focais de influência biológica se torna maior. A influência no desenvolvimento do tumor pode também ocorrer através das alterações nos padrões de sinalização celular ou na expressão genética (efeito epigenético dos CEM). Os CEM podem agir na promoção e progressão de fases de desenvolvimento do tumor após iniciação com um carcinógeno físico ou químico (FEYCHTING, 1996).

Apesar de algumas evidências, a associação entre a exposição ocupacional dos CEM e a formação de tumores e leucemia, especialmente, à leucemia linfocítica crônica,

alguns críticos afirmam que esses estudos são inconsistentes e muitas vezes incompletos, atribuídos a diversos fatores inerentes a pesquisa (LACY-HULBERT et al, 1998). Outro dado que contribui com essa visão, é a dificuldade de reprodução de alguns resultados obtidos em campo (locais que possuam linhas de transmissão ou fontes geradoras de CEM). SEVERSON et al 1988; YONGSON et al 1991; LINET et al 1997; TYNES 1997 não encontraram nenhuma relação entre exposição a CEM e a formação de qualquer tipo de tumores e casos de leucemia.

Com isso, ocorre a necessidade de se criar modelos laboratoriais para reduzir e controlar as variáveis externas e para analisar os efeitos biológicos dos CEM em animais (in vivo) e sistemas “in vitro” (LOSCHER et al, 1994).

O *Ets1* é um oncogeno modulado pelo cálcio membro da família de genes *Ets* e está funcionalmente envolvido na diferenciação celular, na formação de tumores e na apoptose. É expresso em linfócitos, testículos e no cérebro e tem papel durante a ativação do sistema imune e no desenvolvimento de embriões (JORCYK et al, 1997). CEM de rádio freqüência (RF) de 50MHz modulado em ultra baixa freqüência de 16Hz com intensidade de campo elétrico de 60V/m aumentou a expressão dos genes *Ets1* em células T linfoblastoides (células Jurkat), células de carcinoma de cólon (DLDI) e células testiculares de camundongos (TM3 e TM4) (ROMANO 2000). Os autores levantam uma hipótese dos possíveis alvos dos CEM na sinalização celular através de um mecanismo parcialmente descrito. O CEM agiria em diversos alvos moleculares não necessariamente em seqüência. A influência pode ser por etapas ou concomitantemente, através da fosfolipase C que induziria a quebra do fosfatidil inositol bifosfato em inositol trifosfato, promovendo a

liberação dos íons cálcio do retículo endoplasmático. O mecanismo no qual o cálcio age no DNA no núcleo celular ativando o *Ets1* permanece desconhecido. A proteína quinase C também é influenciada, tanto indiretamente pela concentração do cálcio, como diretamente pelos CEM (hipótese: mudança conformacional). Todos os processos de fosforilação promovidos por esta proteína podem ser desencadeados. O CEM também atuaria na molécula promotora do *Ets1* ligada ao DNA e no RNAm do *Ets1* formador da proteína *Ets1*, que irá desempenhar suas funções biológicas. A fronteira entre desempenhar funções biológicas relevantes e a tumorogênese é tênue, com isso, é preocupante que CEM possa influenciar este gene (ROMANO 2000).

Parâmetros imunológicos e hematológicos de homens turcos que trabalham na área de soldagem de uma grande indústria, submetido a um CM de 60Hz com densidades de campo que variam de 0,10 a 0,25μT por um período de oito horas de exposição por dia, apresentou uma redução no número de linfócitos e aumento do hematócrito. Apesar das alterações hematológicas e imunológicas, nenhuma alteração clínica foi observada nos trabalhadores, isso levou os autores da pesquisa a concluir que o campo ao qual os trabalhadores estavam submetidos não foi capaz de alterar o equilíbrio orgânico. De alguma forma ainda não compreendido o organismo lança mão de algum mecanismo compensatório para se adaptar (em alguns casos) ao estresse promovido pelos CEM de 60Hz em longo prazo não se traduzindo necessariamente em doença (DASDAG, et al, 2002).

O uso de telefones celulares por um longo período de tempo começa a se tornar uma preocupação para os cientistas, emitindo ondas e freqüências que variam de MHz (Megahertz) a GHz (Gigahertz). Para esclarecer em parte os efeitos destas freqüências, linfócitos humanos foram expostos a emissores na faixa de telefonia celular (835MHz e 1909,8MHz) com 5 ou 10W/Kg de SAR (taxa de absorção especifica da energia do CEM) por 24 horas. Os resultados demonstraram danos no cromossomo dos linfócitos. Apesar da SAR elevada, a temperatura no experimento foi controlada, sendo elevada apenas $0,5C^0$ em relação ao controle, com isso os danos provocados no cromossomo foram atribuídos à freqüência e não ao efeito térmico. A analise de uma possível alteração na função do linfócito não foi efetuada sendo um ponto de crítica do próprio autor (RAYMOND et al, 2002).

Em geral, as evidências sugerem que os campos eletromagnéticos têm algum efeito no processo carcinogênico. Eles estão mais ligados para agirem como promotores ou agentes que influenciam a progressão para o câncer do que iniciador da doença. Nesse papel, o campo pode aumentar a proliferação das células alteradas geneticamente do que causar uma lesão inicial no DNA ou na cromatina ou/e causar enfraquecimento na resposta imunológica a fatores internos e externos (REPACHOLI, 1999).

O Environmental Protection Agency (EPA) recomenda que o limite máximo de densidade de campo magnético que um individuo fique exposto por um período de 8 horas seja de 16G e a World Heatlth Organization (WHO) recomenda 10G. Mas uma proposta dos Estados Unidos e da Suécia através da Agência de Proteção Ambiental dos U.S. propõe que um novo valor de campo seja adotado mundialmente. Este não deve ultrapassar 0,2μT

(2 mG) (EDWARDS, 1995). Deve ser observado que os valores atuais estão bem acima de alguns valores utilizados nas pesquisas e encontrados em ambientes de trabalho e residenciais que promoveram alterações biológicas. Como os CEM estão dentro de sistemas não lineares isso implica dizer que pequenas densidades de campo podem ter grandes efeitos enquanto campos maiores podem passar despercebidos pelo sistema biológico (FLIPO et al, 1998). Dessa forma as densidades de campos tidas como seguras podem variar conforme os resultados de novas pesquisas.

1.3.2. Campos eletromagnéticos e as células imunológicas

Estudos epidemiológicos e biológicos demonstram que à exposição para os CEM afetam as células e os tecidos, apesar de que, o mecanismo de interação dos campos com as células não tenha sido totalmente esclarecido. Vários sistemas celulares, incluindo células do sistema imune, estão sendo utilizados para avaliar as conseqüências da interação dos CEM. Desde que o sistema imune exerce um papel de importância primária no controle e no desenvolvimento de câncer é importante o conhecimento de como as funções imunológicas são afetadas após a exposição aos CEM (IKEDA et al, 2003).

Alterações na função imune pode representar um mecanismo, através do qual, está associado com o desenvolvimento de doenças. Partindo desse pressuposto os linfócitos vêem sendo utilizados para investigar os efeitos biológicos dos CEM sendo um bom modelo experimental (BERSANI, et al 1989). Freqüentemente são obtidos como células inativas, mas pode ser induzido a entrar no ciclo celular, imitando o processo de ativação natural, favorecendo o estudo dos possíveis efeitos dos CEM no mecanismo de regulação

do ciclo celular e sua progressão (MAIZEL et al, 1981). Além do mais, o linfócito é apropriado no estudo da interação receptor–ligando e o fluxo de íons através da membrana celular, fenômeno que de acordo com os modelos teóricos pode ser particularmente sensível para os CEM (ALDINUCCI et al, 2003).

A exposição das culturas dos linfócitos apenas ao CEM não modifica espontaneamente a proliferação celular medido através da timidina [^{3}H]. Uma possibilidade é que a pequena energia transferida para o sistema biológico não é capaz de modificar a condição metabólica das células inativadas. Quando a fitohematoglutina (PHA) (mitógeno) é adicionada, os linfócitos entram no ciclo celular e proliferativo com uma maior intensidade principalmente quando o sinal proliferativo da PHA não está em uma concentração ótima (CONTI et al, 1983, CADOSSI, 1988). Isso sugere que o efeito modulatório dos CEM é mais evidente quando a proliferação celular não é máxima. Linfócitos com capacidade de proliferação reduzida como em indivíduos idosos, na leucemia linfocítica crônica (B-CLL) e na Síndrome de Down (SD) são utilizados, ocorre aumento na síntese de DNA (COSSARIZZA et al, 1989, 1991). Apesar de que, pesquisas recentes demonstram que células imunes (macrófagos) podem ser ativadas pelos CEM sem necessariamente terem sido pré-ativadas por alguma substância química (SIMKO et al, 2001).

Todas as informações externas são transduzidas através da membrana celular para o interior citoplasmático. Sendo considerada como o ponto primário de interação com os CEM detectando, transduzindo e amplificando o sinal captado (BAUREUS et al, 2003). O mecanismo de liberação do cálcio no interior citoplasmático é tido como alvo para a ação

dos CEM, que pode ser perturbado com agentes químicos, como bloqueadores e ionóforos de cálcio modificando a atividade celular. O limiar de intensidade de campo que interfira com o metabolismo do cálcio, a transcrição de RNA, à síntese de DNA e a citotoxidade celular ainda não foi estabelecido (ALDINUCCI et al, 2003). A bioatividade pode ser inibida ou estimulada dependendo das características biofísicas indicando um envolvimento de um mecanismo complexo de interação (WALLECZEC, 1992)

Para reproduzir os resultados de diversos laboratórios é necessário o controle de um grupo de variáveis, obtendo assim respostas biológicas confiáveis que são dependentes dos parâmetros biofísicos (janelas biológicas e físicas). As janelas biológicas dependem do estímulo (tipo, intensidade, tempo), idade dos doadores (quando forem normais sem patologia), e da patologia que afeta os doadores (B-CLL, SD, AIDS etc.). As janelas físicas dependem da freqüência, amplitude da onda, forma da onda e a geometria de exposição. Controlando estas variáveis a probabilidade na reprodução do experimento aumenta, facilitando a identificação das janelas (parâmetros biofísicos nos quais obtém respostas biológicas) em cada caso estudado (CADOSSI et al 1992).

Linfócitos expostos a um campo magnético alternado (CMA) de 16Hz com 421mG e campo magnético continuo (CMC) com 234mG teve seu influxo de cálcio reduzido após estimulação com a concanavalina A reduzindo a ativação dos linfócitos. O mesmo não ocorre quando a célula é estimulada com os campos separadamente. O efeito conjunto dos campos determinou uma janela especifica que não foi alcançada quando os campos foram utilizados separadamente (YOST e LIBURDY,1992).

CEM de 50Hz e 1.05mT aplicados em linfócitos humanos “in vitro” durante 72 horas resultou em uma diminuição no índice mitótico, aumento em aberrações cromossômicas e morte celular. Essas alterações não foram detectadas nas células expostas por 24 e 48 horas. Apesar do resultado, os autores referem trabalhos com outros tipos celulares que não apresentaram essas alterações. O ponto de vista discordante é a utilização de campos e células diferentes da utilizada no trabalho (KHALIL e QASSEM, 1991). A alteração no ciclo celular de linfócito humano com diminuição na mitose celular foi novamente observada após a exposição a mitógenos e a CM de 50Hz e 5mT, mas sem alterações cromossômicas (ANTONOPOULOS et al, 1995).

Contribuindo com o modelo de janelas especificas, WALLECZEC e BUDINGER 1992 demonstraram que linfócitos ativados por concanavalina A tinham sua captação de $^{43}Ca^{2+}$ reduzida quando estimulada por um CM de 3Hz com 1,6 e 6,5mT por 30 minutos e que nenhum efeito ocorria nas células inativas submetidas ao campo. Com a densidade de 28mT ocorreu uma inibição total do influxo do cálcio para o interior celular. Com isso os pesquisadores demonstraram a importância do estado celular (inativo ou ativo) na resposta ao campo e que nesse caso ocorreu uma dependência linear de densidade de campo e inibição do influxo de cálcio.

A importância do estado celular e a capacidade dos CEM interagirem com células inativas é muito discutido na literatura. Linfócitos inativos expostos a CEM de 50Hz com 3mT de densidade por 12 horas de exposição não apresentaram nenhuma alteração na produção de interleucinas 1β e 2, mas foi constatada a redução do TNF α após o período de

exposição. Com a adição da fitohematoglutina ao meio de cultura e a exposição concomitante ao CEM, ativando os linfócitos, os níveis de interleucina (1β, 2) e de TNF α aumentaram, como também a proliferação celular nas 24 e 48 horas após os estímulos. Nesse caso, os CEM demonstraram um aumento na produção das interleucinas e aumento na proliferação celular conjuntamente com a fitohematoglutina, tendo pequena influência nas células inativas (redução do TNF α). Apesar desse resultado as células inicialmente inativas responderam dentro de uma restrita função biológica podendo o campo influenciar essas células de forma mais especifica (PESSINA e ALDINUCCI, 1998).

ALDINUCCI et al 2003 utilizaram linfócitos de doadores normais e células Jurkat (leucemia aguda) submetidas a um campo de NMRF (campo de ressonância magnética nuclear) com densidade de 4,75T juntamente com um CEM pulsado (não foi referido sua freqüência), com densidade de 0,7mT por uma hora, avaliando a concentração interna do cálcio, proliferação celular, produção de interferon-*y*, TNF α e interleucinas (1-β, 2 e 6). Os resultados claramente demonstraram que a exposição ao NMRF aumentou a concentração do cálcio intracelular sem nenhum efeito na proliferação, ativação e produção de substâncias pró-inflamatórias tanto em linfócitos inativos quanto nos ativados pela PHA. Nas células Jurkat ocorreu diminuição na concentração interna do cálcio e na proliferação, consistente com os baixos níveis de IL-2 mensurados (IL 1-β, IL-6 e TNF α não foram analisados). Os pesquisadores levantam a questão de que o simples fato do aumento na concentração do cálcio citoplasmático não irá predeterminar a atividade da célula, mas sim em que mecanismo celular o cálcio atuará e como os campos direcionam o cálcio e outros segundos mensageiros nos mecanismos internos da célula.

O conhecimento atual sobre a influência dos CEM no sistema biológico determina que células com defeitos intrínsecos respondem melhor aos campos do que células normais. Algumas células normais são susceptíveis quando a cascata sinalizadora intracelular é deflagrada por algum estimulo, enquanto outras células podem deflagrar essa cascata por influência direta dos campos. O estimulo e/ou a inibição de um processo biológico pode ser alcançada com o mesmo campo em diferentes células ou na mesma célula com diferentes campos. Tal fato leva a questão de como o campo externo é transduzido para o interior celular. A variabilidade dos estímulos físicos e das condições biológicas abre um leque de inúmeros efeitos biológicos dos campos sendo necessário obrigatoriamente à investigação experimental, não se detendo apenas em modelos teóricos computacionais.

1.3.3. Modelos teóricos de interação dos CEM com o sistema biológico.

Serão apresentados a seguir em caráter informativo os dois modelos mais conhecidos na literatura.

Ressonância de Ciclotron Iônica (LIBOFF, 1985) e Teoria da Ressonância Paramétrica (LEDNEV, 1991).

A Ressonância de Ciclotron Iônica se baseia no mecanismo de transferência de energia de um campo eletromagnético alternado para o sistema biológico, quando os íons se deslocam em trajetórias helicoidais, na presença de um campo magnético estático (B) exibindo uma freqüência de ressonância w_c=(q/m).Bs. Essa ressonância é explicada da seguinte forma: no vácuo, um íon de carga *q*, massa *m* e velocidade *V*, em um campo magnético estático ficarão, exposto a uma força de Lorentz F=*q*(VxB). A força induz o íon

a se deslocar em uma trajetória circular de raio R=(Vm/qBs). Todas essas forças interagindo, determina uma freqüência que o campo externo alternado aplicado juntamente com o campo magnético estático (que pode ser o da Terra) irá influenciar os íons. Para cada íon existe uma freqüência especifica dependendo do campo magnético estático.

A Teoria da Ressonância Paramétrica foi elaborada com o intuito de complementar a teoria da Ressonância de ciclotron iônica. Baseia-se no mesmo principio, só que invés de levar em conta apenas os íons, acrescenta a presença de proteínas ligadas aos íons (cálcio-calmodulina). Nessa ligação o íon na presença de um campo magnético estático apresenta um nível de energia de w_c=(q/m).Bs. A razão entre a densidade de campo magnético alternado e campo magnético contínuo aplicado ao sistema determina a função de Bessel (B_{ma}/B_{mc}). Dependendo do valor dessa função e da freqüência calculada (w_c) é determinada a probabilidade dos campos externos (alternado e contínuo) agirem nos complexos íons-proteínas. A função é dada por:

$P \approx w_{c.} (B_{ma}/B_{mc})$.

Há muitas controvérsias quanto à aplicabilidade dessas teorias. Além disso, a teoria é atacada na sua base física, pois viola as leis da mecânica quântica. Não entraremos em detalhes mais específicos, pois foge o objetivo do nosso trabalho.

1.3.4. Uso terapêutico dos CEM

A referência ao uso médico de correntes elétricas de alta freqüência pode ser encontrada já no século XIX quando d`Arsonval passou uma corrente de 1 ampère através do seu próprio corpo. Embora se soubesse que quantidades similares de eletricidade em ultra baixa freqüência fossem potencialmente fatais, foi relatada apenas uma sensação de aquecimento local (GUY et al, 1984).

A DOC (diatermia de ondas curtas) foi inicialmente utilizada pelos fisioterapeutas para enviar energia eletromagnética para os tecidos situados profundamente, através de um circuito ressonador que coloca o paciente em ressonância com a saída do equipamento promovendo uma transferência maior de energia para a área tratada. A emissão é regulamentada por controles federais (ANATEL), o que permite somente quatro freqüências para os propósitos médicos (45, 30, 27 e 13MHz) (JOSEPH KAHN, 2001). O aquecimento tecidual é produzido através da transferência de uma potência apropriada ao tecido, no qual se tornou conhecida como diatermia, palavra grega, que significa “aquecimento através de” (BANSAL et al, 1990).

A energia eletromagnética gerada pela DOC pode ser transferida por dois métodos, o capacitivo e o indutivo. No capacitivo são usados dois tipos de eletrodos (placas), o flexível e o fixo (rígido). O primeiro tipo de eletrodo é acoplado a área tratada em duas técnicas básicas, a convencional em paralelo e em série. A técnica convencional é aplicada em regiões de bom acoplamento, como grandes áreas musculares. No caso de regiões de difícil acoplamento, como extremidades articulares, é adotado o método capacitivo com eletrodo fixo ou técnica de Schliephake. No método indutivo os eletrodos são do tipo tambor articulado, tambor simples e tambores de indução sem contato, que podem ser

aplicados individualmente. Nessa técnica regiões teciduais mais profundas são aquecidas em relação à técnica capacitiva (JOSEPH KAHN, 2001). Esse tipo de eletrodo não é encontrado no Brasil.

As correntes de alta freqüência se tornaram terapias populares na Europa a partir do inicio do século passado. Durante esse período, foram constatadas algumas lesões em tecidos profundos provocadas pelo aquecimento interno. Por isso na década de 50 foi desenvolvido um método de ligar e desligar rapidamente o campo, produzindo diatermia de ondas curtas pulsadas (DOCP), que promovia apenas um leve aquecimento local, caso fosse empregado uma potência média alta e uma duração de pulso longa (milisegundo). Como na maioria das aplicações não ocorria elevação na temperatura tecidual, se desenvolveu o interesse pelas propriedades não-térmicas dos campos eletromagnéticos (JOHN LOW, 1995). A DOCP se caracteriza por uma onda portadora de alta freqüência modulada em ultra baixa freqüência.

Nos anos iniciais do seu desenvolvimento, a DOCP em particular, foi aclamada como benéfica para muitas enfermidades (TZIMA e MARTIN, 1994).

Atualmente a DOCP é mais utilizada que a DOC. Um estudo feito entre fisioterapeutas ingleses indicou que 75% usam a DOCP nos seus tratamentos diários em relação a apenas 8% que usam a DOC (POPE et al, 1995). Apesar dessa popularidade ainda restam muitas questões relativas a aplicação da DOCP e DOC, por exemplo, ainda não é possível responder conclusivamente em quais circunstâncias se deve usar a DOCP ou a DOC e quais devem ser as doses aplicadas no tratamento. Clinicamente se observa que em

alguns casos, o processo agudo responde melhor a aplicação da DOCP, enquanto nos processos crônicos ocorre melhor resposta com a DOC (BISSCHOP, 2001).

Contudo, os fisioterapeutas afirmam que a DOCP e a DOC são recursos úteis para o tratamento de diversas condições patológicas, não devendo ser descartada das modalidades fisioterapêuticas só porque essa é uma área pouco pesquisada (LI e FENG, 1999).

CAMERON (1961) atribui as DOCP o aumento na formação do colágeno, infiltração de células de defesa, fagocitose, atividade histocitária, e resolução de hematomas em lesões experimentais infligidas em cães. Em contraste, CONSTABLE et al 1971, conduziram uma série de experimento, com a DOCP examinando reparo de feridas em coelhos e porquinhos da índia não sendo detectado nenhum efeito benéfico ou maléfico ao processo de cicatrização. Em 1979 KRAG et al usando um modelo experimental duplo cego bem controlado, relatou que a DOCP não tinha efeito na sobrevivência de retalhos de pele experimentais em ratos, mas BANSAL et al 1990 usando cães concluíram que a DOCP estimularam a maturação precoce das fibras de colágeno e a regeneração mais rápida de fibras musculares lesadas.

Contribuindo com a linha de pesquisa, GOLDIN et al 1981 mostrou que a DOCP é capaz de aumentar a velocidade de regeneração da ferida no local doador após enxertos de pele, enquanto ITOH et al 1991 e SALZBERG e COOPER-VASTOLA 1993, mostraram que a DOCP aumenta a velocidade de resolução de úlceras de pressão crônica. Alguns experimentos carecem de informações sobre a dose (quantidade de energia), duração do tratamento ou número de aplicações, enquanto outras apresentaram falhas graves na

metodologia usada. Alguns autores, baseados na lei de Arndt-Schultz afirmam que uma dose muito baixa de DOCP não terá efeito e uma dose muito alta pode ser prejudicial, sendo necessário uma dose moderada para cada processo instalado (KLEBER-MOFFER et al, 1996; LOW, 1997, 2001) O grande problema é encontrar essas doses para cada caso. Por isso é necessária a realização da pesquisa básica “in vitro”.

Os achados conflitantes relatados nesses estudos é atribuído a metodologias e doses diferentes, nenhum autor descreveu claramente a dosagem com detalhes suficientes para permitir a reprodução do experimento em outro laboratório. Isso torna impossível tirar conclusões firmes sobre a dose de tratamento mais efetiva a ser adotada.

É perfeitamente possível que as células lesadas ou tecidos diferentes respondam em uma freqüência ou pico de potência em particular. Pode ser que uma dose alta cause a piora de uma condição ou que uma dose baixa demais não produza efeito (KITCHEN, 2003).

Já está sendo demonstrado que os CEM em ultra baixa freqüência atuam de forma especifica em diferentes células e em suas funções, podendo a DOCP apresentar o mesmo comportamento. Faz-se necessário uma pesquisa extensa dos efeitos das DOCP na atividade celular.

O campo eletromagnético da DOC e DOCP na aplicação clínica diária são quantificados em Watts. No próprio equipamento vem especificando a sua potência de saída. Essa unidade física não dá informações suficientes sobre a dosagem, pois não especifica a área na qual a energia é depositada. Com isso a reprodutibilidade dos achados

biológicos se torna difícil. A forma correta é mensurar através de equipamentos específicos a intensidade do campo elétrico (Volt/metro) ou a densidade de potência do campo elétrico (Watt/metro). Com qualquer um dos dois valores mensurados acima poderá ser calculado o SAR que é a taxa de absorção especifica ($SAR=s(E)^2/r$). Onde o *s* é condutividade do meio em Siemens/metro, *E* é a intensidade do campo elétrico e *r* é a densidade do tecido corporal. A fórmula para resolução do problema de quantificação da energia depositada (SAR) leva em conta diretamente a intensidade do campo elétrico. Caso a mensuração do campo tenha sido feita em Watts/metro, a resolução deve iniciar encontrando a intensidade do campo elétrico através da fórmula $W=E^2/R$, onde W é a densidade de potência do campo elétrico (W/cm^2), *E* é intensidade do campo elétrico e *R* é a resistência do ar a passagem do campo. Caso o SAR apresente valor muito baixo após o cálculo é aceito na literatura cientifica que seja especificado o valor básico mensurado, como a intensidade ou a densidade de potência do campo (ICNIRP, 1998).

Clinicamente se torna inviável esse tipo de controle na dosagem, pois estes equipamentos de mensuração de unidades básicas apresentam alto custo, sendo difíceis de adquirir mesmo em laboratórios de pesquisa. Cabe aos fisioterapeutas que estão envolvidos na área de pesquisa com os recursos que lhe são disponíveis mapear os parâmetros físicos destes campos que influenciam processos biológicos específicos.

1.3.5. Campos eletromagnéticos e desnutrição

Na literatura especializada nas duas áreas (magnetobiologia e desnutrição) não foram encontrados trabalhos que fizesse referência a união desses conhecimentos (Medline,

PubMed, periódicos CAPES, bibliotecas, COMUT etc). A preocupação da exposição e do uso terapêutico de campos eletromagnéticos é mais encontrada nos países desenvolvidos, já a desnutrição, a preocupação é mais encontrada nos países subdesenvolvidos e nos emergentes. Como visto na revisão dos campos eletromagnéticos agindo no sistema biológico, as células com distúrbios intrínsecos respondem melhor aos campos do que as células normais. Assim, a desnutrição pode ser um bom modelo de experimentação no estudo da interação do campo com o sistema biológico. Apesar das diversas formas de desnutrição, no trabalho optamos pela desnutrição durante o período critico de desenvolvimento seguido de recuperação nutricional.

Assim, como responderiam os "ex-desnutridos" às terapêuticas vigentes que não levam em conta geralmente uma eventual desnutrição pregressa?. Na medicina e fisioterapia tem aumentado o emprego das radiações em diversos tipos de tratamento. Será que os organismos eutróficos apresentam respostas semelhantes aos desnutridos? Diante deste fato, evidencia-se a necessidade de ser efetuado um estudo cientifico inicialmente "*in vitro*", com densidade de potência e freqüência de radiações não-ionizantes, utilizados na prática clínica, estimulando ou inibindo a atividade de macrófagos, que tiveram sua formação normal em animais nutridos e naqueles de animais que sofreram de desnutrição, na fase inicial do desenvolvimento do encéfalo, para verificar possíveis alterações por parte deste tipo de célula.

Esta célula, por ser iniciadora de resposta inflamatória, por participar do processo de reparação tecidual e por estar envolvida na resposta imune tanto inata quanto adaptativa são de fundamental importância nos processos infecciosos e na regulação da homeostase.

Justificando-se pois, o estudo neste tipo de célula. Identificando a técnica de aplicação, a densidade de potência e a freqüência eficaz de estimulação ou inibição, ocorrerá um direcionamento efetivo para a intervenção clínica em processos inflamatórios agudos e crônicos, que acometem pacientes. As vantagens para os mesmos, resultará na diminuição do tempo de cura, dando um melhor prognóstico na reabilitação, diminuindo o período de afastamento do trabalho, como também no custo financeiro envolvido no tratamento.

Outro ponto principal de investigação é observar se macrófago de animais desnutridos e submetidos à recuperação nutricional irão se comportar de forma semelhante aos macrófagos de animais nutridos. Isso nos trará uma perspectiva no tratamento de pacientes nutridos e desnutridos-recuperados.

1.3.6. A seguir serão apresentados dois artigos de Revisão bibliográfica.

O primeiro intitulado: HOW DOES THE MALNUTRITION ALTER THE IMMUNE SYSTEM?, analisa como a desnutrição altera a função imunológica e as conseqüências dessas alterações.

O segundo artigo intitulado: EFEITOS DOS CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS NÃO IONIZANTES NO SISTEMA IMUNE, aborda os efeitos da exposição dos campos eletromagnéticos no sistema biológico e mais especificamente no sistema imunológico.

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

2.1.- Geral

Estudar “in vitro” os eventuais efeitos da radiação não ionizante no espectro de rádio freqüência modulada em ultra baixa freqüência e campo magnético em ultra baixa freqüência de 60Hz sobre a função dos macrófagos peritoneais provenientes de ratos adultos, nutridos e desnutridos durante o período critico de desenvolvimento do encéfalo.

2.2.-Específicos

Em macrófagos submetidos ou não a radiação, estudar:

A adesividade celular

A atividade fagocítica

HIPÓTESES

3.-HIPÓTESES

a) Campos eletromagnéticos de rádio freqüência modulada em ultra baixa freqüência utilizando a técnica de Schliephake, reduz o índice de aderência e a atividade fagocítica no macrófago peritoneal de rato nutrido.

b) Campos eletromagnéticos de rádio freqüência modulada em ultra baixa freqüência utilizando a técnica convencional em paralelo, aumenta o índice de aderência e a atividade fagocítica no macrófago peritoneal de rato nutrido.

c) Campos eletromagnéticos de rádio freqüência modulada em ultra baixa freqüência utilizando a técnica de Schliephake, não interferem no índice de aderência e na atividade fagocítica no macrófago peritoneal de rato desnutrido e recuperado.

d) Campos eletromagnéticos de rádio freqüência modulada em ultra baixa freqüência utilizando a técnica convencional em paralelo, aumenta o índice de aderência e a atividade fagocítica no macrófago peritoneal de rato desnutrido e recuperado.

e) Campos eletromagnéticos de ultra baixa freqüência (60Hz), reduz o índice de aderência e a atividade fagocítica no macrófago peritoneal de rato nutrido.

f) Campos eletromagnéticos de ultra baixa freqüência (60Hz), não interferem no índice de aderência e na atividade fagocítica no macrófago peritoneal de rato desnutrido e recuperado.

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

4.- APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

No presente trabalho foi avaliado o índice de adesividade celular e atividade fagocitica de macrófagos de ratos machos Wistar nutridos e desnutridos durante o período neonatal, submetido à diatermia de ondas curtas pulsadas e a campo magnético alternado ambos em ultra baixa freqüência. O campo de diatermia foi aplicado com duas técnicas largamente usadas na prática clínica. O campo magnético utilizado reproduziu os parâmetros físicos encontrados em uma exposição ambiental ou ocupacional.

4.1. Primeiro artigo, intitulado: Interference of electromagnetic fields in adherence and phagocytic activity macrophages “in vitro”. Submetido como artigo original na revista: Bioelectrochemistry.

Neste artigo, foram estudados os efeitos da diatermia de ondas curtas pulsadas nas freqüências ultra baixas de 30Hz, 50Hz e 430Hz nas técnicas convencional em paralelo e Schliephake e campo magnético alternado na freqüência ultra baixa de 60Hz, no índice de aderência celular (adesividade) e na atividade fagocitica de macrófagos peritoneal de ratos Wistar nutridos. Neste estudo foi observado que os campos de diatermia pode influenciar de forma especifica o índice de aderência celular e a atividade fagocitica. O campo magnético alternado também interfere no índice de aderência celular como na atividade fagocitica.

Interference of electromagnetic fields in adherence and phagocytic activity macrophages “in vitro”

NOME DA REVISTA

Bioelectrochemistry

E.J.N. Montenegro[1]., P.R.T. Hirakawa[2]., M.D. Costa[3]., M.B. Pedroza[4], R.M. De Castro[5] and C.M.M.B. De Castro[6]

[1,2,4]Departamento de Fisioterapia – UFPE

[3]Departamento de Medicina – UFPE

[5]Laboratório de Fisiologia do Departamento de Nutrição – UFPE

[6]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE (LIKA) / Setor de Microbiologia Clínica

Correspondente: Célia M. M. B. de Castro

Tel.: (081) 2718486 - ramal 27, Fax: (081) 2718485

ccastro@lika.ufpe.br

Shortened title: Electromagnetic fields and macrophage activity

Abstract

The effects of electromagnetic fields of modulated radio frequency (RF) at extreme low frequency and the alternated magnetic field (MF) were studied “in vitro” in peritoneal macrophages on Wistar male rats, at 60 to 90 days of age, the index of adherence and phagocytic activity having been analyzed. The RF using 30MHz modulated at extreme low frequency (30Hz, 50Hz and 430Hz) utilizing Schliephake`s technique, conventional parallel technique and an MF of 60Hz enhanced a significant increase in cellular adherence of the experimental groups as to its control ($p<0,05$). The phagocytic activity did not show any reduction in groups of 30Hz and 430Hz utilizing Schliephake`s technique. But got significant decrease in modulated 50Hz radio frequency Schliephake`s technique, modulated frequency 30Hz, 50Hz and 430Hz at conventional parallel technique and MF of 60Hz. The electric field of radio frequency and the MF increase the index of adherence, and may have practical applications in physiological processes which need an enhancement of this phenomenon. The phagocytic activity decreased in the modulated RF and in the MF, and may be applied directly in acute injure processes, thus controlling the tissue damage caused by toxic substance set free by macrophages. These will help in choosing the modulation of RF field during therapeutical procedures, considering that this form of irradiation is largely used in physiotherapy.

Key words: electromagnetic fields, macrophages, phagocytic activity, cellular adherence.

INTRODUCTION

The effect of interactions in the non-ionizing electromagnetic fields (NI-EMF) with the living systems have been studied by scientists in the past decades, and the number of experimental discoveries and theoretical explanations for the interactions of NI-EMF with the biological system [1,2,3] have been growing.

The exposure to the EMF has been related to an increase in the incidence of leukemia and the appearance of tumors [4,5,6,7], thus being considered as a possible human carcinogenic process despite the fact that no biological mechanics keenly characterized have confirmed that relation [8].

In various cell systems, including the cells of the immune system, several biological effects have been described after exposure to EMF, and different mechanisms have been proposed to explain those effects. A particular interest in studying the interactions of these fields with the immune system is that it has the role of protecting the organism against invasion of pathogens and the appearance and the development of tumorous mass [9].

The EMF induce changes in the biochemistry of immune cells, thus possibly affecting the defensive response. Studies carried out in “in vivo” exposure analyzing the immune system showed reduction in the number of leucocytes in the blood [10, 11], change in the inflammatory response [12;13] and in the activity of killer`s natural cells [14].

The activity and the production of free radical are enhanced in the macrophages of rats when subjected to 50Hz EMF, 1mT (miliTesla) of field intensity per a 45 minute

exposure. The same phenomenon occurred when the macrophages were stimulated by 1nMol TDA (12-o tetradecanoilforbol 13-acetate), showing that EMF is a physical stimulus and may act in the biological mechanism in the same way as a chemical stimulus under certain conditions, giving similar results [15].

Our objective was to investigate “in vitro” the effects of NI-EMF in modulated radio frequency (RF) band at extreme low frequency, using Schliepkake`s technique and conventional parallel technique adopted in physiotherapeutical clinical procedures and extreme low frequency fields found under transmission power lines, home and labor environment, upon phagocytic activity and peritoneal macrophages adherence in rats.

Material and methods

Animals

Wistar male rats were used. They were healthy, 60 to 90 days of age, and weighed about 290g. The animal were kept in a vivarium under 23 ± 2^{0}C in dark and clear cycle of 12 hours. They were fed *ad libitum* with ration (LABINA) and water. Four days before the experiment the animals were stimulated with a 5ml peritoneal infection of sodium caseinate 6% sterile. After being weighed and anesthetized they had their medulla sectioned for the peritoneal washing procedure. The area was cleaned with iodate alcohol. Then an incision was performed on their skin at mid abdomen and 10ml of sterile saline solution was injected. After some finger massage, an incision in the peritoneal membrane, and aspiration of all liquid were performed. All the volume of the recovered exudate was quantified and centrifuged at 1500rpm for ten minutes. The cells were suspended again in 2ml sterile NaCl

0,2% for the lysis of red blood cells for two minutes. The final volume of the washing with sterile NaCl 0,9% for the another centrifugation (10 minutes/1500rpm) was recovered.

The cells were once more suspended in a complete RPMI 1640 culture (penicillin 100U/ml and streptomycin 100μg/ml-Sigma) with a volume equivalent to the total volume of the washing for counting procedure. For each animal average of 50 million macrophages were obtained , 95% of which were cells morphologically accepted by the Giemsa dying techniques, and its tested viability was always higher than 95% by the exclusion method using blue tripan.

Cell irradiation

To obtain the cultures of irradiated macrophages part of the cell suspension removed from each animal after peritoneal washing was subjected to an RF emitter. The equipment used was KLD`s DIATERMAX LM 9006 having a transmitter wave of 30MHz modulated sine-shaped in burst at extreme low frequency. Its respective parameters of exposure (table 1) with 40% emission of its total power were in accordance with the manufacturer [16]. Schliephake`s technique (consisting of spacing out the electrodes from the area 10 to 20 centimeters), conventional parallel technique (consisting of spacing out the electrodes from the area 2 a 4 centimeters) and sine-shape magnetic field of low frequency (60Hz) having a magnetic field density of 10μT (microTesla) were applied.

Table 1.

Treatment	Time (minutes)	Freq (Hz)	Vp-p	F.D.P
Control	0	0	0	0
Schliephake	15	30	7,8V	0,381μW/cm^2
Schliephake	15	50	7,8V	0,65μW/cm^2
Schliephake	15	430	7,8V	5,40μW/cm^2
Convencional	15	30	32V	6,36μW/cm^2
Convencional	15	50	32V	11μW/cm^2
Convencional	15	430	32V	91,37μW/cm^2

Scheme of irradiation for with modulated 30MHz carrier at extreme low frequency and 40% power of its total emission (100%). The electric fields generated depended on the emitted power, the distance from the emission source (electrodes), and the frequency modulation . Hertz (Hz): number of cycles per second; Vp-p: peak to peak voltage of electromagnetic wave (burst); FDP: field power density in microwatts/square centimeter. The field power density was measure out of the culture medium RPMI 1640 where the sample is. The medium conductivity is 7,64mSiemens (~164ohm), and the air resistance is about 377ohm. By using these values one noticed, by means of math calculation that resistance of the medium does not interfere in the measure field power.

The irradiated samples were placed at a fifteen-centimeter distance from the RF electrodes (average value of distances10 to 20 centimeters) Shliephake`s technique, and conventional parallel technique were placed at a three-centimeter distance from the RF electrodes (average value of distances 2 a 4 centimeters). At this position it created an alternate electrical field tension in volts. That procedure aimed to guarantee that any rise of

supplied power to the system (cells) would be exclusively dependence on the frequency and not on the increase of tension. The distance between the electrodes was thirty centimeters. The samples were kept on Styrofoam rack (expanded polyestiren, 2% polyestiren and 98% air) during exposure. The RF emitting electrodes were also fixed on Styrofoam racks. The controlling samples were kept in safe ambience away from the field emitter. Before exposure to RF a thorough scanning to map any field that might interfere with the experimental field was carried out in the ambience. We used the TRIFIELD NATURAL EM METER and a digital HEWLETT PACKARD 54600B oscilloscope. No field with sufficient intensity to interfere in the experiment was identified (ambient alternate electric field showed a 47,8 mV RMS). A HEWLETT PACKARD 54600 B digital oscilloscope coupled to an induction coil of electromagnetic field from a LOGGER MULTIMETER where there was a glass tube with the sample in it measured the electric tension produced by RF. An ANRITSU POWER METER ML4803A measured the field power density.

To obtain the irradiated macrophages by means of the sine-shaped magnetic field of extreme low frequency (60Hz) with density of magnetic flux of 10μT (microTesla) an autotransformer ATS Line of 500VA was used. The samples were set on an expanded Styrofoam rack at a distance of 11,5 cm in vertical position in relation to the emitting source of the filed for an hour. A TRIFIELD BROADBAND METER measured the magnetic field. The same safety procedure utilized for RF was taken in relation to its exposure at extreme low frequency.

Adherence index

To proceed with the experiment, macrophages removed from the peritoneal washing, irradiated or not, and separated in triples were transferred to 35mm diameter wells, in tissue cultures having 6 wells each, with 2 x 10^6 cells/ml density, in a total of 2 ml per well. They were kept in a sterilizer at 37^0C under humid atmosphere containing 5% CO_2 for 60 minutes. Then, a factor of 10μl the sample was taken to a Neubauer chamber for the counting of non-adhered cells in a solution of 1/10 in blue tripan.

The calculus of adherence index was carried out by using Segura et al`s (1997) formula.

$$AI = \frac{100 - \text{nonadherence cells} \times 100}{\text{Initial } n^0 \text{ of cells/ml}}$$

Phagocytic activity

Recovered macrophages, irradiated or not, were separated into triples, as described above. In order to evaluate the phagocytosis rate, cells in *Saccharomyces sp* suspension were used. The fungi were bathed three times in Hank`s Balance Saline solution (HBSS). Then, 10^8 UFC/ml, containing 10^6 macrophages/ml of RPMI 1640 medium were mixed in suspension.

The cells (macrophages and fungi) were distributed in optical microscopy plates and incubated at 37^0C in humid atmosphere for an hour. After that period the plates were bathed in HBSS and dried at ambient temperature and stated dyed with Diff-Quick set (Baxter Dade, Dudinen, Switzerland). The reading was performed under optical microscope with a 100x lens under immersion. The phagocytosis rate was obtained in percentage by counting the macrophages, which infiltrated the fungi with 200 cells in all.

Statistical analysis

For the comparative analysis between the control and the comparative groups for both phagocytosis and the adherence index Student`s test-t was applied.

Results

The adherence index (AI) was evaluated by the number of cells, which adhered, or not to the wells of the culture plates. The AI of the macrophages control (1) exposed to modulated RF Shliephake`s technique at 30Hz (2); 50Hz (3); 430Hz (4) and magnetic field of 60Hz (5) are shown in Fig.1. The statistical enhancement of the adherence index was detected in all the experimental groups after being exposed for 15 minutes to RF and 60 minutes to MF. The controlling average and the standard deviation of AI was 51,25%±23,86% in relation to 76,1%±8,41% for 30Hz, 83,3%±11,14 for 50Hz, 89,33%±6,07% for 430Hz and 87,35%±12,7 for 60Hz MF ($p<0,05$).

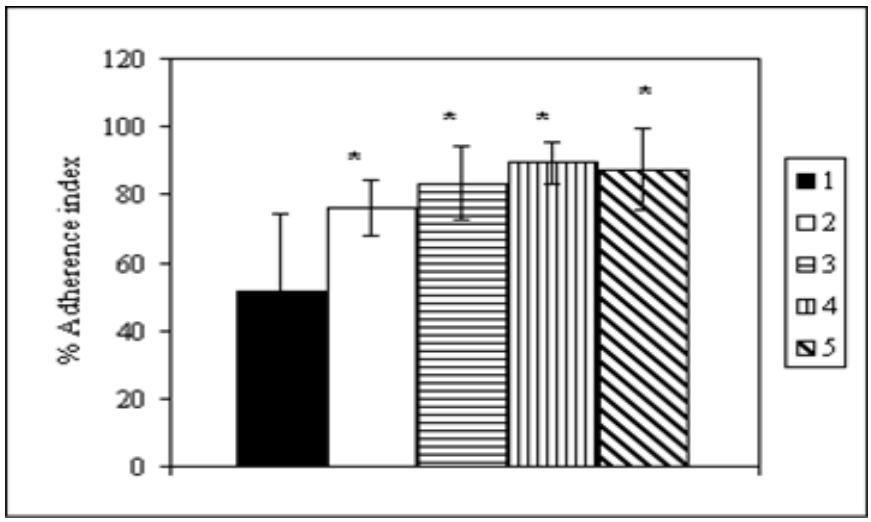


Fig. 1. Adherence index (AI) of peritoneal macrophages of rats under control (1) and exposed to modulated RF Shliephake`s technique at 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4), and 60Hz MF (5) for 15 and 60 minutes respectively. The bars represent the average and standard deviation of AI. The asterisks express the significant difference between the control ($p<0,05$).

The phagocytic activity was measured from peritoneal macrophages of rats by using *Saccharomyces sp* in the presence and absence of modulated RF Shliephake`s technique at 30Hz, 50Hz, 430Hz and 60Hz MF (Fig 2). In two groups there was a statistical decrease of the phagocytic activity, in the modulated RF at 50Hz and in the 60Hz MF, but no decrease occurred in the 30Hz and 430Hz groups after an exposure period of 15 minutes for RF and 60 minutes for MF. The controlling average and standard deviation of the phagocytic activity was 25,83%±3,66 in relation to 20,6%±6,67% for 30 Hz RF, 18,5%±5,76% for 50Hz RF, 25,25%±4,35% for 430Hz RF and 18,03%±5,33 for 60Hz MF ($p<0,05$).

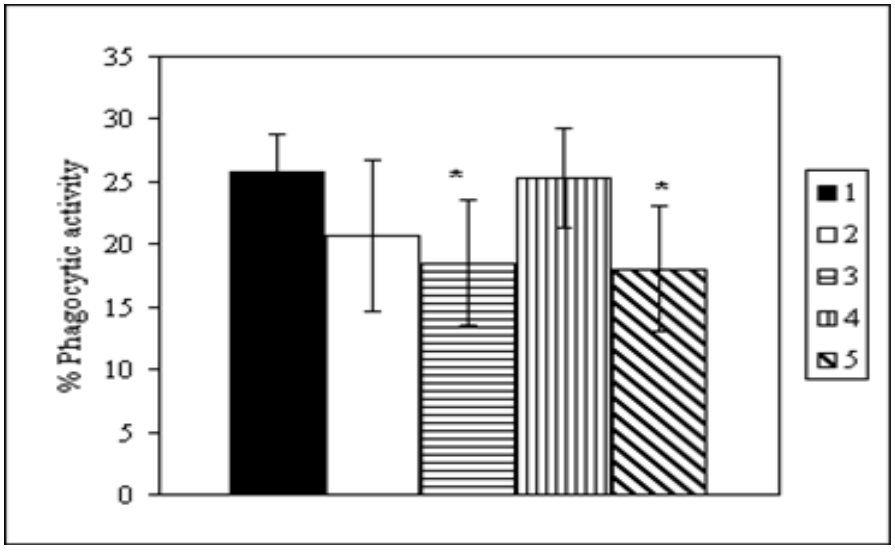


Fig. 2. Phagocytic activity of peritoneal macrophages of rats in control (1), exposed to modulated RF Shliephake`s technique at 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4), and 60Hz MF (5) for 15 and 60 minutes respectively. The bars represent the average and the standard deviation of phagocytic activity. Asterisks represent the significant difference between the control ($p<0,05$).

Conventional parallel technique was found statistical enhancement of the adherence index (IA) in all experimental groups, after 15 minutes of exposure, how shown in fig. 3. The controlling average and standard deviation of the adherence index (IA) was 53,43% ± 18,41% in relation to 77,5%±18,12 for 30Hz; 85,93%±11,72% for 50Hz and 80 ±21,54% for 430Hz ($p<0,05$).

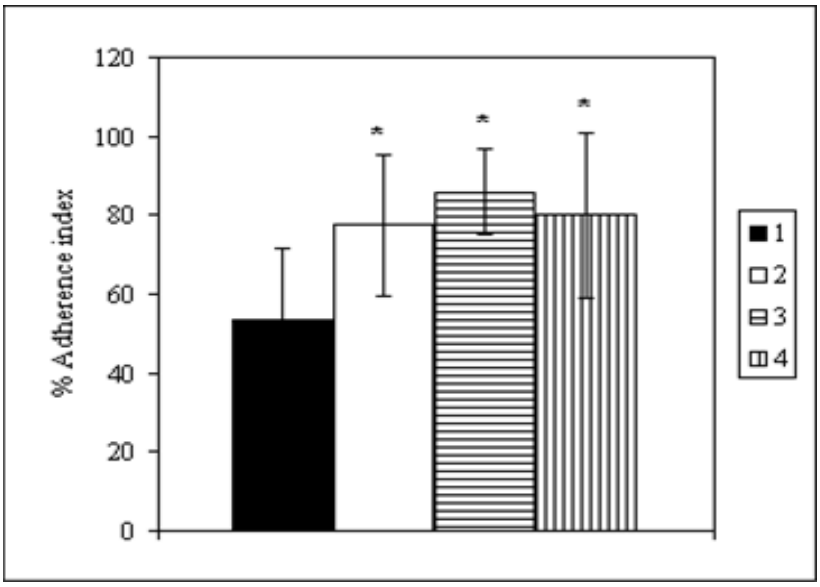


Fig.3. Adherence index (AI) of peritoneal macrophages of rats under control (1) and exposed to modulated RF conventional parallel technique at 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4),

for 15 minutes. The bars represent the average and standard deviation of AI. The asterisks express the significant difference between the control ($p<0,05$).

Phagocytic activity in conventional parallel technique was found statistical decrease of the phagocytic activity in all experimental groups, after 15 minutes of exposure how shown in fig. 4. The controlling average and standard deviation of the phagocytic activity was 24,68% ± 7,64% in relation to 13,62% ± 5,88 for 30Hz; a 13,12 ± 5,87% for 50Hz e 13,68%± 5,87% for 430Hz ($p<0,05$).

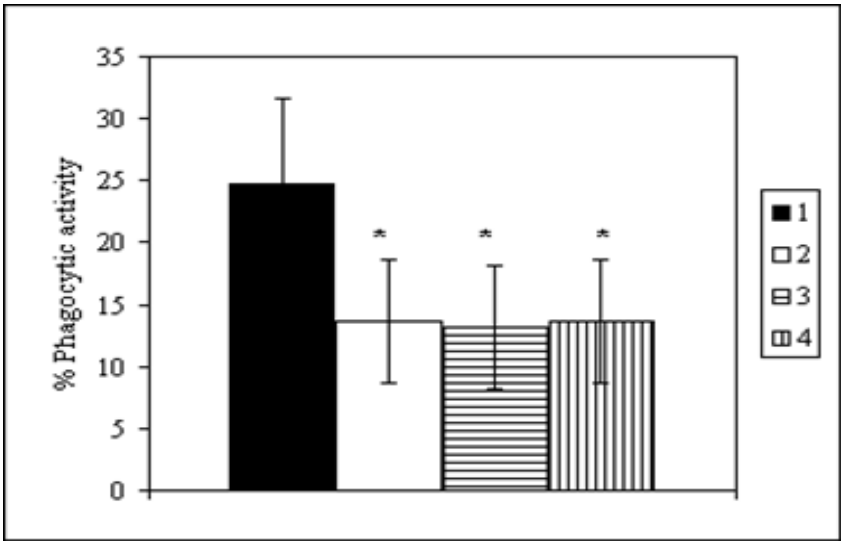


Fig. 4. Phagocytic activity of peritoneal macrophages of rats in control (1), exposed to modulated RF conventional parallel technique at 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4), for 15 minutes. The bars represent the average and the standard deviation of phagocytic activity. Asterisks represent the significant difference between the control ($p<0,05$).

Discussion

In this assay, cellular adherence of peritoneal macrophages of rats was evaluate by the adherence index (AI) after cell exposure to modulated RF fields at extreme low frequency Shliephake`s technique, conventional parallel technique and 60Hz MF. We came to the conclusion that both RF (by apllying Schliephake`s technique conventional parallel technique) and MF process significantly enhance cellular adherence after some exposure of 15 and 60 minutes respectively. Macrophages are adhered “in vitro” to certain materials such as glass and plastic [17]. This adhesion is necessary for the phagocytosis of strange particles and the migration and diapedesis, although predetermine not higher phagocytic activity by cell. It is therefore a very important stage for the development of the inflammatory reaction [18,19].

The RF field parameters used are the same as those applied in the physiotherapy practice, while those of MF can be found in working places and homes, which use electric and electronic devices.

Transmembrane protein molecules aid the adhesion mechanism. This linkage has a relatively low affinity thus compensating with a larger number of adhesion receptors on its surface, which makes it possible the exploration of its environment without losing its contact with the medium. That adhesive interaction depends on divalent ions such as calcium [20]. After its integration to the medium the internal part of the transmembrane molecule forms a protein complex of intracellular cortex. As a result, the focal contacts are formed between the cell and its extracellular medium, which will be kept active in the presence of calcium ions, therefore causing the adhesion to become stronger [20].

The modulation in the concentration of intracellular calcium as a response to EMFs has already been reported by various researchers [9,21,22,23] despite the fact that the

interaction mechanics between the field and the signaling cascades are unknown [24], and that cellular membrane is possibly the main point of interaction between EMFs and the biological system [24,25].

According to the results found in this paper, one could suggest that the modulated RF fields at extreme low frequency altered the behavior of the cellular membrane despite the little amount of energy deposited in the system (cells) an increase in cellular adhesion was set off, thus interfering in the behavior of calcium ions by means of a still unknown mechanism. The cell activation process simply carried out by the non-ionizing fields is largely discussed and some results have shown that this process is only possible in case the cell has already been pre-stimulated with some specific substance [25]. Recent results have evinced that these fields can activate the cell directly, but as referred to above, the exact mechanism of this activation remain unknown [15]. Hypothesis do exist, one of them is that the signaling chain that involves the inositol triphosphate (IP3) raised to power by the non-ionizing fields. The IP3 opens calcium channels in the endoplasmatic reticulum, thus increasing the concentration of that ion in the inner cell, and so all the processes of cellular signalizing accomplished by the calcium can set off [26].

The moment the macrophage was stimulated in contact with the plastic of the incubating plates, the prior exposure to the field acted as a co-stimulus, thus enhancing affinity by means of the interference in the calcium ions of the endoplasmatic reticulum. The extracellular area of proteins of transmembrane adhesion and the internal part which forms the protein complex linked to the action filament in the cellular cortex may possibly have had its power increased in the linking affinity.

The 60Hz MF together with 10μT density probably also interfered in the cellular membrane through Faraday`s Law which affirms that a conductor (cell) crossed by an alternate MF produces an alternate electric field of equal frequency. It was observed that even actuating with weak induced electric fields on the membrane the cell underwent some alteration as to the cellular behavior in reference to adhesion.

The response to high carrying frequency (30MHz) modulated at extreme low frequency level (30Hz, 50Hz and 430Hz) and at extreme low frequency (60Hz of MF) shows that cells responded to extreme low frequencies no matter if they were carried or not.

The possible clinical application of this cognition is that modulated RF at extreme low frequency and MF can be used on inflammation responses where those cells which make use of these adhesion resources to migrate to the area of the inflammatory nucleus become necessary. Both injure acute and chronic processes will be benefited.

In the epidemiological point of view, individuals subjected to 60Hz fields, 10μT for an hour may have their adhesive activities altered, in case that phenomenon is repeated “in vivo”, even though the consequence of it remains unknown in the long term.

As modulated RF and MF induced by a coil cause the same effect “in vitro” the study for the utilization of MF for therapeutic objectives related to injure inflammation processes may be suggested, if one respects the time interval of exposure applied and an investigation of the possible effects “in vivo”.

The phagocytic activity showed a reduction in phagocytosis, except in modulated RF at 30Hz and 430Hz Shliephake`s technique.

The macrophage physiological activation is associated to phagocytosis, which leads to a formation of species reactive to oxygen [15]. Could this activation increase phagocytosis there would be an increase in the formation of the reactive species of oxygen; in case the phagocytic activity is decreased there will be a formation of reactive species of oxygen and it drops [25]. The activation gets started through stimulus in the cellular membrane, which is transduced into the cytoplasm through cascades of cellular signaling [25]. In our particular case we used *Saccharomyces sp* yeast in order to activate the phagocytic response of the macrophages.

Activated protein kinase C starts phagocytic activation [27] being in influenced by electric and magnetic fields [28]. A decrease in the phagocytic activity with a subsequent increase of intracellular calcium levels was obtained by using continuos MF with field intensity of 250-1060 Gauss for 24 hours exposure, which interfered in the signaling cascade of protein kinase C [29]. The PKC needs calcium for its activation, as well as diacilglycerol and phosphatidilserina [30]. After activation the PKC phosphoresce specific proteins, which act in various cellular functions, thus being of great importance for the cellular response.

The difficulty to understand the cellular response to the non-ionizing fields is that it appears non-linear and non-threshold form, i.e., low intensities may have great effects, while high intensities may be unnoticed by the cell [29]. Apparently saturated cells, which are exposed to mitogen, respond with potentiality when subjected to the field, and non-saturated ones may not respond to it [29].

In this paper, the decrease in the phagocytic activity was obtained through densities of electric power field and that of very low magnetic field. Literature references say that

alterations such as those ones may be reached with fields in most strong [3,31]. Despite the low density of field generated, they all interfered in both adherence and phagocytic activity; the only ones which did not cause alterations in the phagocytic activity were those modulated at 30Hz and 430Hz Shliephake`s technique.

The cellular signaling is influenced by windows of specific field frequencies and intensities which may penetrate in accordance with the cell internal processes, thus decreasing the phagocytic activity, as it is with the referred to process above. That corresponds with “specific windows” which states that cellular mechanisms respond to EMFs through frequency, time of exposure, and specific intensity of each case under study [32,33].

That parameter of 50Hz exposure Schliephake`s technique and 30Hz, 50Hz and 430Hz conventional parallel technique is suggested to be applied in acute injure inflammatory processes so as to exert some control of it. The activated macrophages consume a great deal of oxygen, and “in vivo” activation is often associated with localized tissue destruction through free radicals of oxygen, nitric oxide (NO) and proteases [15]. Since those fields decrease the phagocytic activity but to not inhibit it, the process of phagocytosis will only happen with a smaller liberation of toxic substances in the area. It is the same with MF. The primary problem is that the latter is founding working and home environmental conditions. The exposure for an hour “in vitro” showed a decrease in the phagocytic activity, which may cause problems when exposed “in vivo”. The macrophage existing in the conjunctive tissue represents the first defensive front against infections processes [17]. In case the system may have a decrease in its activity, both external and internal infections agents may spread more easily on account of the little resistance they

might have to their spreading. In the normal physiology of macrophages various cytokines try to stint the activity modulation of these cells in order to avoid undesirable effects on the normal tissues. EMF under a certain parameter of exposure behaves like a chemical stimulus on the macrophages regulation, but its acting mechanism is still unknown [15].

One can come to the conclusion that modulated RF at 30Hz, 50Hz and 430Hz in Schliephake´s technique, conventional parallel technique and 60Hz MF with low density (10μT) enhance cellular adherence (IA). The phagocytic activity is decreased in modulated RF at 50Hz in Schliephake´s technique, modulated RF at 30Hz, 50Hz and 430Hz conventional parallel technique and in 60Hz MF. May have practical applications in acute physiological processes induced by injury, thus reducing the activity of the macrophages. The proof that 60Hz MF with low density cause alteration in the homeostasis of macrophages cells during so short a period raises some preoccupation in the studies “in vivo” in checking if the phenomenon “in vitro” is repeated. The control of electromagnetic environmental pollution is of great importance in the prevention of cellular homeostasis disturbances, and alterations in microsystems (cell) may have some influence in them (organisms).

References

1. C. Aldinucci, J.B. Garcia, M. Palmi, Sgaragli, The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function. Bioelectromagnetics.24, (2003) 373-379.

2. B.C.L.M. Koch, M. Sommarin, B.R.R. Persson, L.G. Salford, J.L. Eberhard, Interaction between weak low frequency magnetic field and cell membranes. Bioelectromagnetics. 24, (2003) 395-405.

3. J.C. Weaver, R.D. Astumian, The response of living cells to very weak electric fields: the termal noise limit. Science, 247(1990) 459-462.

4. A. Ahlbom, M. Feychting, A bayesian approach to hazard identification. The case of electromagnetic fields and cancer. Ann. NY. Acad.Sci. 895 (1999) 27-33.

5. D.C. Thomas, J.D. Bowman, L. Jiang, F. Jiang, J.M. Peters, Residential magnetic fields predicted from wiring configurations: IL relationships to childhood leukemia. Bioelectromagnetics, 20 (1999) 414-422.

6.L.S Caplan, E.R Schoenfeld, E.S O`Leary, M.C. Leske, Breast cancer and electromagnetic fields. Ann. Epidemiol. 10 (2000) 31-44.

7. R.R. Tice, G.G Hook, D.I. McRee, W.A. Guy, Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. Bioelectromagnetics. 23 (2002) 113-126.

8. National Institute of Environmental Health Science, Working Group Report: Assessment of of Health effects from exposure to power-line frequency electric magnetic fields, (Portier, CJ, Wolfe, MS eds) U.S National Institute of Health, NIH Publication (1998) No, 98-3981 (Research Triangle Park: NIEHS).

9. J. Walleczec, Electromagnetic fields effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. FASEB. (1992) 3177-3185.

10. M.A. Oroza, L. Calcicedo, F. Sánchez-Franco L. Rivas, Hormonal, hematological and serum chemistry effects of weak pulsed electromagnetic fields on rats. J. Bioelectr.6 (1987) 139-151.

11. M.A. Stuchly, J. Ruddick, D. Villeneuve, K. Robinson, B. Reed, D.W. Lecuyer, K. Tan, J. Wong, Teratological assement of exposure to time-varying magnetic field. Teratology. 38 (1988) 461-466.

12. L. Zecca, G. Dal Conte, G. Fúria, P. Ferrario,. The effect of alternating magnetic fields on experimental inflammation in the rat. Bioelectrochem. Bioenerg. 14 (1985) 39-43.

13. J. Zhou, C. Li, G. Yao, H. Chiang, Z. Chang, Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50 Hz Magnetic field. Bioelectromagnetics. 23 (2002) 339-346.

14. J.R.N. Mclean, M.A. Stuchly, R.E.J. D. Mitchel, H. Yang, M. Goddard, D.W. Lecuyer, M. Schunk, E. Callary, D. Morrison Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60Hz magnetic field: II. Tumor development and immune response. Bioelectromagnetics. 12 (1991) 273-287.

15. M. Simko, S. Droste, R. Kriehuber, D.G. Weiss Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50Hz electromagnetic fields. European Journal of cell biology. 80 (2001). 562-566.

16.KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA. Manual de Operação LM 9006. Diatermax. 1-10.

17. S.J. Noga, S.J. Normann, R.S. Weiner, Methods in laboratory investigation-isolation of guinea pig monocytes and and Kurloff cells: characterization of monocyte subset by morphology, cytochemistry, and adherence. Laboratory Investigation. 51 2 (1984) 244-252.

18. S.K. Satry, A.F, Horwitz Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra and intracellular initiated trasmembrane signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 5 (1993). 819-831.

19. C.A. Buck, A.F. Horwitz, Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. Annu. Rev. Cell. Biol. 3 (1987) 179-205.

20. C.E. Turner, K, Burridge Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interations. Curr. Opin. Cell. Biol. 5 (1991). 849-853.

21.J. Walleczek, R.P. Liburdy, Nontermal 60Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat thymocytes:dependence on mitogen activation. FEBS Lett. 271 (1990). 157-160.

22. E. Lindström, P. Lindström, A. Berglund, K.H. Mild, E. Lundgren Intracellular calcium oscilations induced in T-cell line by a weak 50 Hz magnetic. J. Cell. Physiol. 156 (1993) 395-398.

23. M. Loschinger, S. Thumm, H.P. Rodemann, Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblast populations by sinusoidal extremely low-frequency magnetic fields (20Hz,8mT) is dependent on the differentiation state of the single cell. Radiat. Res. 151 (1999) 195-200.

24. R.P. Liburdy, J. Callahan, J. Harland, E. Dunham, T.R. Sloma, P. Yaswen, Experimental evidence for 60Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade: Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. FEBS. 3 (1993) 301-308.

25. S. Roy, Y. Noda, V. Eckert, M.G. Traber, A. Mori, R.P. Lidurdy, L. Parker The phorbol 12- myristate 13 acetate (PMA) induced oxidative burst in rat peritoneal neutrophils is increase by a 0.1mT (60Hz) magnetic field . FEBS Lett. 376 (1995). 164-166.

26. K. Karimi, M.R. Lennartz, Protein kinase C activation precedes arachidomic acid release during IgG-mediated phagocytosis . J. Immunol. 155 (1995) 5786-5794.

27. A. Zheleznyak, E.J. Bronw, Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. J. Biol.Chem. 267 (1992) 12042-12048.

28. Lacy-Hulbert, A., Metcalfe, J.C., Hesketh, R. Biological responses to electromagnetic fields. *Faseb J*. 12. (1998) 395-420,.

29. D. Flipo, M. Fournier, C. Benquet, P. Roux, C. Le Boulaire, C. Pinsky, F. S. LaBella, K. Krzystyniak. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca^{2+} and functional alterations in Lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. J. Toxicol. Environ. Health. 54 (1998) 63-76.

30. A. Zheleznyak, E.J. Bronw, Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. J. Biol.Chem. 267 (1992) 12042-12048.

31. M. Feychting, Occupational exposure to electromagnetic fields and adult leukemia: a rewiew of the epidemiological evidence. FEBS Lett. 35 (1996) 237-242.

32. O. Holian, R.D. Astumian, R.C. Lee, H.M. Reyes, B.M. Attar, R.J. Walter, Protein kinase C activity is altered in HL60 cells exposed to 60Hz AC electric fields. Bioelectromagnetics. 17 (1996) 504-509.

33. G.P. Pessina, Aldinucci, Pulsed electromagnetic fields enhance the induction of cytokines by peripherical blood mononuclear cells challenged with phytohematogglutinin. Bioelectromagnetics 19 (1998) 445-451.

4.2. Segundo artigo, intitulado: Diatermia de ondas curtas pulsadas e campo magnético alternado: Interferência na adesividade e na fagocitose de macrófagos em ratos submetidos à desnutrição neonatal. Submetido a Revista de Fisioterapia da USP.

Em seqüência ao estudo apresentado no primeiro artigo, referente à influência do campo de diatermia modulado e ao campo magnético em parâmetros funcionais de macrófagos de ratos nutridos, este estudo analisa os mesmos parâmetros fisiológicos e físicos em macrófagos de animais desnutridos no período neonatal. Neste estudo foi observado que os macrófagos dos animais desnutridos e recuperados sofreram influência do campo de diatermia, nos parâmetros fisiológicos analisados, mas com a técnica diferente a qual os macrófagos dos animais nutridos responderam. O campo magnético promoveu alterações nos macrófagos de animais desnutridos.

Diatermia de ondas curtas pulsadas e campo magnético alternado: Interferência na adesividade e na fagocitose de macrófagos em ratos submetidos à desnutrição neonatal

NOME DA REVISTA

Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo

E.J.N. Montenegro[1]., P.R.T. Hirakawa[2]., M.D. Costa[3]., M.B. Pedroza[4], R.M. De Castro[5] and C.M.M.B. De Castro[6]

[1,2,4]Departamento de Fisioterapia – UFPE

[3]Departamento de Medicina – UFPE

[5]Laboratório de Fisiologia do Departamento de Nutrição – UFPE

[6]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE (LIKA) / Setor de Microbiologia Clínica

Correspondente: Célia M. M. B. de Castro

Tel.: (081) 2718486 - ramal 27, Fax: (081) 2718485

ccastro@lika.ufpe.br

Titulo resumido: Interferência na adesividade e na fagocitose de macrófagos em ratos

Resumo

Verificou-se “in vitro” o índice de aderência e a atividade fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos Wistar machos com 60 a 90 dias de vida, desnutridos e recuperados após a exposição à diatermia de ondas curtas pulsadas (DOCP) e ao campo magnético alternado em ultra baixa freqüência. Os animais foram desnutridos durante o período de aleitamento (dieta básica regional) e recuperados a partir do 21º dia de vida com ração LABINA. Foram submetidos a DOCP modulada em 30Hz, 50Hz e 430Hz na técnica de Schliephake e na técnica convencional em paralelo e a um CM de 60Hz. Aumento no índice de aderência celular só foi encontrado nos grupos experimentais de 30Hz e 50Hz na técnica de Schliephake e ao CM de 60Hz em relação ao controle ($p<0,05$). À atividade fagocítica diminuiu apenas nos grupos de 30Hz e 50Hz na técnica de Schliephake e ao CM de 60Hz em relação ao controle ($p<0,05$). A DOCP de 30Hz e 50Hz na técnica de Schliephake e o CM aumentam o índice de aderência e diminui a atividade fagocítica, podendo ter aplicações diretas em processos traumáticos agudos. Esses achados auxiliarão na escolha da modulação da DOCP durante o procedimento terapêutico, tendo em vista que esta forma de irradiação é largamente utilizada na Fisioterapia e que macrófagos de animais desnutridos e recuperados respondem a DOCP na técnica de Schliephake e a CM de 60Hz.

Descritores: campo eletromagnético, macrófago, atividade fagocítica, adesividade celular, desnutrição.

Diatermic pulsate small waves and alternate magnetic field: Interference on the adherence and macrophage phagocitosis by rats submitted to neonatal malnutrition

Abstract

The “in vitro” adherence index and phagocytic activity of peritoneal macrophages from Wistar male rats with 60 to 90 days, under malnutrition and recuperated after exposition to diatermic pulsate small waves (DPSW) and to alternated magnetic field on ultra-small frequency was evaluated. The rats were submitted for malnutrition during the nursing period and recuperated after 21 days of life using LABINA ration and then submitted to DPSW modulated in 30Hz, 50Hz and 430Hz providing the Schliephake and conventional techniques in parallel and to a CM of 60Hz. Cellular adherence index increased only with the 30Hz and 50Hz experimental groups using Schliephake technique and CM 60Hz, and phagocytic activity was reduced with 30Hz and 50Hz using Schliephake technique and CM 60Hz, compared to the control ($p<0,05$). These finds could be used to choose the ideal DPSW modulation during the therapeutic process, because these kinds of irradiation are largely used in Physiotherapy and animal macrophages of animal submitted to malnutrition responded to DPSW with Schliephake and CM 60Hz.

Key words: Animal malnutrition, cellular adhesivity, phagocytic activity electromagnetic fields, irradiation.

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[1].

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 nestas populações apresenta-se reduzida. Como conseqüência, a severidade dos processos infecciosos e a mortalidade na população mal nutrida são maiores do que na população hígida[2].

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

A deficiência de nutrientes simples como zinco, selenium, 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[5]. Estes nutrientes estão envolvidos nos efeitos regulatórios da função imune adaptativa, principalmente quando mediados por citocinas[6].

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[7]. 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[8].

A maioria dos estudos é realizada em animais desnutridos, mas que não foram recuperados totalmente ou parcialmente da desnutrição, deixando com isso, lacunas no esclarecimento sobre o comportamento do sistema imune após recuperação total ou parcial do quadro de desnutrição promovido durante este 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[9]. A desnutrição neonatal acarreta no rato adulto, seqüela duradoura na atividade funcional do macrófago alveolar[10].

A desnutrição mesmo após recuperação nutricional parece deixar seqüelas irreversíveis sobre os elementos do sistema imune, a exemplo dos macrófagos[10]. Na fisioterapia tem aumentado o emprego das irradiações eletromagnéticas em diversos tipos de tratamento, como também a exposição ocupacional e domiciliar para campos magnéticos de ultra baixa freqüência. Nos hospitais públicos atende-se diariamente, a um grande número de pacientes nos setores de fisioterapia, que utilizam este recurso. A pergunta que surge na atividade da clinica diária é: os "ex-desnutridos" respondem as terapêuticas vigentes, que não levam em conta geralmente uma eventual desnutrição pregressa?

O objetivo do nosso estudo é investigar, "*in vitr*o", os efeitos da DOCP utilizada na clínica fisioterápica, com a técnica de Schliephake e a técnica convencional em paralelo e campo magnético (CM) de ultra baixa freqüência encontrada em linhas de transmissão e ambientes de trabalho, sobre a atividade fagocítica e o índice de adesividade de macrófagos peritoniais de ratos desnutridos, durante o período de desenvolvimento do sistema imune seguido de recuperação nutricional.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com idade entre 60 a 90 dias, desnutridos, aleitados por mães submetidas à dieta nutricional deficiente (Dieta Básica Regional, vide tabela 1) durante o período de lactação, aproximadamente 24 dias pós-natal. Após o desmame os animais foram mantidos no biotério sob temperatura de 23 ± 2°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 estimulados com injeção intraperitonial de 5ml de Caseinato de Sódio a 6% estéril. Após pesagem e sedação, os animais foram sacrificados por secção medular para realização do lavado peritonial. 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 peritonial 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 2ml 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 morfologicamente aceitas pelas técnicas de coloração de Giemsa e a viabilidade testada sempre maior que 95% pela exclusão com Azul Tripan.

Tabela 1.

Composição centesimal da Dieta Básica Regional (DBR).

		Composição Centesimal					
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	198,80
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

Modificado de TEODÓSIO et al., 1990.

Irradiação das células

Para obtenção das culturas de macrófagos irradiados, parte da suspensão das células provenientes de cada animal, após o lavado peritonial, foi submetida a um campo magnético senoidal de ultra baixa freqüência (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 ultra baixa freqüência em burst (pulsos) com seus respectivos parâmetros de exposição (tabela 2), com emissão de 40% de sua potência total como indicado pelo fabricante (11) utilizando a técnica de Schliephake (que consiste em

um distanciamento dos eletrodos da área tratada de 10 a 20 centímetros) e a técnica convencional em paralelo (que consiste em um distanciamento dos eletrodos da área tratada de 2 a 4 centímetros).

Tabela 2.

Tratamento	Tempo (minuto)	Freq (Hz)	Vp-p	D.P.C
Controle	0	0	0	0
Schliephake	15	30	7,8V	0,381μW/cm^2
Schliephake	15	50	7,8V	0,65μW/cm^2
Schliephake	15	430	7,8V	6,35μW/cm^2
Convencional	15	30	32V	6,36μW/cm^2
Convencional	15	50	32V	11μW/cm^2
Convencional	15	430	32V	91,37μW/cm^2

Esquema de irradiação para DOCP com 40% de potência de sua emissão total (100%). Os campos elétricos gerados foram dependentes da potência emitida, da distância da fonte emissora (eletrodos) e da modulação da freqüência. 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 ao quadrado. 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 (~164ohm) e a resistência do ar é aproximadamente 377ohm. Com estes valores se observou através de cálculos que a resistividade do meio não interfere na potência do campo medido.

As amostras irradiadas foram colocadas a 15 centímetros de distância dos eletrodos da DOCP na técnica de Schliephake (valor médio das distâncias de 10 a 20 centímetros) e na técnica convencional em paralelo foram colocadas a 3 centímetros de distância do eletrodo (valor médio das distâncias de 2 a 4 centímetros) que nesse local gerou uma tensão de campo elétrico alternado em Volts. A tensão do campo elétrico gerado pela DOCP foi medida através do 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 freqüência e não do aumento de tensão. À distância entre os eletrodos foi de 30 centímetros. 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 efetuado 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 um osciloscópio digital marca HEWLETT PACKARD 54600B. Não foi, portanto, identificado nenhum campo com intensidade suficiente para interferir no experimento (campo elétrico alternado ambiental foi de 47,8mV). A densidade da potência do campo foi medida pelo equipamento ANRITSU POWER METER ML 4803A.

Para obtenção dos macrófagos irradiados com o campo magnético senoidal de ultra baixa freqüência (60 Hz) com densidade de fluxo magnético de 10μT (microTesla), 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 freqüência.

Índice de aderência

Para o experimento, macrófagos provenientes do lavado peritonial 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 10^6células/ml com total de 2 ml por poço. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO_2 por 60 minutos. Em seguida, alíquotas de 10μl 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, 1997.

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

Atividade fagocítica

Macrófagos recuperados do lavado peritonial 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, 10^8 fungos/ml foram misturados em suspensão, contendo 10^6 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 e secadas a temperatura ambiente. Coradas com Diff-Quik set (Baxter Dade, Düdinen, Switzerland). A leitura foi feita em microscópio óptico, com objetiva de 100X sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida, em percentual, através da contagem de macrófagos que fagocitaram o fungo, em um total de 200 células.

Analise estatística

Para analise comparativa entre o grupo controle e o grupo experimental, tanto para a fagocitose e quanto para o índice de aderência, foi utilizado o Teste-t de Student.

Resultados

O índice de aderência (IA) foi avaliado através da contagem de células que aderiram ou não, a superfície dos poços nas placas de cultura. O IA dos macrófagos controle (1) e expostos a DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultra baixa de 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4) e campo magnético de 60Hz (5) são apresentados na Fig 1. O aumento significativo no índice de aderência foi detectado nos grupos experimentais na técnica de Schliephake de 30Hz e 50Hz e no CM de 60Hz após um período de exposição de 15 minutos para a DOCP e 60 minutos para o CM. O grupo experimental de 430Hz não apresentou aumento no índice de aderência. A média e o desvio padrão do IA no controle foi de 54,13 ± 4,86 em relação a 71,7 ± 9,54 para DOCP de 30Hz, 68,86 ± 6,64 para DOCP de 50Hz, 64,28 ± 16,09 para DOCP de 430Hz e 73,86 ± 13,56 para CM de 60Hz ($p<0,05$).

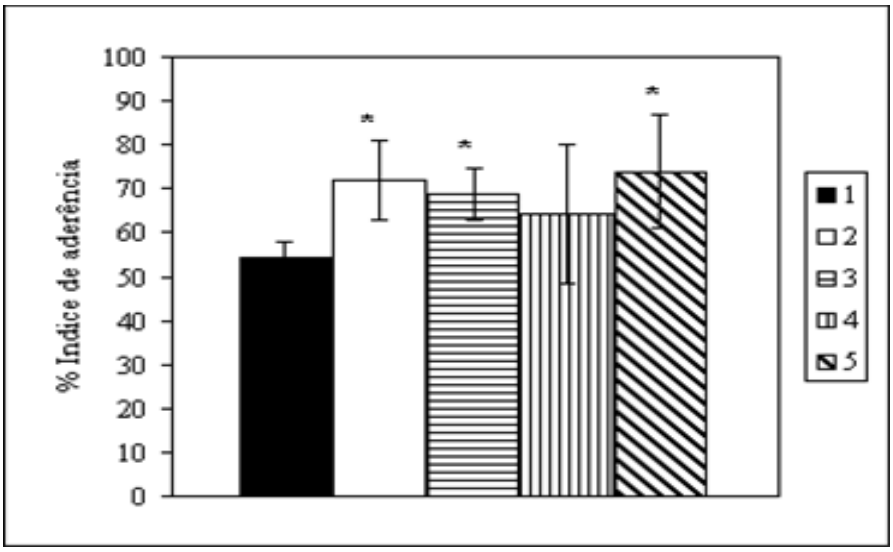


Fig. 1. Índice de aderência (IA) de macrófagos peritoniais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1) e expostos a DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultra baixa de 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4) e CM de 60Hz (5) expostos por 15 minutos na DOCP e 60 minutos no CM. As barras representam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

A atividade fagocítica foi medida a partir do contato de macrófagos peritoniais de ratos com *Saccharomyces sp* na presença ou na ausência da DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultra baixa de 30Hz, 50Hz, 430Hz e CM de 60Hz (Fig.2). Ocorreu diminuição em termos estatísticos na atividade fagocítica nos grupos da DOCP em 30Hz e 50Hz e no CM de 60Hz, mas não ocorreu diminuição no grupo de 430Hz após um período de exposição de 15 minutos para a DOCP. A média e o desvio padrão da atividade fagocítica no controle foi de 22,75 ± 2,18 em relação a 11,83 ± 2,16 para DOCP de 30Hz,

11,75 ± 2,40 para DOCP de 50Hz, 21,83 ± 0,98 para DOCP de 430Hz e 9,75 ± 1,4 para CM de 60Hz ($p<0,05$).

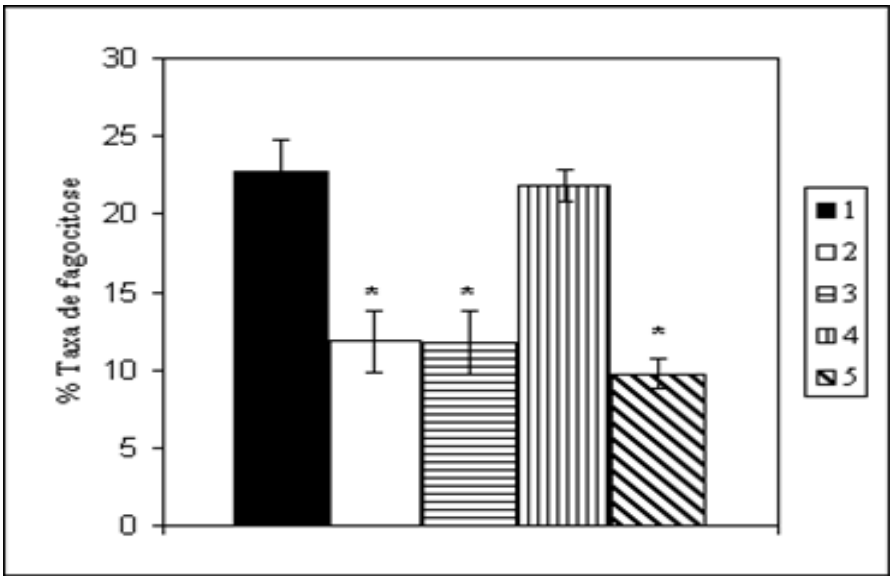


Fig.2. Atividade fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1), expostos a DOCP na técnica de Schliephake com modulação ultra baixa de 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4) e CM de 60Hz (5) expostos por 15 minutos na DOCP e 60 minutos no CM. As barras representam a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

O IA dos macrófagos controle (1) e expostos a DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultra baixa de 30Hz (2), 50Hz (3) e 430Hz (4) são apresentados na Fig 3. Nenhum efeito significativo foi observado no índice de aderência nos grupos experimentais de 30Hz, 50Hz e 430Hz após um período de exposição de 15 minutos. A média e o desvio padrão do IA no controle foi de 52,14 ± 3,93 em relação a 56,07 ± 10,59

para DOCP de 30Hz, 57,85 ± 9,06 para DOCP de 50Hz, 56,42 ± 6,26 para DOCP de 430Hz (p>0,05).

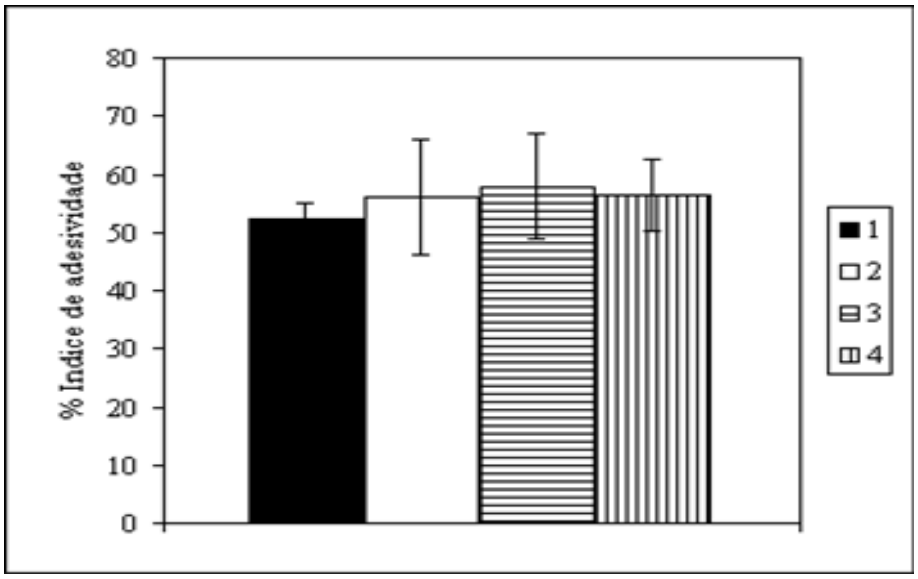


Fig.3. Índice de aderência (IA) de macrófagos peritoniais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1) e expostos a DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultrabaixa de 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4) expostos por 15 minutos. As barras representam a média e o desvio padrão do IA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

Nenhum efeito significativo foi observado também na atividade fagocítica nos grupos da DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultra baixa de 30Hz, 50Hz e 430Hz, 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 ± 3,59 em relação a 20,85 ± 4,59 para DOCP de 30Hz, 22,28 ± 3,19 para DOCP de 50Hz, 22,71 ± 4,99 para DOCP de 430Hz (p>0,05).

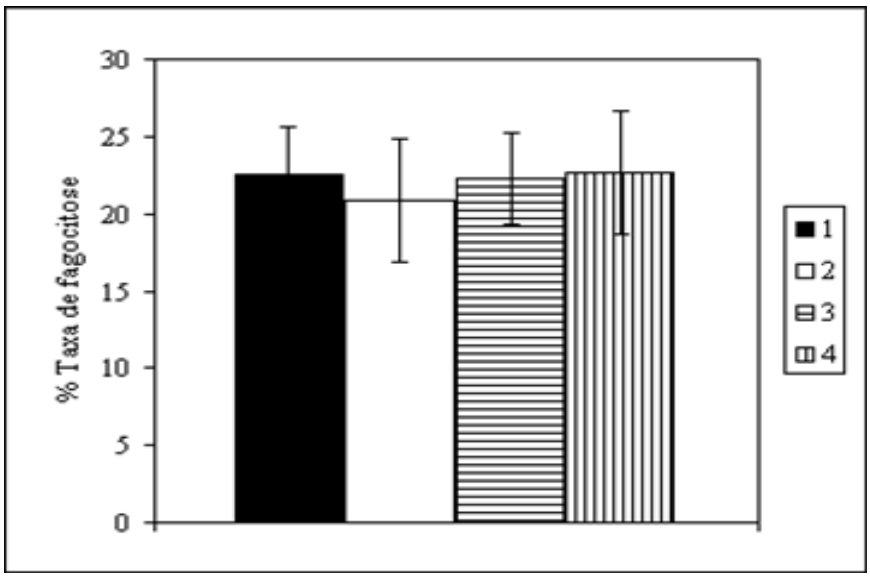


Fig.4. Atividade fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos desnutridos e recuperados, no controle (1), expostos a DOCP na técnica convencional em paralelo com modulação ultra baixa de 30Hz (2), 50Hz (3), 430Hz (4) expostos por 15 minutos. As barras representam a média e o desvio padrão da atividade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

DISCUSSÃO

Nesse estudo a adesividade celular de macrófagos peritoniais de ratos foi avaliada através do índice de aderência (IA), após a exposição das células dos animais desnutridos e recuperados da desnutrição, aos campos de DOCP e CM de 60Hz. Nós observamos o aumento da adesividade celular após um tempo de exposição de 15 minutos para as freqüências moduladas em ultra baixa freqüência de 30Hz e 50Hz na técnica de Schliephake e de 60 minutos para os CM de 60Hz, cujos parâmetros são utilizados na prática fisioterápica e encontrados em ambientes de trabalho respectivamente. Os campos de DOCP modulados em freqüência ultra baixa de 30Hz, 50Hz e 430Hz na técnica convencional em paralelo e de 430Hz na técnica de Schliephake não alteraram a adesividade celular.

A desnutrição energética protéica modifica tanto a resistência especifica como a não especifica do organismo para agentes infecciosos[1].

Os macrófagos são reconhecidos pela sua atuação na defesa contra a invasão do organismo por antígenos estranhos. Estas células podem migrar para o interstício do foco de reação após aderir às células endoteliais[12]. A desnutrição energética protéica altera este mecanismo reduzindo a expressão de moléculas de adesão e a ativação de macrófagos[12,13,14]. Podendo assim, interferir de forma negativa no mecanismo de sinalização celular dos macrófagos como o fluxo de cálcio e a fosforilação das proteínas quinases[15]. Além disso, a atividade da cadeia transportadora de elétrons é drasticamente reduzida na desnutrição ocorrendo menor produção de ATP para as células[15]. O ATP tem como principal função fornecer energia para o equilíbrio entre o processo de fosforilação e desfosforilação de proteínas especifica na sinalização celular[16].

A interação adesiva é mediada por moléculas protéicas transmembranares dependentes ou não dos íons cálcio. As moléculas adesivas dependentes de cálcio apresentam fortalecimento na adesão quando em presença deste íon[17]. Moléculas independentes de cálcio são eletronegativas (ácido siálico) e quanto maior for essa eletronegatividade, menor será à força de adesão. Caso essas moléculas se tornem menos eletronegativas o processo de adesão é fortalecido[18]. Estudos da dinâmica de adesão celular demonstraram que este tipo de interação responde pelas leis que regem as atividades enzimáticas tendo sua velocidade diminuída, na presença de baixas temperaturas [19].

Os campos eletromagnéticos alteram não só a concentração do cálcio intracelular como também, interfere na atividade enzimática das células imunes[21]. Este efeito pode

interferir na sinalização e no comportamento celular, mecanismo ainda não totalmente compreendido[20].

Através dos resultados deste trabalho, sugere-se que a DOCP com a potência e a freqüência modulada de 30Hz e 50Hz na técnica de Schliephake e o CM de 60Hz entraram em ressonância com o sistema (células) deflagrando aumento da adesividade celular interferindo no comportamento do cálcio. Nesse trabalho os animais foram submetidos a uma desnutrição severa, durante o período de formação do sistema imune e foram recuperados após essa fase. Apesar da desnutrição energética protéica promover eventos como: desarranjo na expressão de moléculas de adesão[12,13,14], redução da ativação de macrófagos, interferência na sinalização intracelular dos macrófagos[15], os campos eletromagnéticos, neste trabalho, aumentaram o índice de aderência que em parte, está diretamente relacionado com os íons cálcio fortalecendo este fenômeno celular. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não é conhecido.

A adesividade celular não sofreu influência da DOCP na técnica convencional em paralelo na modulação nas freqüências ultra baixa de 30Hz, 50Hz e 430Hz, como também não sofreu influência na técnica de Schliephake na freqüência ultra baixa de 430Hz. Isso sugere que a potência de densidade do campo, que em parte foi dependente da freqüência modulada, não se encontra na faixa de janela especifica do sistema celular. Deve ser observado que a DOCP de 430Hz na técnica de Schliephake gerou uma densidade de potência no local das amostras de 6,35μW/cm^2 coincidente com a potência gerada na DOCP de 30Hz com a técnica convencional em paralelo (6,36μW/cm^2). Nesse trabalho, os animais foram submetidos à desnutrição severa durante o período de formação do sistema imune e recuperado em seguida. Nesta situação são inexistentes os estudos conclusivos

determinando quanto é recuperado a nível celular. 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 este processo só é possível caso a célula já tenha sido pré-estimulada com alguma substância[22]. Resultados recentes apresentam evidências que estes campos podem ativar a célula de forma direta[23,24], mas como já comentado acima, o mecanismo exato desta ativação permanece desconhecido[20,23]. 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 reticulo endoplasmático, elevando a concentração deste íon no interior da célula deflagrando assim, todos os processos de sinalização celular promovido pelo cálcio[25].

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, através da interferência nos íons cálcio.

A provável aplicação clínica deste conhecimento é que 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 este fenômeno quando instalado crônicamente não é benéfico para o organismo, pois está ligado a formação de aterosclerose[26]. A utilização deste tipo de irradiação (DOCP) deve ser por tempo relativamente curto e a análise efetuada foi após uma hora da irradiação “in vitro” não se sabendo então como esse processo se comporta após tempo mais longo. Com o CM de

60Hz o período de exposição de 60 minutos foi suficiente para deflagrar o mesmo processo. A preocupação inicial a este tipo de irradiação é que ela é encontrada em ambientes de trabalho industrial que utilizam equipamentos elétricos, por um período de até oito horas diária[27].

A atividade fagocítica demonstrou uma redução após a exposição a DOCP modulada em freqüência ultra baixa na técnica de Schliephake de 30Hz e 50Hz e ao CM de 60Hz. A ativação fisiológica do macrófago está associada à fagocitose e aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio. Caso contrário, se a atividade fagocítica está reduzida a formação de espécies reativas de oxigênio decai[22]. A ativação é deflagrada através de estímulos na membrana celular que é transduzida para o interior citoplasmático através das cascatas de sinalização celular[28]. No caso particular do nosso trabalho foi utilizada a levedura *Saccharomyces sp* para ativar a resposta fagocitária dos macrófagos.

Macrófagos obtidos de animais com deficiência energética protéica, de vitamina D3 e A, apresentaram baixa atividade fagocítica e anti-tumoral[29,30,31]. A associação entre a deficiência nutricional e aumento na susceptibilidade para as doenças infecciosas já é bem conhecido[32]. Uma diminuição na atividade fagocítica com aumento nos níveis de cálcio intracelular foi conseguida com campo magnético contínuo[33] e com microondas de baixíssima intensidade[34].

As variações nos níveis do íon cálcio intracelular promove alterações tanto estimulatórias como inibitórios nas células do sistema imune[35]. Os dados experimentais levam a crer que, campos eletromagnéticos aumentam a permeabilidade da membrana citoplasmática para íons cálcio através dos canais de cálcio, podendo também inibir o efluxo desse íon para o exterior da célula. A reserva de cálcio no reticulo endoplasmático é

liberada através de mensageiros celulares e a própria captação para o interior do reticulo endoplasmático pode ser alterado pelos campos eletromagnéticos, com isso, mantendo as concentrações do íon elevadas no citosol[36].

Cátions divalentes como o cálcio, foram identificados como sendo um dos fatores mais importantes para influenciar a fagocitose. O aumento intracelular está associado com a diminuição da fagocitose de partículas estranhas[37,38].

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[33]. A adesividade celular e a atividade fagocítica dos macrófagos dos animais desnutridos e recuperados, estudados em nosso trabalho, foram alteradas com campos que apresentaram uma menor densidade de potência de energia (30Hz e 50Hz na técnica de Schliephake e CM de 60Hz) em relação a campos com maiores densidades (430Hz na técnica de Schliephake e 30Hz, 50Hz e 430Hz na técnica convencional em paralelo).

Os macrófagos residentes dos tecidos conjuntivos representam a primeira linha de defesa contra processos infecciosos[9]. Caso o sistema tenha sua atividade diminuída, agentes externos como internos podem proliferar-se com maior facilidade, pois encontraria pouca resistência ao seu avanço, isto nos trás uma preocupação quanto à exposição do terapeuta e do trabalhador para campos desta ordem, por tempo indeterminado. Pacientes que sofreram desnutrição durante a fase critica de desenvolvimento do sistema imune poderá naturalmente apresentar diminuição na atividade fagocítica que poderá ser potencializada pela aplicação da DOCP ou da exposição ao CM de 60Hz.

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Keusch, G.T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutri*., 133: 336S-340S, 2003.

2. Moore, S.E.,Goldblatt, D.,Bates, C.J., Prentice, A.M. Impact of nutritional status on antibody responses to different vaccines in undernourished Gambian children. *Acta.Paediatr*., v.92, p.170-176, 2003.

3. Chandra, R.K. Nutrition, immunity and infection from basic kwowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc. Natl Acad Sci*, USA, 93:14307-7, 1996.

4. Chandra, R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr*. 3:S73-6, 2002.

5. Chandra, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr*. 66: 460S-3S, 1997.

6. Cunningham, R.S., Ahrn, S., Abuav, N.R., Dnistrian, A. Development of immunicompetence:role of micronutrients an microorganisms. *Nutr Rev*, 60: S68-72, 2002.

7. Homo, D. F., Dardene, M. The neuroendocrine-immune axis. *Springer Seminary Immunopathology*, 14: 221-238, 1993.

8. Bockman, D. E., Kirby, M. L. Dependence of thymus development on derivates of the neural crest. *Science*, 233:498, 1984.

9. Celada, A., Nathan, C. Macrophage activation revisited. *Immunol. Today*, 15, 100-102, 1994.

10. De Castro, C.M.M.B., De Castro, R. M., De Medeiros, A. F., Santos , Q., Silva, W. T. F.E. Effect of stress on the production of O^{-2} in alveolar macrophages. *J. Neuroinmunol*, 108, 68-72, 2000.

11. KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA. Manual de Operação LM 9006. Diatermax. 1-10.

12. Fukatsu, K., Hiraide H. Role of polymorphonuclear neutrophils and macrophages in prevention of postoperative infections. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 104: 506-10, 2003.

13. Machaiah, J.P. Effects of protein restriction on functional properties of rat peritoneal macrophages. *Indian J Exp Biol*, 29: 468-73 1994.

14. McCarter, M. M., Naama, H.A., Shou, J., Kwi, L. X., Evoy, D. A., Calvano, S. E., Daly, J.M. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein calorie malnutrition. *Cell Immunol*, 183:131-6, 1998.

15. Briet, F., Twomey, C. Jeejeebhoy, K.N. Effect of malnutrition and short-term refeeding mononuclear cell mitochondrial complex I activity in humans. *Am. J. Clin. Nutr*. v. 77., p.1304-1311, 2003.

16. Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochrondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol*. v. 122. p. 1-63, 1990.

17. Eliana, M. C., Nicolleta, D. R., Emillia, S., Ugo, T., Giovanna, M., Angela, B. STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesión molecules. Intern Immunol, 11, 7, 1075-1083, 1999.

18. Anderson, J. M., Balda, M. S., Fanning, A.S.,. The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell*, 5: 772-778, 1993.

19. Ueda, M. J. Ito, T.,Ohnishi, S., Okada, T.S. Phagocytosis by macrophages. I. Kinetics of adhesion between particles and phagocytes. *J Cell Sci*, 51:173-88, 1981.

20. Pira, E. Biological effects of exposure to electromagnetic fields: introduction. *G Ital Med Lav Ergon*, 25: 362-3, 2003.

21. Jirillo, E., Altamura, m., Casale, D., Pepe, T., Venecia, F.P., Soleo, L., L`Abate, N., Raino, A., Stefanelli, R. Effects of function of human lymphocytes exposed electromagnetic fields with a frequency from 1500 to 2000MHz. *G Ital Med Lav Ergon*, 25:369-70, 2003.

22. Roy, S., Noda, Y., Eckert, V., Traber, M.G., Mori, A., Liburdy, R.P., Packer, L. The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induced oxidative burst in rat peritoneal neutrophilis is increased by a 0.1mT (60Hz) magnetic field. *Febs Lett*. 376 p. 164-166, 1995.

23. Simko, M., Droste, S., Kriehuber, R., Weiss, D.G. Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50Hz electromagnetic fields. *European Journal of Cell Biology*. 80 p. 562-566 2001.

24. Tokalov, S.V., Gutzeit, H.O. Weak electromagnetic fields (50Hz) elicit a stress response in human cells. *Environ Res*, 94: 145-51, 2004.

25. Lacy-Hulbert, A., Metcalfe, J.C., Hesketh, R. Biological responses to electromagnetic fields. *Faseb J*. 12. 395-420, 1998.

26. Liyama, M., Shimada, Y., Kita, T., Ito, H. Effect of aging on macrophage adherence to extracellular matrix proteins. *Mech Ageing Dev*, 66:149-58, 1992.

27. Tenford, S. T. The worders of magnetism. Bioelectromagnetics, 24:3-11, 2003.

28. Karimi, K., Lennartz, M.R. Protein kinase C activation precedes arachidomic acid release during IgG-mediated phagocytosis . *J. Immunol*. 155 p. 5786-5794 1995.

29. Papadimitriou, J. M., Van, B. I. The effects of malnutrition on murine peritoneal macrophages. *Exp Mol Pathol*, 49: 161-70, 1988.

30. Takeda, E., Takata, K., Yamahaka, H., Taketami, Y., Morita, K., Miyamoto, K., Shono, M., Teshima, S., Rokutan, K. Vitamin D3 elicits calcium response and activates blood monocyte-derived macrophages from pacients with vitamin D dependent rickets type II. *FEBS Lett*, 396: 157-60, 1996.

31. Twining, S. S., Schulte, D.P., Wilson, P.M., Fish., Moulder, J. E. Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J. Nutr*, 558-65, 1997.

32. Moore, S.E., Goldblatt, D., Bates, C.J., Prentice, A.M. Impact of nutritional status on antibody responses to difference vaccines in undernourished Gambian children. *Acta Paediatr*, 92: 170-6, 2003.

33. Flipo, D., Fournier, M., Benquet, C., Roux, P., Le Boulaire, C., Pinsky, C., Labella, F. S., Krzystyniak, K. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca^{2+} and functional alterations in Lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. *J. Toxicol. Environ. Health*. 54 p. 63-76 1998.

34. Valentina, G.S., Gabdoulkhakova, A. G., Santalov, B. F. Immunimodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. Bioelectromagnetics 23:599-606, 2002.

35. Krieger, J. A., Born, J. L., Burchiel, S.W. Persistence of calcium elevation in the HPB-ALL human T cell line correlates with immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. v. 127. p. 268-274, 1994

36. Carson, J. J., Prato, F. S., Drost, D. J., Diesbourg, L.D., Dixon, S.J. Time-varying magnetic fields increase cytosolic free calcium in cell HL-60 cells. *Am. J. Physiol*. v. 28. p. 687-692, 1990.

37. Parod, R. J., Brain, J. D. Uptake of latex particles by pulmonary macrophages: Role of calcium. *Am. J. Physiol*. v. 14. p. 227-234, 1983.

38. Safronova, V. G., Gabdoulkhakova, A. G., Santalov, B.F. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*. v. 23. p. 599-606, 2002 .

DISCUSSÃO GERAL

5.- DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os CEM de RF modulada (DOCP) e o CM, ambos em ultra baixa freqüência, interferiram na atividade fagocítica e na adesividade de macrófagos peritoneais de ratos machos Wistar tanto nutridos como nos desnutridos e recuperados da desnutrição. A interferência foi dependente da técnica utilizada. Nos macrófagos dos animais nutridos a irradiação pela técnica de Schliephake com as freqüências moduladas de 30Hz, 50Hz e 430Hz e o CM de 60Hz aumentaram o índice de aderência celular, porém, só ocorreu diminuição na atividade fagocítica, na freqüência de 50Hz e no CM de 60Hz. Na técnica convencional em paralelo o índice de aderência foi aumentado e a atividade fagocítica foi reduzida em todas as freqüências estudadas (30Hz, 50Hz e 430Hz). O que diferencia uma técnica da outra, utilizando a mesma potência de saída do equipamento é a densidade de potência do campo que esta relacionada, nesse caso, com a distância das amostras em relação à fonte emissora.

Nos macrófagos dos animais desnutridos e recuperados a técnica de Schliephake com as freqüências moduladas de 30Hz e 50Hz e o CM de 60Hz aumentaram o índice de aderência celular e reduziram a atividade fagocítica, o que não ocorreu com a freqüência de 430Hz na técnica de Schliephake e na técnica convencional em paralelo (30Hz, 50Hz e 430Hz).

Os CEM que interferiram na atividade fagocítica também o fizeram na adesividade celular, já na adesividade tal interferência não necessariamente influenciou a atividade fagocítica. Esse fenômeno pode ter ligação com a concentração de cálcio intracelular ou de

como o cálcio é direcionado nas suas funções de segundo mensageiro dentro da célula por influência dos CEM externos.

O índice de aderência e a atividade fagocítica entre os macrófagos de animais nutridos e desnutridos e recuperados apresentaram resultados opostos quanto à técnica utilizada. Nos nutridos a técnica de maior influência foi a convencional em paralelo enquanto que nos desnutridos e recuperados foi a de Schliephake. Como a potência do campo foi fixada em 40% da emissão total (100%) a densidade de potência do campo foi dependente da freqüência modulada e da distância entre os eletrodos e a amostra. Os macrófagos dos animais nutridos responderam a maiores densidades de potência, em contra partida, os desnutridos e recuperados responderam a densidades com menores potências. Não sabemos ainda porque isto ocorre. Hipótese pode ser levantada. Como a desnutrição energética protéica altera o mecanismo de expressão de moléculas de adesão (FUKATSU e HIRAIDE, 2003; MACHAIAH, 1994), diminuindo a expressão destas moléculas (McCARTER et al, 1998), enfraquecendo o potencial de ativação dos macrófagos e interferindo no mecanismo de sinalização celular como o fluxo dos íons cálcio e a fosforilação das proteínas quinases (BRIET, 2003), estas alterações predeterminaram uma janela especifica de resposta aos CEM diferentes do encontrado nos animais nutridos.

O processo de sinalização intracelular desencadeado após ligação de moléculas a receptores na membrana celular ou a mudanças conformacionais por parte desses receptores, gera uma cascata de sinalização composta por íons e moléculas como proteínas G triméricas, fosfolipases, fosfoinositol bifosfato, inositol trifosfato, diacilglicerol, PKC, quinase A, AMPc, adenilciclase, proteinofosfatases, cam-quinase, complexo cálcio-

calmodulina, GTP, GDP, ATP e processos de fosforilação e desfosforilação envolvendo trocas energéticas (ALBERTS et al, 1997). Todas as moléculas possuem cargas elétricas positivas, negativas ou neutras (HEWITT, 2002). Quando submetidas a um CEM externo irão responder de forma particular dependendo do campo interno e externo. Como as próprias moléculas ao se deslocarem no espaço (citoplasma) geram pequenos campos eletromagnéticos, estes irão interagir com o campo externo aplicado. Com as variações moleculares internas nos nutridos e desnutridos abre-se, teoricamente, janelas diferentes de interação de campo.

O biomagnetismo é ciência que estuda a formação desses campos eletromagnéticos pelo sistema biológico, já sendo possível a captação destes campos formados pela atividade elétrica do cérebro (magnetoencefalograma), olho (magnetoretinograma), coração (magnetocardiograma), estômago (magnetogastrograma) e o coração fetal (magnetocardiograma fetal). A medição como pode ser visto acima se dá em órgãos, que nada mais são, que um grupamento de milhões de células com todos os seus campos eletromagnéticos somados. É apenas questão de tempo para que os campos sejam medidos diretamente na célula individual (MALMIVUO e PLONSEY, 1995). A magnetobiologia que é o estudo das conseqüências da interação dos CEM externos com o sistema biológico, poderá se somar com o biomagnetismo formando uma nova linha de pensamento cientifico (FREY, 1995; MALMIVUO e PLONSEY, 1995).

As células do sistema imune são utilizadas como meio sensitivo para detecção dos efeitos dos CEM tanto na ciência básica como para aplicação clínica (BERSANI, et al 1989). Na fisioterapia há um grande interesse na compreensão básica dos efeitos dos

recursos eletrotermofototerápicos em processos patológicos, como por exemplo, nas inflamações.

A defesa tecidual inicial contra uma infecção ou lesão traumática consiste em duas linhas de proteção que caracterizam a defesa inata não-induzida sendo considerada uma resposta pré-inflamatória. Após a invasão ou lesão inicial do tecido conjuntivo, os microrganismos e/ou tecidos lesionados são imediatamente combatidos por macrófagos teciduais residentes (fagocitose) e pelo sistema complemento, ativado por uma via independente de anticorpos. A ativação do complemento e a ação dos macrófagos residentes ocorrem nas primeiras horas após a infecção ou lesão local. Se os microrganismos ou os tecidos lesionados não forem controlados nesta etapa de defesa inicial, uma segunda via de resposta é induzida visando conter o processo infeccioso ou de células degeneradas chamada de resposta inflamatória aguda ou defesa inata induzida (ABBAS et al, 2000).

A resposta inflamatória aguda consiste na resposta dos macrófagos a infecção ou a lesão, secretando uma gama variada de mediadores químicos, tais como: IL-1, IL-6, IL-8, 1L-12, TNF-α, prostaglandinas, leucotrienos e radicais livres de oxigênio. A ativação do complemento gera compostos vasoativos, como o C3a e C5a. Os efeitos combinados destes mediadores resultaram no desenvolvimento da resposta inflamatória (SIQUEIRA e DANTAS, 2000).

A inflamação pode ser também definida como uma reação da microcirculação induzida por uma agressão aos tecidos, com a conseqüente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular. Ela é caracterizada por alterações no calibre vascular, com conseqüente aumento no fluxo sangüíneo; alterações estruturais nos componentes da microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e na saída de células e moléculas dos vasos para os tecidos; migração de células de defesa e acúmulo no espaço extravascular, onde ocorre a lesão. Neutrófilos são os principais combatentes em um local acometido por inflamação aguda seguidos por monócitos que deixam a corrente sangüínea e, ao adentrarem nos tecidos, diferenciam-se em macrófagos, que atuaram no local acometido pela inflamação. Os neutrófilos respondem à quimiotaxia de substâncias liberadas no local da lesão induzida pelos microorganismos ou tecido degenerado, ativando receptores de alta afinidade para peptídeos bacterianos e de IL-8 liberada pelo macrófago (SIQUEIRA e DANTAS 2000).

O papel da inflamação consiste em conter e isolar a lesão, destruir os organismos invasores, inativar as toxinas e iniciar o processo de cura e reparo. Todavia, a inflamação e o reparo podem ser potencialmente nocivos, causando reações de hipersensibilidade que ameaçam a integridade do indivíduo, bem como lesão progressiva e fibrose de estruturas. A intensidade do processo inflamatório é comumente proporcional ao grau de lesão tecidual (FREIRE, 2001).

Na clinica fisioterápica é largamente utilizada a crioterapia (imersão na água a 4^0C, *sprays* vaporizadores a 2^0C e bolsas de gelo a 0-3^0C) para combater os efeitos fisiológicos iniciais da inflamação aguda (sinais cardeais). Esses sinais são calor, rubor, tumor, dor e

perda de função. O calor é promovido pelo aumento da temperatura local devido a vasodilatação, o rubor é a aparência avermelhada na região também produzida pela vasodilatação, o tumor é provocado pelo aumento na permeabilidade vascular, a dor deve-se à ação direta de mediadores químicos sobre fibras nervosas e/ou devido ao aumento de permeabilidade vascular. O edema tecidual comprime as terminações nervosas livres, sendo a principal causa de dor associada à inflamação na maioria dos tecidos e a perda de função em conseqüência a tumefação e dor, os tecidos afetados perdem as suas funções normais (GUIRRO e MAXIMO 1999).

A aplicação crioterápica é efetuada logo após a lesão traumática da articulação e dos tecidos circunjacentes, ou seja, minutos após o trauma. Mas nessa fase as células responsáveis pela defesa inata não induzida são os macrófagos residentes e o sistema de complemento ativado por via independente de anticorpos que irão fagocitar as células danificadas, que dependendo do grau (extensão) da lesão não necessitará induzir a resposta inflamatória aguda. Caso a lesão seja extensa (perda imediata da função articular provocada pela dor), será deflagrada a resposta inflamatória aguda promovida pelo macrófago, sistema complemento e pelas substâncias quimioatrativas dos tecidos lesionados. A crioterapia nessa fase irá reduzir potencialmente os efeitos da inflamação aguda (sinais cardeais) promovendo grande alivio para o paciente. Contudo a queda da temperatura local irá retardar o processo básico de regeneração tecidual (ROSA et al, 2002). Em lesões com graus menores (sem perda da função articular e pequena dor localizada) não se sabe ainda as conseqüências desse procedimento crioterápico na formação da resposta inflamatória aguda (ROSA et al, 2002). Estes estudos são realizados em organismo eutróficos, não tendo

referências na literatura sobre os possíveis efeitos da crioterapia em organismos desnutridos.

O tecido submetido a crioterapia terá redução de sua atividade metabólica em todos os seus componentes, como células, moléculas e enzimas. Muitas vezes essas reduções são importantes dentro de um determinado quadro, no qual se pretende influenciar em todo o sistema. Mas em outros casos ocorre a necessidade de se direcionar em um objeto especifico, seja célula, molécula ou enzima. Nestes casos a crioterapia não é eficaz, cabendo aos CEM com suas janelas de intensidade e freqüência atuarem de forma mais especifica.

O uso da DOCP e do CM de 60Hz que influenciaram no índice de aderência e na atividade fagocitica relatados no trabalho apresentam uma contra indicação absoluta durante o período da defesa inata não-induzida, ou seja, logo após uma lesão, pois teoricamente a exposição a esses campos irá reduzir a atividade fagocitica, facilitando o avanço de microrganismos e o retardo no processo de eliminação de tecido lesionado após o trauma. Como os agentes agressores não foram contidos na primeira linha de defesa, naturalmente será desencadeada a resposta aguda ou defesa inata induzida. As fases do processo inflamatório (pré-inflamatório e pró-inflamatório) e o grau da lesão serão predominantes na escolha dos CEM que podem ser utilizados terapeuticamente para controlar o mecanismo celular. Caso a alteração na atividade do macrófago pelos campos magnéticos promovida “in vitro” seja confirmada “in vivo”, a exposição a esses campos poderá trazer conseqüências deletérias para o organismo, já que esses campos são encontrados em áreas residenciais e de trabalho.

Na resposta inflamatória aguda o uso da DOCP na freqüência e técnica que interferiu concomitantemente no índice de aderência e na atividade fagocitica, teoricamente poderá ser usada nessa fase, pois a redução significante na atividade fagocitica irá controlar o processo fagocitário, consequentemente evitando lesões induzidas pela atividade excessiva do macrófago. O processo de reparo será deflagrado, mas com uma intensidade menor do que com o uso da crioterapia que tem como efeito um decaimento total do mecanismo de reparo tecidual. O CM de 60Hz promoveu o mesmo efeito da DOCP podendo ser levantado à hipótese de uso terapêutico de CM de ultra baixa freqüência.

GAMALEY et al, 1995 demonstrou que campos eletromagnéticos de alta freqüência modulados em ultra baixa freqüência de 50Hz por 30 minutos emitidos através de um equipamento utilizado terapeuticamente (Megawave 150/1) aumentou de forma significativa à fagocitose e a atividade da enzima NADPH oxidase em macrófagos, produzindo ânion superóxido pela redução da molécula de O_2. O fenômeno não ocorreu com as freqüências moduladas de 15, 30 e 99Hz. Caracterizando com isso a presença das janelas especificas de freqüência e tempo. O comportamento enzimático apresentou características não lineares. Com esse tipo de resposta celular, os autores sugerem a aplicação deste campo durante o processo inflamatório diretamente ligado a ação microbicida, detendo o avanço do agente patogênico. Resta-nos saber como os microrganismos que estão sendo combatidos se comportarão diante do mesmo campo eletromagnético.

Mas a ação antiinflamatória foi encontrada na aplicação de campo magnético pulsado em 50Hz no qual diminuiu significativamente a formação de edema após a inoculação de uma substância que provoca uma inflamação aguda (carragenina). O maior efeito do campo foi observado quando ocorreu a aplicação antes e após a inoculação do produto inflamatório. Os autores discutem o trabalho argumentando que o campo magnético interferiu na resposta dos fagócitos profissionais, modulando a ação dessas células (ZECCA et al, 1985).

A cicatrização tecidual sofreu interferência com campos de RF emitidos de forma continua nas freqüências de 53,53GHz, 42,19GHz e 42,19GHz modulada em 200MHz expostos por 5 dias durante 30 minutos por dia. Os campos emitidos na freqüência de 53,53GHz e 42,19GHz causaram inibição no processo de cicatrização, enquanto os campos de 42,19GHz modulado em 200MHz promoveram aceleração no processo de cicatrização (IMANTS et al ,1996). Apesar da elevada freqüência os campos emitidos não elevaram a temperatura local, todo efeito biológico foi atribuído ao campo eletromagnético. O interessante é que os campos que foram emitidos de forma contínua (sem modulação) reduziram o processo de cicatrização o que normalmente é esperado em campos modulados.

Ações especificas dos campos eletromagnéticos em determinadas atividades celulares estimula o estudo e entendimento do fenômeno para uma posterior aplicação clínica em processos de difícil controle. A liberação de citocinas pró-inflamatórias por parte dos macrófagos (IL-1 e IL-6) foi conseguida por campos eletromagnéticos de 60Hz após 24 horas de exposição (PESSIMA e ALDINUCCI, 1998). Esses achados são de grande

importância para a área clínica, pois com atuação especifica dos campos pode-se direcionar que tipo celular será mais recrutada na resolução do quadro patológico.

Alguns autores, baseados na lei de Arndt-Schultz afirmam que uma dose muito baixa de DOCP não terá efeito e uma dose muito alta pode ser prejudicial, sendo necessário uma dose moderada para cada processo instalado (KLEBER-MOFFER et al, 1996; LOW, 1997, 2001). No nosso trabalho as doses que causaram alterações nos parâmetros estudados foram na ordem de $\mu W/cm^2$. Mesmo estando dentro deste espectro de densidade de potência alguns valores influenciaram as células outros não. A lei de Arndt-Schultz é aplicada em campos que geram efeitos térmicos, não se aplicando diretamente para os efeitos não térmicos. Com uma visão mais criteriosa da lei pode ser observado que ela pode em parte, ser aplicada para fenômenos não térmicos, pois quando se afirma que a alteração biológica ocorrerá em resposta à exposição ao campo com uma dose moderada, abre-se com isso, uma janela especifica. Outra informação importante fornecida pelo resultado do trabalho é que essas janelas podem ser encontradas sutilmente próximas de outras que não afetam o parâmetro biológico estudado não sendo obrigatório regras exponenciais para a escolha das potências utilizadas.

A DOCP é largamente aplicada em diversos processos patológicos desde traumas a doenças reumáticas, apresentando bons resultados. O conhecimento vigente dos efeitos dos CEM no sistema biológico determina que a alteração no comportamento celular se dá de forma não linear e não limiar. No nosso trabalho foi demonstrado que a DOCP segue essa regra. Por isso a necessidade de estudos “in vitro” e posteriormente “in vivo” com

metodologias mais rigorosas se tornam urgentes, para determinar o quanto de influência é conseguido através dos CEM da DOCP e quanto é conseguido através de efeito placebo.

A resposta inflamatória iniciada pela resposta inata não induzida e caso seja necessário à ativação da resposta inata induzida, apresenta uma atividade biológica de extrema complexidade que atualmente é combatida no meio fisioterápico através do uso da crioterapia. Esse recurso como dito anteriormente age em todos os componentes envolvidos nessa resposta, inibindo todo o processo. Dependendo da extensão da lesão terá resultados benéficos mais também causará retardo no processo de cicatrização natural. Com os CEM surge uma nova perspectiva de tratamento, apesar do caminho que leva a esse entendimento ser extremamente árduo. As células e substâncias envolvidas na inflamação, tanto em organismos nutridos como desnutridos e recuperados, poderão responder diferentemente em estudos “in vitro” e “in vivo”, e o mapeamento dos campos gerados pela DOCP que promovam efeitos biológicos comprovados e reproduzidos levará um determinado tempo de pesquisa. Esse trabalho vem a contribuir na investigação no mapeamento dos campos magnéticos de freqüência ultra baixa e de DOCP nos possíveis efeitos produzidos por sua interação no sistema biológico.

CONCLUSÕES

6.-CONCLUSÕES

- Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que densidades de potência de DOCP menores influenciam distintamente o índice de aderência celular e a atividade fagocitica dos macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos nutridos. Densidades de potência de campo maiores aumentam o índice de aderência e reduzem a atividade fagocitica, interferindo nos processos fisiológicos analisados.

- Nos macrófagos peritoneal de ratos Wistar machos desnutridos no período neonatal e recuperados após esta fase, densidades de potência de campo menores interferiram no índice de aderência e na atividade fagocitica concomitantemente, enquanto densidades de potência maiores não alteraram os parâmetros estudados.

- Nos macrófagos peritoneal de ratos Wistar machos tanto nutridos como desnutridos no período neonatal e recuperados após esta fase, o campo magnético alternado aumenta o índice de aderência celular e reduz a atividade fagocitica.

PERSPECTIVAS

7.-PERSPECTIVAS

- Mapear com estudos “in vitro” os parâmetros físicos como freqüência, densidade de potência, técnica de aplicação e tempo de exposição dos campos de diatermia pulsada que interferem nas funções fisiológicas das células fagocitárias.

- Mapear as substâncias secretadas (citocinas) pelas células fagociticas após estimulação dos campos de diatermia pulsada.

- Realizar dosagem de AMPc em cultura de macrófagos após exposição aos campos de diatermia pulsada.

- Analisar possíveis influências dos campos de diatermia pulsada nas células de defesa especifica (linfócitos).

- Verificar através de experimentos “in vivo” se os achados “in vitro” se repetem.

- Reduzir o tempo de exposição ao campo magnético e observar se a interferência persiste nos parâmetros analisados nesse estudo.

- Mapear com estudos “in vitro” os parâmetros físicos como freqüência, densidade de campo magnético, geometria de exposição, forma de onda e tempo de exposição dos campos magnéticos alternados que interferem nas funções fisiológicas das células fagocitárias e de defesa especifica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H. A.; POBER, S. J. Imunologia Celular e Molecular. Terceira Edição**. REVINTER**, p.486, 2000.

AHLBOM, M. FEYCHTING. A bayesian approach to hazard identification. The case of electromagnetic fields and cancer. **Ann. NY. Acad.Sci**. 895 p. 27-33 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D. J. Biologia Molecular da Célula. Terceira Edição. **ARTMED**, p. 1294, 1997.

ALDINUCCI, C.; GARCIA, J.B.; PALMI, M.; SGARAGLI, G.; BENOCCI, A; MEINI, A; PESSINA, F.; ROSSI, C.; BONECHI, C.; PESSINA, G.P. The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields lymphocyte function. **Bioelectromagnetics**. 24. p. 373-379, 2003.

ALDINUCCI, C.; GARCIA, J.B.; PALMI, M.; SGARAGLI, G.; BENOCCI, A; MEINI, A; PESSINA, F.; ROSSI, C.; BONECHI, C.; PESSINA, G.P. The effect of strong magnetic field on lymphocytes**. Bioelectromagnetics**. 24: p. 109-117, 2003.

ALLENDE, L. M.; CORELL, A.; MANZANARES, J.; MADRUGA, D.; MARCOS, A., MADRONO, A.; LOPEZ-GOYANEZ, A.; GARCIA-PEREZ, M. A.; MORENO, J. M.; RODRIGO, M., SANZ, F.; ARNAIZ-VILLELA, A. Immunodeficiency associated with

anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. **J Photobiol B**. 44 (2): p. 117-123, 1998.

ANATEL,http://www.anatel.gov.br/index.asp?link=/radiofrequencia/default_ondas.htm%3rcod=2088.

ANDERSON, J. M., BALDA, M. S., FANNING, A.S. The structure and regulation of tight junctions. **Curr Opin Cell**, 5: p. 772-778, 1993.

ANDRADE, A. F. D. Depressão alastrante no córtex cerebral de ratos submetidos a "dieta básica regional" suplementada. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 62p. Dissertação (mestrado), 1988.

ANTONOPOULOS, A.; YANG, B.; STAMM, A.; HELTER, D. W.; OBE, G. Cytological effects of 50Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**. 346, p. 151-157, 1995.

ARMSTRONG-ESTHER, C. A.; LACEY, J. H.; CRISP, A. H. An investigation of the immune response of patients suffering from anorexia nervosa. **Postgrad Med J**. 54:395, 1978.

BANSAL, P. S.; SOBTI, V. K.; ROY, K. S. Histomorphochemical effects of shortwave diathermy on healing of experimental muscular injury in dogs. **Indian Journal of Experimental Biology**. 28: p. 766-770, 1990.

BAUREUS, C. L. M. K.; SOMMARIN, M.; PERSSON, B. R. R.; SALFORD, L. G.; EBERHARDT, J.L. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. **Bielectromagnetics**. 24 : p. 395- 402, 2003.

BEARER, M. Electromagnetic fields and infant incubators. **Archives of Environmental Health**. 49, p. 352-354, 1994.

BEREITER-HAHN, J. Behavior of mitochrondria in the living cell. **Int. Rev. Cytol**. v. 122. p. 1-63, 1990.

BERGLER, R.; ZIPPERLING, C. Psychogenic stimulation of the immune system by nutrition. **J Antimicrob Chemother**. 26 suppl C: 23-29, 1990.

BERSANI, F.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C. Effects of extremely low frequency (ELF) pulsed electromagnetic fields (PEMFs) om immunocompetent cells. “in vitro” studies. **Alta Frequenza**. LVIII: p. 375-380, 1989.

BISSCHOP, G.; BISSCHOP, E.; COMMANDRE, F. Eletrofisioterapia. **Santos Livraria Editora**. Primeira Edição, p. 63-87, 2001.

BOCKMAN, D. E., KIRBY, M. L. Dependence of thymus development on derivates of the neural crest**. Science**, p. 233:498, 1984.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Ann Nutr Metab**. 42 (6): p. 367-73, 1998.

BOXWELL, R.; AYSON, G.A.; RAMENOFSKY, C. Metabolic activity in rats with protein-calorie malnutrition. **Am J Clin Nutr**. 32 :p. 189-94, 1993.

BRIET, F., TWOMEY, C. JEEJEEBHOY, K.N. Effect of malnutrition and short-term refeeding mononuclear cell mitochondrial complex I activity in humans. **Am. J. Clin. Nutr**. v. 77., p.1304-1311, 2003.

BROWN, J.L. & POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**. p. 38-43, 1996.

BUCK, C.A.; HORWITZ, A.F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. **Annu. Rev. Cell. Biol**. 3 p. 179-205 1987.

CADOSSI, R.; BERSANI, F.; COSSARIZA, A.; ZUCHINI, P.; EMILIA, G.; TORELLI, G.; FRANCESCHI, C. Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields. **FASEB J**. 6: p. 2667-2674, 1992.

CADOSSI, R.; EMILIA, G.; TORELLI, G. Lymphocytes and pulsing magnetic fields. **In Moderm Bioelectricity** (Marino, a. a.; ed). p. 457-496, 1988.

CAMERON, B. Experimental accelaration of wound healing. **American Journal of Othopaedics**. 3: p. 336-343, 1961.

CAPLAN, L.S.; SCHOENFELD, E.R; O`LEARY, E.S.; LESKE M.C. Breast cancer and electromagnetic fields. **Ann. Epidemiol**. 10 p. 31-44. 2000.

CELADA, A., NATHAN, C. Macrophage activation revisited. **Immunol. Today**, 15, p. 100-102, 1994.

CHANDRA, R. K. Nutrition and immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**. 66: 460S-3S, 1997.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **Eur J Clin Nutr**. Suppl 3: s73-6, 2002.

CHANDRA, R.K. Nutrition, immunity and infection from basic kwowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. **Proc. Natl Acad Sci**, USA, 93: p. 14307-7, 1996.

CHAVES, N. Principais carências nutricionais. **In**: Nutrição básica e aplicada, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, p. 281-296, 1978.

CHRISTADOSS, P.; TALAL, N., LINDSTROM, J. Suppression of cellular and humoral immunity to T-dependent antigens by calorie restriction. **Cell Immunol**. 88:1, 1984.

CONSTABLE, D. J.; SCAPICHIO, A. P.; OPITZ, B. Studies of the effects of diapulse treatment on various aspects of wound healing, in experimental animals. **Journal of Surgical Research.** 11:p. 254-257, 1971.

CONTI, P.; GICANTE, G. E.; CIFONE, M. G.; ALESSE, E.; IANNI, G.; REALE, M.; ANGELETTI, P. U. Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by ELF electromagnetic fields. **FEBS Leet**. 162, p. 156-160, 1983.

COSSARIZZA, A.; MONTI, D.; BERSANI, F.; CANTINI, M.; CADOSSI, R.; SACCHI, [a]; FRANCHESCHI, C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. **Biochem Biophys Res Commun**. 160, p. 692-698 1989.

COSSARIZZA, A.; ORTOLANI, C.; FORTI, E.; MONTAGNANI, G.; PAGANELLI, R.; ZANOTTI, M.; MARINI, M.; MONTI, D.; FRANCHESCHI, C. Age-related expansion of functionally inefficient cells with markers of natural killer activity in Down´s syndrome. **Aging.** 3, p. 241-246, 1991.

CUNNIGHAM-RUNDLES, S.; AHRN, S.; ABUAV-NUSSBAUM, R.; DNISTRIAN, A. Development of immunocompetence: role of micronutrients a microorganisms. **Nutr Rev**. 60 (5): S68-72, 2002.

DASDAG, S.; SERT, C.; AKDAG, Z.; BATUN, S. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on hematologic and immunologic parameters in welders. **Archives of Medical Research**. 33, P. 29-32, 2002.

DE CASTRO, C.M.M.B., DE CASTRO, R. M., DE MEDEIROS, A. F., SANTOS , Q., SILVA, W. T. F.E. Effect of stress on the production of O^{-2} in alveolar macrophages. **J. Neuroinmunol**, 108, p. 68-72, 2000.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON, A.N.; DOBBING, J. (ed). **Applied Neurochemistry**. Oxford Blackwell, p. 287-316, 1968.

EDWARDS, R. Leak links power lines to cancer. **New Scientist**. 7. p.-7, 1995.

ELIANA, M. C., NICOLLETA, D. R., EMILLIA, S., UGO, T., GIOVANNA, M., ANGELA, B. STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesión molecules. **Intern Immunol**, 11, 7, p. 1075-1083, 1999.

ENGELMAM, R. W.; OWENS, U. E.; BRADLEY, W. G. Mammary and submandibular gland epidermal growth factor expression is reduced by calorie restriction. **Cancer Res**. 55: 1289, 1995.

FERNANDES, G.; YUNIS, E.J.;GOOD, R. A. Influence of diet on survival of mice. **Proc Nat Acad Sci.** USA, 73: 1279, 1976.

FEYCHTING, M.; AHLBOM, A. Magnetic field and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines. **Am J Epidemiol**. 138, (7): p. 467-481, 1993.

FEYCHTING, M. Occupational exposure to electromagnetic fields and adult leukemia: a review of the epidemiological evidence. **Radiat Environ Biophys.** 35: p. 237-242, 1996.

FLIPO, D.; FOURNIER, M.; BENQUET, C.; ROUX, P.; LE BOULAIRE, C. Increased apoptosis, changes in intracellular Ca^{2+}, and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field. **Jornal of Toxicology and Environmental Health**. 54:p. 63-76, 1998.

FREIRE, E. Trauma- A Doença do Século. v. 1. São Paulo: **ATHENEU**, p. 352, 2001.

FREY, A. H. An integration of the data on mechanism with particular reference to cancer. In: A. H. FREY, Ed. On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems. New York: springer-Verlag, 1995.

FUKATSU, K., HIRAIDE H. Role of polymorphonuclear neutrophils and macrophages in prevention of postoperative infections. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, 104: 506-10, 2003.

GAMALEY, I.; AUGSTEN, K.; BERG, H. Electrostimulation of macrophage NADPH oxidase by modulated high-frequency electromagnetic fileds. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 38, p. 415-418, 1995.

GOLDIN, J. H.; BROADBENT, N.R.G.; NANCARROW, J. D. The effects of Diapulse on the healing of wounds: a double blind randomized control trial in man. **British Journal of Palstic Surgery**. 34: p. 267-270, 1981.

GRUNDLER, W.; KAISER, F.; KEILMAM, F.; WALLECZEK, J. Mechanism of electromagnetic interaction with cellular systems. **Naturwissenchaften**. 79: p. 551-559, 1992.

GUIRRO, R.; ABB, C.; MAXIMO, C. Os efeitos fisiológicos da crioterapia: uma revisão. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**. n.2, v.6, p. 164-170, 1999.

GUY, A. W.; CHOU, C. K.; NEUHAUS, B. Average SAR and distribution in man exposed to 450MHz radiofrequency radiation. **IEEE transactions on microwave theory and techniques.** MTT-32: p. 752-762, 1984.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER. Eletricidade, Magnetismo, Óptica. **Livro Técnico**. p. 705-1440, 1996.

HARVARD MEDICAL SCHOOL HEALTH PUBLICATIONS GROUP. Electromagnetic fields and breast cancer. Harvard Women´s Health Watch. 2, sep, 7, 1994.

HEWITT, P. G. Conceptual Physics, 9th Edition. Addison Wesley. p. 685, 2002.

HIROAKI, Y.; TAKEHIRO, T.; HIROKI, M.; HIDEMI, O.; SEICHI, K.; HIROYUKI, Y.; CHIHARU, S.; SETSU, H.; TOSHIO, M.; TAKU, Y.; FUMIO, M.; HIDEKI, H.;YOSHIHISA O. No effect of extremely low-freqeuncy magnetic field observed on cell growth or initial response of cell proliferation in human cancer cell lines. **Bioelectromagnetics**. 23: p. 355-368, 2002.

HOLIAN, O.; ASTUMIAN, R.D.; LEE, R.C.; REYES, H.M.; ATTAR, B.M.; WALTER, R.J. Protein kinase C activity is altered in HL60 cells exposed to 60Hz AC electric fields. **Bioelectromagnetics**. 17 (1996) 504-509.

HOMO-DELARCHE, F.; DARDENE, M. The neuroendocrine-immune axis. **Springer Seminary Immunopathology**. 14: p. 221-238, 1993.

INTERNATIONAL COMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION. Guidelines for Limiting Exposure to Time-Varying Eletric, Magnetic and Electromagnetic fields (up to 300GHz). Health Physics, v.74, n.4, p. 494-522, 1998.

IKEDA, K.; SHINMURA, Y.; MIZOE, H.; YOSHIZAWA, H.; YOSHIDA, A.; KANAO, S.; SUMITANI, H.; HASEBE, S.; MOTOMURA, T.; YAMAKAWA, T.; MIZUNO, F.; OTAKA, Y.; HIROSE, H. no effects of extremely low frequency magnetic fields found on cytotoxic activities and cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Bioelectromagnetics**. 24. p. 21-31, 2003.

IMANTS, D.; DOMBROVZKA, L.; TURAUSKA, [a]; SHKIRMANTE, B.; SLUTSKII, L. Experimental study of the effects of radiofrequency electromagnetic fields on animals wiyh soft tissue wounds. **The Science of the Total Environment**, 180, p. 35-42, 1996.

ITOH, M.; MONTEMAYOR, J. S.; MATSUMOTO, E. Accelerated wound healing of pressure ulcers by pulsed high peak power electromagnetic energy (Diapulse). **Decubitus**. 4(1): p. 24-34, 1991.

IVANOVIC, D. M.; OLIVARES, M.G.; CASTRO, C.G.; IVANOVIC, R.M. Nutrition and learning in chilian school age children: Clile´s metropolitan region survey. **Nutrition**. 12, p. 321-328, 1996.

JAUCHEM, J. R. electromagnetic fields-Is there a danger?. **Lancet**. 336. p. 884.

JIRILLO, E., ALTAMURA, M., CASALE, D., PEPE, T., VENECIA, F.P., SOLEO, L., L`ABATE, N., RAINO, A., STEFANELLI, R. Effects of function of human lymphocytes exposed electromagnetic fields with a frequency from 1500 to 2000MHz. **G Ital Med Lav Ergon**, 25:p. 369-70, 2003.

JOHN, L. Dosage of some pulsed shortwave clinical trials. **Physiotherapy**. 81, p. 611-616, 1995.

JOHN, L.; ANN, R. Eletroterapia Explicada: Princípios e Práticas. Terceira Edição. **Manole**, p. 301-354, 2001.

JORCYC, C. L.; GARRETT, L. J.; MAROULAKOU, I.G.; WATSON, D. K.; GREEN, J. E. Multiple regulatory regions control the expression of Ets-1 in the developing mouse: vascular expression of conferred by intron I. **Cell Mol Biol**. 43: p. 211-225, 1997.

JOSEPH, K. Princípios e Práticas de Eletroterapia. **Santos Livraria Editora**, quarta edição. p. 5-22, 2001.

KARIMI, K.; LENNARTZ, M.R. Protein kinase C activation precedes arachidomic acid release during IgG-mediated phagocytosis . **J. Immunol**. 155 p. 5786-5794, 1995.

KAWAKAMI, K.; KADOTA, J.; LIDA, K.; SHIRAI, R.; ABE, K.; KOHNO, S. Reduced immune function and malnutrition in the elderly. **Tohoku J Exp Med**. 187 (2): p. 157-71 1999.

KEUSCH, G.T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **J Nutri.,** 133: p. 336S-340S, 2003.

KHALIL, A. M.; QASSEM, W. Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetcs. **Mutation Research**. 247, p. 141-146, 1991.

KISHINO, Y, MORIGUCHI, S. Nutritional factors and cellular immune responses. **Nutr Health**. 8(2-3): 133-41, 1992.

KITCHEN, S. Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências. Décima Primeira Edição. **Manole**, p. 145-165, 2003.

KLABER, M. J.A.; RICHARDSON, P. H.; FROST, H, OSBORN, A. A placebo controlled double blind trial to evaluate the effectiveness of pulsed short wave therapy for osteoarthritic hip and knee pain**. Pain**. 67: p. 121-127, 1996.

KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA. Manual de Operação LM 9006. Diatermax. p. 1-10.

KOCH, B.C.L.M.; SOMMARIN, M., PERSSON, B.R.R.; SALFORD, L.G.; EBERHARD, J.L. Interaction between weak low frequency magnetic field and cell membranes. **Bioelectromagnetics**. 24, p. 395-405, 2003.

KRAG, C.; TAUDORF, U.; SIIM, E.; BOLUNG, S. The effect of pulse electromagnetic energy (Diapulse) on the survival of experimental skin flaps. A study on rats. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**. 13: p. 377-380, 1979.

LACY-HULBERT, A., METCALFE, J.C., HESKETH, R. Biological responses to electromagnetic fields. **Faseb J**. 12. p. 395-420, 1998.

LE DOUARIN, K.; JOTEREAU, C. G. Thymus weights in malnourished rats. **J Pathol**. 105: 105-9, 1975.

LEDNEV, W. Possible mechanisms for theinlfuence of weak magnetic fields on biological systems**. Bioelectromagnetics**. 12: p. 71-76, 1991.

LEHMANN, S. immune function and nutrition. The clinical role of the intravenous nurse. **J Intraven Nurs**. 14 (6): p. 406-420, 1991.

LEKE, L.; SAYGILI, A.; VURAL, M.; RISBOURG, B. Malnutrition et deficit immunitaire chez l´enfant. **Arch Pediatr**. 3: p. 705-13, 1996.

LEUBA, G.; RABINOWICZ, T. Long-term effects of post-natal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. II. Evolution of dentritic bronching and spines in the visual region. **Experimental Brain Research**. 564, p. 1-11, 1979.

LI, C.M.; FENG, C. K.; An evaluation of radio frequency exposure from therapeutic diathermy equipament**. Ind Health**. 37(4): p. 465-468, 1999.

LIBOFF, A. R. Cyclotron resonance in membrane transport. In Chiabrera A. Nicolini, C. Schwan, H. P. (eds): Interactions Between Electromagnetic Fields and Cells. New York: **Plenum Publishing**, Co. p. 281-296, 1985.

LIBURDY, R.P., CALLAHAN, J.; HARLAND, J.; DUNHAM, E.; SLOMA, T.R.; YASWEN, P. Experimental evidence for 60Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade: Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. **FEBS**. 3 p. 301-308 1993.

LIN, J. C. Advances in electromagnetic fields in living systems. Vol 1, p. 196, 1994.LINDSTRÖN, E.; LINDSTRÖN, P.; BERGLUND, A.; K MILD,.H..; LUNDGREN E. Intracellular calcium oscilations induced in T-cell line by a weak 50 Hz magnetic. **J. Cell. Physiol**. 156 p. 395-398 1996.

LINET, M. S.; HATCH, E. E.; KLEINERMAM, R. A.; ROBINSON, L. L.; KAUNE, W. T. FRIEDMAN, D. R.; SEVERSON, R. K.; HAINES, C. M.; HARTSOCK, C.T.; NIWA, S.; WASHOLDER, S.; TARONE, R. E. Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. **New Engl J Med**. 337, p. 1-7, 1997.

LIYAMA, M., SHIMADA, Y., KITA, T., ITO, H. Effect of aging on macrophage adherence to extracellular matrix proteins. **Mech Ageing Dev**, 66:p. 149-58, 1992.

LÖSCHER, W.; MEVISSEN, M. Linear relationship between flux density and tumor co-promoting effect of prolonging magnetic exposure in a breast cancer model. **Cancer Lett**. 96. p. 175-180, 1994.

LOSCHINGER, M.; THUMM, S., RODEMANN, H.P. Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblast populations by sinusoidal extremely low-frequency

magnetic fields (20Hz,8mT) is dependent on the differentiation state of the single cell. **Radiat. Res**. 151 p. 195-200 1999.

LOW, J. Response to Moffett, Richardson, Frost, Osborn. **Pain**. 71(2):207, 1997.

MACHAIAH, J.P. Effects of protein restriction on functional properties of rat peritoneal macrophages. **Indian J Exp Biol**, 29: p. 468-73 1994.

MAINOUS, M.R.; DEITCH, E.A. Nutrition and infection. **Surg Clin North Am**. 74 (3): p. 659-76, 1994.

MAIZEL, A. L.; METHA, S. R.; HAUFT, S. Human T lymphocyte?monocyte interaction in response to lectine: Kinetics of entry into the S-phase. **J Immunol**. 127: p. 1058-1064, 1981.

MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. **OXFORD UNIVERSITY PRESS**, p. 482, 1995.

MALPUECH-BRUGERE, C.; KURRYSZKO, J. NOWACKI, W.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y, MAZUR, A. Early morphological and immunological alterations in the spleen during magnesium deficiency in the rat. **Magnes Res**. 11 (3): p. 161-9, 1998.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. **Eur J Clin Nutr**. 54 (1): S61-4, 2000.

MARCOS, A. The immune system in eating disorders: an overview. **Nutrition**. 13 (10): p. 853-862, 1997.

MARTIN, M.C.; DE TOMAS, M.E.; SERRES, C.; MERCURI, O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essencial fatty acid metabolism. **Journal of Nutrition**. 125, p. 1017-1024, 1995.

MCCARTER, M. M., NAAMA, H.A., SHOU, J., KWI, L. X., EVOY, D. A., CALVANO, S. E., DALY, J.M. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein calorie malnutrition. **Cell Immunol**, 183:131-6, 1998.

MCLEAN, J.R.N.; STUCHLY, M.A.; MITCHEL, R.E.J. D.; YANG, H., GODDARD, M.; LECUYER, D.W.; SCHUNK, M.; CALLARY, E.; MORRISON, D. Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60Hz magnetic field: II. Tumor development and immune response. **Bioelectromagnetics**. 12 p. 273-287 1991.

MOORE, S.E.,GOLDBLATT, D.,BATES, C.J., PRENTICE, A.M. Impact of nutritional status on antibody responses to different vaccines in undernourished Gambian children. **Acta.Paediatr**, v.92, p.170-176, 2003.

MORGAN, G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence?. **The Lancet**, 349: 1693-1695, 1997.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 17: p. 91-128, 1993.

MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICK.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Rewiews**. 2: p. 137-230, 1978.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCE, Working Group Report: Assessment of of Health effects from exposure to power-line frequency electric magnetic fields, (Portier, CJ, Wolfe, MS eds) **U.S National Institute of Health**, NIH Publication No, 98-3981 (Research Triangle Park: NIEHS) 1998.

NEVIN, S. S.; JOHN, P. S. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. **Am J Clin Nutr**. 66: 464S-77S, 1997.

NOGA,S.J.; NORMANN, S.J.; WEINER, R.S. Methods in laboratory investigation-isolation of guinea pig monocytes and and Kurloff cells: characterization of monocyte subset by morphology, cytochemistry, and adherence. **Laboratory Investigation**. 51 2 p. 244-252 1984.

OROZA, M.A. CALCICEDO, L.; SÁNCHEZ-FRANCO, F.; RIVAS, L. Hormonal, hematological and serum chemistry effects of weak pulsed electromagnetic fields on rats. **J. Bioelectr**.6 p. 139-151 1987.

PANAGOPOULOS, J. D.; KARABARBOUNIS, A.; MARGARITIS, L. H. mechanism for action of eletromagnetic fields on cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 298: p. 95-102, 2002.

PERKINS, S. N.; HURSTING, S. D.; PHANG, J. M. Calorie restriction reduces ulcerative dermatitis and infection related mortality in p53-deficient and wild-tipe mice. **J Invest Dermatol**. 111: 292, 1998.

PESSINA, G. P.; ALDINUCCI, C. Pulsed electromagnetic fields enhance the induction of cytokines by pripherical blood mononuclear cells challenged with phytohematoggutinin. **Bielectromagnetics**. 19, p. 445-451, 1998.

PESSINA, G.; ALDINUCCI, P. Pulsed electromagnetic fields enhance the induction of cytokines by peripherical blood mononuclear cells challenged with phytohematogglutinin. **Bioelectromagnetics** 19 p. 445-451 1998.

PHILIP, P. S.; JUNYA, F.; ERIN, M.M.; HASSAN, A. N.; JOHN, M. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophages function. **Basic Nutritional Investigation**. 17: p. 41-45, 2001.

PHILLIPS, J. L.; HAGRREN, W.; THOMAS, J. W.; ISHIDA-JONES, T.; ADEY, W. R. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. **Biochimica et Biophysica** Acta. 1132, p. 140-144, 1992.

PICANÇO-DINIZ, C.W.; ARAUJO, M. S.; BORBA, J.M.C.; GUEDES, R.C.A . NADPH-Diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon termials in the visual córtex of adults rats malnourished during development. **Nutritional Neuroscience**. 1, p. 35-38, 1998.

PIRA, E. Biological effects of exposure to electromagnetic fields: introduction. **G Ital Med Lav Ergon**, 25: p. 362-3, 2003.

POPE, G. D.; MOCKET, S. P.; WRIGHT, J.P. A survey of electrotherapeutic modalities: ownership and use in the NHS in England. **Physiotherapy**. 81(2): p. 82-91, 1995.

QUEIROS, A. S. Desnutrição precoce e estresse agudo: Aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. Dissertação (Mestrado em Nutrição)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p.89, 2000.

RAYMOND, R. T.; GRAHAM, G. H.; DONNER, M.; DONALD, I. M.; GUY, A. W. Genotoxicity of radiofreqeuncy signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. **Bioelectromagnetics**. 23: p. 113-126, 2002.

REPACHOLI, M.; GREENEBAUM, B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. **Bioelectromagnetics**. 20: p. 133-160, 1999.

RESNICK, O.; MORGANE, P. J.; HASSON, R. Overt and hiddein forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. **Neuroscience and Biobehavioral Rewies**. Shrwsbury, 6, p. 55-75, 1979.

ROMANO-SPICA, V.; MUCCI, N.; URSINI, C.L.; IANNI, A.; BHAT, N. K. Ets 1 oncogene induction by ELF-modulated 50MHz radiofreqeuncy electromagnetic field. **Bioelectromagnetics**. 21: p. 8-18, 2000.

ROSA, G.; NUNES, C.; OLIVEIRA, J. Efeitos fisiológicos da crioterapia na inflamação aguda causada por traumatismo fechado- Uma revisão. **Reabilita**r. n. 14, p. 35-39, 2002.

ROY, S., NODA, Y., ECKERT, V., TRABER, M.G., MORI, A., LIBURDY, R.P., PACKER, L. The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induced oxidative burst in rat peritoneal neutrophilis is increased by a 0.1mT (60Hz) magnetic field. **Febs Lett**. 376 p. 164-166, 1995.

SALZBERG, C. A.; COOPER-VASTOLA, S. A. The effects of non-thermal pulsed electromagnetic energy on wound healing of pressure ulcers in spinal cord-injured patients: A randomized double-blind study. **Ostomy/wound Management**. 41(3): p. 42-51, 1995.

SATRY, S.K.; HORWITZ, A.F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra and intracellular initiated trasmembrane signaling. **Curr. Opin. Cell Biol**. 5 (). p. 819-831 1993.

SEVERSON, R. K.; STEVENS, R. G.; KAUNE, W. T.; THOMAS, D. B.; HEUSER, L.; DAVIS, S.; SEVER, L. E. Acute non-lymphocytic leukemia and residential exposure to power frequency magnetic fields. **Am J. Epidemiol**. 128, p. 10-20, 1988.

SHIELDS, B. A.; ENGELMAM, R. W.; FUKAURA, Y. Calorie restriction suppresses subgenomic mink cytophathic focus-forming murine leukemia vírus transcription and frequency of genomic expression while impairing lymphoma formation . **Proc Natl Acad Sci.** USA, 88:11138, 1991.

SIMKO, M., DROSTE, S., KRIEHUBER, R., WEISS, D.G. Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50Hz electromagnetic fields. **European Journal of Cell Biology**. 80 p. 562-566 2001.

SIQUEIRA, J. F.; DANTAS, C. J. S. Mecanismo Celulares e Moleculares da Inflamação. **MEDSI**, p. 238, 2000.

SKERRET, S. J.; HENDERSON, W.R.; MARTIN, T.R. Alveolar macrophage function in rats with severe protein calorie malnutrition**. J. Immunol**. 144: p. 1052-61, 1990.

STUCHLY, M.A.; RUDDICK, J.; VILLENEUVE, D.; ROBINSON, K.; REED, B.; LECUYER, D.W.; TAN, K. ; WONG, J. Teratological assement of exposure to time-varying magnetic field. **Teratology**. 38 p. 461-466 1988.

TENFORD, S. T. The worders of magnetism. **Bioelectromagnetics**, 24: p. 3-11, 2003.

TENFORD, T. S. Interaction of ELF magnetic fields with with living systems. In: C. POLK.; E. POSTOW. Eds. Handbook of biological effects of electromagnetic fields, 2nd ed.; Boca Raton: CRC Press, 1996.

TESHIMA, S.; ROKUTAN, K.; TAKAHASHI, M.; NIKAWA, T.; KIDO, Y.; KISHI, K. Alteration of the respiratory burst and phagocytosis of macrophages under protein malnutrition. **Cell. Immunology**. 139 (2): p. 493-504, 1992.

THOMAS,D.C.; BOWMAN, J.D.; JIANG, L.; JIANG, F.; PETERS, J.M.. Residential magnetic fields predicted from wiring configurations: IL relationships to childhood leukemia. **Bioelectromagnetics**, 20 p. 414-422, 1999.

TICE, R.R., HOOK, G.G.; MCREE, D.I., GUY, W.A. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. **Bioelectromagnetics**. 23 p. 113-126, 2002.

TOKALOV, S.V., GUTZEIT, H.O. Weak electromagnetic fields (50Hz) elicit a stress response in human cells. **Environ Res**, 94: p. 145-51, 2004.

TURNER, C.E.; BURRIDGE, K. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interations. **Curr. Opin. Cell. Biol**. 5 p. 849-853 1991.

TYNES, T.; HALDORSEN, T. Electromagnetic fields and cancer in children residing near Norwegian high-voltage power lines. **Am J Epidemiol**. 145, p. 219-226, 1997.

TZIMA, E.; MARTIN, C. J. An evaluation of safe practices to restrict exposure to electric and magnetic field from therapeutic and surgical diathermy. **Physiol Meas**. 15 (2): p. 201-116, 1994.

UCKUN, F. M.; KUROSAKI, T.; JIN, J.; JUN, X.; MORGAN, A.; TAKATA, M.; BOLEN, J.; LUBEN, R. Exposure of B-lineage lymphoid cells to low energy electromagnetic fields stimulates Lyn kinase. **J Biol Chem**. 270: p. 27666-27670, 1995.

UEDA, M. J. ITO, T.,OHNISHI, S., OKADA, T.S. Phagocytosis by macrophages. I. Kinetics of adhesion between particles and phagocytes. **J Cell Sci**, 51:p. 173-88, 1981.

VERSHAEVE, L. Can non ionizing radiation induce cancer? **The Cancer Journal**. 8, p. 5, 1997.

WALLECZEK, J.. Electromagnetic fields effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. **FASEB**. p. 3177-3185 1992.

WALLECZEK J., LIBURDY, R.P. Nontermal 60Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat thymocytes:dependence on mitogen activation. **FEBS Lett**. 271 p. 157-160 1990.

WALLECZEK, J.; BUDINGER, T. F. Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and files intensity. **FEBS**. 314 (3), p. 351-355, 1992.

WEAVER, J.C.; ASTUMIAN, R.D. The response of living cells to very weak electric fields: the termal noise limit**. Science**, 247 p. 459-462, 1990.

WERTHEIMER, N.; LEEPER, E. electrical wiring configurations and childhood cancer. **Am J Epidemiol**. 109 (3): p. 273-284, 1979.

WING, E. J.; YOUNG, J.B. acute starvation protecsmice against *Listeria monocytogenes*. **Infect Immunol**. 28: 771, 1980.

YOST, M. G.; LIBURDY, R. P. Time-varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte. **FEBS**. 296 (2), p. 117-122, 1992.

YOUNGSON, J. H. A. M.; CLAYDEN, A. D.; MYERS, A.; CARTWRIGHT, R. A. A. A case/control study of adult haematological malignancies in relation to overhead powerlines. **Br J Cancer**, 63, p. 977-985, 1991.

ZECCA, L.; CONTE, G. D.; FURIA, G.; FERRARIO, P. The effect of alternating magnetic fields on experimental inflammation in the rat. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 14, p. 39-43, 1985.

ZHELEZNYAK, A.; BRONW, E.J. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. **J. Biol.Chem**. 267 p. 12042-12048 1992.

ZHOU, J.; LI, C.;. YAO, G.; CHIANG, H.; CHANG Z. Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50 Hz Magnetic field. **Bioelectromagnetics**. 23 p. 339-346 2002.

ANEXO