

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Luiz Carlos de Caires Júnior

**EFEITO DA RADIAÇÃO EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS SOBRE
OS PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DAS CÉLULAS
HIPOFISÁRIAS**

Juiz de Fora, MG

2011

Luiz Carlos de Caires Júnior

**O EFEITO DA RADIAÇÃO EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS
SOBRE OS PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DAS
CÉLULAS HIPOFISÁRIAS**

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área
de concentração em Genética e
Biotecnologia.**

Orientador: Dr. Raúl Marcel González Garcia

Juiz de Fora, MG

2011

***“Muda, que quando a gente muda o mundo muda com a gente.
A gente muda o mundo na mudança da mente e quando a mente muda a gente
anda para frente...”***

Gabriel O Pensador

Aos meus pais, aos meus irmãos, ao meu avô Agenor que esteve sempre ao meu lado e à Mariana pelo amor incondicional.

Obrigado.

Agradecimentos

À Deus, pela presença incondicional, por me dar capacidade de lutar por meus desejos, por me ajudar com as minhas escolhas, por não me deixar esquecer que a vida deve ser vivida com alegria;

Aos meus pais, Luiz Carlos de Caires e Dircinha Batista Silva Caires, por sempre acreditarem em mim, pelo amor incondicional, por me darem o exemplo de que a vida deve ser conquistada com honestidade e muita luta, por me ensinarem o que é caráter e por tirarem de si para dar aos filhos, que bom que meus pais são vocês;

Aos meus irmãos, Renan e Renato, pela amizade e por serem o que são para mim;

À Mariana pelo amor e dedicação, por entender os meus esforços, por me dar força todos os dias, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por ter sido meu braço direito na construção, execução e finalização deste trabalho;

Ao professor Raúl Marcel González Garcia, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, por acreditar em mim, por me ensinar a aprender, por se dedicar ao nosso trabalho, pelas conversas de corredor, por me ensinar a organizar e programar este trabalho, por um ser grande orientador e amigo;

Ao professores Marcelo de Oliveira Santos, José Marcello Campos, José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça, Jair Aguiar, às professoras Eveline Gomes Vasconcelos, Nádia Resende Barbosa, Ana Eliza Andreazzi e a todos os graduandos e pós-graduandos dos Laboratório de Genética, de Bioquímica, Niqua, de Física Óptica Aplicada da UFJF e de Engenharia de Biosistemas (UFSJ).

Ao Jair Trapé e Philipe Mendonça, por contribuírem na construção deste trabalho.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, Silvioney, Renan, Ernesto, Ana, Alexandre, Marcelo, Felipe, Rebecca, Camila, Diego e Paula, pelos grandes sacrifícios e solidariedade para com este trabalho;

Aos amigos de graduação, Luiza, Pablo, Alexandre, Eduardo, Kogima, Tájla, e Tatianne por estarem sempre ao meu lado e por amenizarem os momentos difíceis.
Aos Bons & Velhos, pela grande amizade e carinho, por acompanharem meus passos, por estarem sempre presentes mesmo de longe;

Ao grande amigo Henrique, por ter sido referência nos estudos, caráter e força de vontade e que também mesmo de longe acompanha meus passos;

Ao Lucas e Ana Lúcia, por acreditarem em mim, por torcerem, pela amizade e carinho;

Aos meus avós, Agenor, Dona Maria, Gerci e Dona Rita, pelo carinho, torcida e sabedoria; aos meus tios, primos e padrinhos, que se preocuparam, deram atenção e amizade;

À todos que de alguma forma contribuíram com meu trabalho.

À Fundação Centro Tecnológico de Juiz de Fora - FCT/JF por ceder o instrumento medidor de radiação EMR-300.

Muito obrigado, vocês me deram muito mais do que eu precisava!

Resumo

Nos últimos anos, o sistema de telecomunicação móvel tem crescido significativamente, de modo que um sexto da população mundial, mais de um bilhão de pessoas, utiliza este tipo de telefone (National Radiological Protection Board, 2004; Maier, 2006). No Brasil, em 2011, já há mais de 202,9 milhões de habilitações de celulares, uma densidade de 104,68 acessos para cada 100 habitantes (Anatel, 2011). Estudos sobre os efeitos da radiação emitida por telefones celulares sobre o organismo são escassos, os resultados são contraditórios e feitos em cultura de células ou em células recém retiradas do indivíduo para posterior exposição à radiação. Desta maneira, os objetivos deste trabalho foram estabelecer um modelo animal para o estudo do efeito da radiação eletromagnética emitida por aparelhos celulares sobre a fisiologia de ratos e avaliar a ação deste tipo de radiação sobre a expressão e atividade de ERK 1 e ERK 2 e a expressão de isoforma alfa de PKC em hipófise de ratos. Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 dias de idade. A fonte de radiação foi um aparelho celular com frequência de 1800 MHz. Foram estabelecidos 4 grupos experimentais: 1- animais expostos por período de 1h; 2- animais expostos por 3h; 3- animais expostos por 3 dias; 4- animais expostos por 10 dias. Nos experimentos de 3 e 10 dias, a exposição foi de 25 segundos a cada 2 min. Cada grupo experimental foi acompanhado de grupo controle. Foram medidas a capacidade da radiação atravessar os ossos cranianos dos animais de experimentação e a capacidade de aquecer a água sob a calota craniana. Foram avaliados os efeitos da radiação emitida pelo aparelho celular sobre a expressão e atividade de ERK 1 e ERK 2, e a expressão da isoforma alfa de PKC em células da hipófise. A radiação atravessa a calota craniana. A 3 cm de distância ela não impõem qualquer barreira a essa passagem. Não foi observado efeito da radiação sobre a temperatura da água. Após 1 hora de exposição foi observada diminuição significativa na atividade de ERK 1 e ERK 2 dos animais expostos à radiação. Este efeito inibitório se manteve nos experimentos de 3h e 3 dias. Ao décimo dia, a atividade de ERK 1 e ERK 2 do grupo tratado e controle foi semelhante. A expressão de PKC-alfa só foi alterada nos animais expostos a 3 dias de radiação. Os resultados nos permitem concluir que a radiação emitida por telefones móveis, neste modelo, afeta vias de sinalização importantes nas células hipofisárias, o que torna necessário estudos mais detalhados sobre as conseqüências das modificações observadas.

Palavras-chave: Telefones móveis, Radiação, Hipófise, MAPK, Ratos Wistar

Abstract

In the last few years, the mobile telecommunication system has improved significantly, making one sixth of the world's population to use mobile phones, which means, in numbers, that more than a billion of people are using such devices nowadays (National Radiological Protection Board, 2004; Maier, 2006). In 2011, the number of habilitations in Brazil has reached more than 202,9 millions, corresponding a density of 104,68 phones for each hundred of habitants (Anatel, 2011). Studies about the effects of radiation transmitted by mobile phones to the organism are still very few, the results are contradictories and most of them are made in cell cultures or *ex vivo* cells to further exposure to radiation. Thus, the objectives of this study were to establish an animal model in order to investigate the effect of the electromagnetic radiation emitted by mobile phones into the physiology of rats and to evaluate the role of this type of radiation in the expression and activity of ERK 1 and ERK 2 and the expression of isoform alpha from PKC in pituitary gland. 60 days-old Wistar rats were used. The source of radiation was a mobile phone with a frequency of 1800 MHz. Four experimental groups were established: 1- animals exposed for 1 hour; 2- animals exposed for 3h; 3- animals exposed for 3 days; 4- animals exposed for 10 days. In the experiments of 3 and 10 days, the exposure was 25 seconds in every 2 minutes. Each experimental group was followed by a control group. The capacity of the radiation to cross the animal's cranial bones, and to heat the water under the cranial region, was measured. The effect of the radiation emitted by the mobile phone on ERK 1 and ERK 2 expression and activity, and expression of isoform alpha of PKC in pituitary gland were evaluated. It was shown that the radiation is capable of crossing the cranial region. It was not observed any effect of the radiation into the water temperature. After 1 hour of exposure it were observed a significant reduction in ERK 1 and ERK 2 activity of the animals exposed to radiation. This inhibitory effect was kept in the experiments of 3 hours and 3 days as well. At the tenth day, the activity of ERK 1 and ERK 2 of control and exposed group was similar. The expression of PKC-alpha has only changed in the animals exposed to 3 days of radiation. According to these results, we conclude that radiation emitted by mobile phones, in this experimental model, affects important signaling pathways in the pituitary cells, but further studies with more details are needed to determine the consequences of the modifications observed.

Key words: Mobile phone, Radiation, Pituitary, MAPK, Wistar Rats

Lista de Figuras

Figura 1	Representação da relação hipotálamo-hipófise com a regulação de glândulas e tecidos.	28
Figura 2	Representação esquemática da via de sinalização das MAPK's, ERK 1 e ERK 2 e algumas das funções que coordenam (adaptado de ALBERTS <i>et al.</i> , 2004).	35
Figura 3	Representação esquemática das medições de radiação emitida por telefone dentro da caixa contendo os animais do grupo controle e exposto.	43
Figura 4	Sonda isotrópica: equipamento utilizado para medir a intensidade do campo elétrico gerado pelo aparelho celular.	45
Figura 5	Representação esquemática do teste de verificação da temperatura da água depositada dentro da calota craniana após corte feito na base inferior da cabeça do animal sacrificado para extração do tecido encefálico.	46
Figura 6	Mecanismo usado para acionar o aparelho celular durante 3 ou 10 dias de exposição. O aparelho celular foi acionado por 25 segundos em intervalos de 2 minutos.	49
Figura 7	Caixa usada para acomodar os animais, o mecanismo acionador do aparelho celular durante o período de 1 hora, 3 horas, 3 dias ou 10 dias de exposição.	50
Figura 8	Imagem representativa dos testes de medição da passagem da radiação.	54
Figura 9	Efeito da exposição apenas ao mecanismo acionador do aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 1.	56

Figura 10	Efeito da exposição apenas ao mecanismo acionador do aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 2.	57
Figura 11	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a expressão de ERK 1.	58
Figura 12	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a expressão de ERK 2.	59
Figura 13	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a atividade de ERK 1.	60
Figura 14	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a atividade de ERK 2.	61
Figura 15	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a expressão de PKC-alfa.	62
Figura 16	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a expressão de ERK 1.	63
Figura 17	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a expressão de ERK 2.	64
Figura 18	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a atividade de ERK 1.	65
Figura 19	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a atividade de ERK 2.	66

Figura 20	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a expressão de PKC-alfa.	67
Figura 21	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a expressão de ERK 1.	68
Figura 22	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a expressão de ERK 2.	69
Figura 23	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 1.	70
Figura 24	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 2.	71
Figura 25	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a expressão de PKC-alfa.	72
Figura 26	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a expressão de ERK 1.	73
Figura 27	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a expressão de ERK 2.	74
Figura 28	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a atividade de ERK 1.	75
Figura 29	Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a atividade de ERK 2.	76

Lista de Tabelas

Tabela 1	Espectro Eletromagnético (SANTIAGO <i>et al.</i> , 2008).	22
Tabela 2	Medidas de campo elétrico.	52
Tabela 3	Valores de campo elétrico ($V \times m^{-1}$) dentro da cela blindada apresentados pela sonda isotrópica.	54
Tabela 4	Efeito da radiação sobre a temperatura da água contida na calota craniana dos animais.	55

Lista de Abreviaturas e Siglas

1G	Primeira Geração
2G	Segunda Geração
3G	Terceira Geração
ABEletro	Software Analisador de Bandas de Eletroforese
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico ou corticotropina
ADH	Hormônio antidiurético ou vasopressina
ANATEL	Agência Nacional de Telecomunicações
Ap-1	Proteína ativadora 1
c – Fos	Proteína codificada pelo gene FOS (da família de genes precoces imediatos)
c – Jun	Proteína codificada pelo gene JUN
CDMA	Acesso Múltiplo por divisão de Código
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
Da	Dalton
DHEA	Androgênios desidroepiandrosterona
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPM	Erro padrão da média
ERB	Estações Rádio Base
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento ou somatotropina
GHIH	Hormônio inibidor do hormônio do crescimento ou somatostatina
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento

GHz	Giga Hertz
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina
GnRHR	Receptor de hormônio liberador de gonadotropina
GSM	Padrão Global Móvel
GTP	Trifosfato de guanosina
HeLa	Linhagem de células cancerosas humanas (câncer de pele)
HSP	Proteínas Sensíveis ao Choque Térmico
Hz	Hertz
IGF	Fator de crescimento semelhante a Insulina (Somatostatina)
JNK	c-Jun N-terminal quinase
kDa	Quilo Dalton
KHz	Quilo Hertz
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	Quinase regulada por sinal mitógeno extracelular
MHz	Mega Hertz
OCT	Ocitocina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIH	Hormônio inibidor da prolactina
PKC	Proteínas quinase C
PRL	Prolactina
PVC	Poli cloreto de vinila
Raf	Proteína codificada pelo protooncogene RAF
Ras	Proteína de Sarcoma vírus de ratos
Rat1	Linhagem de células cancerosas de rato

RNI	Radiações Não Ionizantes
SAPK	Proteína quinase ativada por estresse
SAR	Taxa de Absorção Específica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SMP	Serviço Móvel Pessoal
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TBS	Solução tampão TRIS
TDMA	Acesso Múltiplo por Divisão de Tempo
Thr	Treonina
TRH	Hormônio liberador de tireotropina
TRIS	Tris(hidroximetil)-amino-metano
TSH	Hormônio estimulante da tireóide ou tireotropina
Tyr	Tirosina
$V \times m^{-1}$	Unidade de medida de intensidade de campo elétrico
Wi-Fi	Wireless fidelity

Sumário

1. Introdução	20
1.1 O sistema de comunicação móvel e saúde	20
1.2 Hipotálamo e hipófise	26
1.3 MAPK's (Ras, Raf, MEK 1, MEK 2, ERK 1 e ERK 2) e PKC	33
2. Objetivos	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. Material e Métodos	40
3.1 Obtenção, exposição à radiação e exposição dos animais	40
3.2 Construção do mecanismo acionador do aparelho celular e das caixas especiais dos animais	42
3.3 Medidas de campo elétrico dentro das caixas de manutenção dos animais	43
3.4 Teste para avaliar a capacidade de penetração da radiação emitida pelo aparelho celular através da calota craniana e o efeito sobre a temperatura	44
3.5 Análise da expressão e atividade de ERK 1/2 e expressão da isoforma alfa de PKC	46
3.6 Análise estatística	48
4. Resultados	49
4.1 Construção do mecanismo acionador do aparelho celular	49
4.2 Construção das caixas especiais para acomodação dos animais	50
4.3 Medições de campo elétrico nas caixas de acomodação dos animais	51
4.4 Teste de penetração da radiação emitida pelo aparelho celular através da calota craniana dos animais	53
4.5 Efeito da temperatura da água colocada na calota craniana	55

4.6	Análise da atividade de ERK 1 (3 dias /controle -)	56
4.7	Análise da atividade de ERK 2 (3 dias/controle -)	57
4.8	Análise da expressão de ERK 1 (1 hora)	58
4.9	Análise da expressão de ERK 2 (1 hora)	59
4.10	Análise da atividade de ERK 1 (1 hora)	60
4.11	Análise da atividade de ERK 2 (1 hora)	61
4.12	Análise da expressão de PKC-alfa (1 hora)	62
4.13	Análise da expressão de ERK 1 (3 horas)	63
4.14	Análise da expressão de ERK 2 (3 horas)	64
4.15	Análise da atividade de ERK 1 (3 horas)	65
4.16	Análise da atividade de ERK 2 (3 horas)	66
4.17	Análise da expressão de PKC-alfa (3 horas)	67
4.18	Análise da expressão de ERK 1 (3 dias)	68
4.19	Análise da expressão de ERK 2 (3 dias)	69
4.20	Análise da atividade de ERK 1 (3 dias)	70
4.21	Análise da atividade de ERK 2 (3 dias)	71
4.22	Análise da expressão de PKC-alfa (3 dias)	72
4.23	Análise da expressão de ERK 1 (10 dias)	73
4.24	Análise da expressão de ERK 2 (10 dias)	74
4.25	Análise da atividade de ERK 1 (10 dias)	75
4.26	Análise da atividade de ERK 2 (10 dias)	76
5.	Discussão	77
6.	Conclusões	86
7.	Referências Bibliográficas	87

1.Introdução

1.1 O sistema de telecomunicação móvel e saúde

Nos últimos anos, o sistema de telecomunicação móvel tem crescido significativamente, de modo que um sexto da população mundial utiliza telefones móveis. No final de 2004, em cerca de 200 países, foi estimado mais de um bilhão de usuários de aparelhos celulares (National Radiological Protection Board, 2004; Maier, 2006). Segundo a ANATEL, em 1990 existiam cerca de 11 mil aparelhos habilitados no Brasil; no ano 2000, já existiam mais de 20 mil (ANATEL, 2000), e no ano de 2011, existem mais de 202,9 milhões de habilitações, uma densidade de 104,68 acessos para cada 100 habitantes (Anatel, 2011).

O aperfeiçoamento e o desenvolvimento de novas tecnologias, notadamente no campo das comunicações por meio da telefonia móvel, têm suscitado, junto à opinião pública, ao meio científico e à comunidade médica, interessantes debates, particularmente em virtude dos riscos à saúde e das incertezas científicas decorrentes da poluição eletromagnética.

A espantosa evolução da humanidade nos últimos anos trouxe incontestáveis benefícios para a vida moderna no sistema de comunicação mundial. Todavia, em contrapartida, gerou enorme impacto sobre o meio ambiente e sobre a saúde pública, diante da constante radiação não-ionizante dela decorrente, com efeitos possivelmente nocivos (REPACHOLI, 2001)

O homem moderno, principalmente em virtude do mercado de massa gerado por ação do marketing, detendo meios de indução ao consumo de novos serviços e produtos, e pelo avanço das técnicas de publicidade, encontra-se cada vez mais dependente das facilidades oferecidas pelos modernos produtos eletrônicos e pelas novas tecnologias de produção e de fornecimento de serviços. Tal fato é capaz de aumentar o consumo em geral da população (Escola Superior do Ministério Público de São Paulo, 2004).

Atualmente existem três gerações de telefones móveis. A primeira geração (1G) foi implantada na década de 1970, operando com a tecnologia analógica a uma frequência que variava de 450 a 800 MHz. Na década de 1990, surgiu a segunda geração da telefonia móvel (2G), que operava utilizando os padrões de transmissão TDMA (Acesso Múltiplo por Divisão de Tempo), CDMA (Acesso Múltiplo por divisão de Código) e GSM (Padrão Global Móvel). Em 2005, foi implantada a terceira geração de telefones móveis (3G), acompanhada de grandes avanços tecnológicos (ANATEL, 2003).

O padrão TDMA funcionava de forma que vários usuários faziam uso de um mesmo canal ao mesmo tempo, e isso só era possível pelo fato de que a transmissão dos dados era descontínua. O padrão CDMA funciona de forma que o aparelho celular do usuário utilizava um canal codificado que era reconhecido pelo aparelho do receptor sem cruzamento de linhas, além disso, assim como o padrão TDMA usava frequência entre 800 a 900 MHz. Já o padrão GSM, assim como TDMA e CDMA, é um sistema de transmissão digital, porém, é a versão mais moderna do padrão TDMA que opera através de um cartão *Sim* (*Sim-Card*) que proporciona acesso mais rápido à Internet e opera a uma frequência que pode variar de 900 a

1900 MHz. A terceira geração de telefones móveis é a tecnologia 3G que garante alta velocidade e qualidade na transmissão de dados (imagens, músicas e mensagens) e voz; tal tecnologia opera utilizando frequências acima de 2.1 GHz. O aumento da frequência de operação proporciona maior eficiência na transmissão de dados (Organização Mundial da Saúde, 2006; ANATEL, 2003).

Para ambos os tipos de telefonia móvel, analógica e digital, os sinais transmitidos e recebidos estão na forma de microondas. Esse tipo de radiação é caracterizada como radiação não-ionizante, com frequências que variam de 300 MHz a 300 GHz (Tabela 1) (SÁNCHEZ, 2006).

Tabela 1: Espectro Eletromagnético (SANTIAGO *et al.*, 2008).

Região	Frequência (Hz)	Comprimento de onda (cm)
Rádio	$< 3 \times 10^9$	> 10
Microondas	$3 \times 10^9 - 3 \times 10^{12}$	$10 - 0,01$
Infravermelho	$3 \times 10^{12} - 4,3 \times 10^{14}$	$0,01 - 7 \times 10^{-5}$
Visível	$4,3 \times 10^{14} - 7,5 \times 10^{14}$	$7 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-5}$
Ultravioleta	$7,5 \times 10^{14} - 3 \times 10^{17}$	$4 \times 10^{-5} - 10^{-7}$
Raios - X	$3 \times 10^{17} - 3 \times 10^{19}$	$10^{-7} - 10^{-9}$
Raios - Gama	$> 3 \times 10^{19}$	$< 10^{-9}$

Os aparelhos celulares e estações de base emitem microondas. A exposição a essas radiações pode afetar diretamente a saúde (Organização Mundial da Saúde, 2006). Tal fato tem gerado preocupação motivada essencialmente pelas incertezas

científicas quanto a sua nocividade à saúde humana, especialmente devido aos efeitos térmicos da absorção das radiações não-ionizantes (RNI). Os efeitos térmicos são bem conhecidos, e são considerados nas normas mais difundidas que limitam a exposição às radiações não-ionizantes (Escola Superior do Ministério Público de São Paulo, 2004).

Em virtude da grande disseminação da comunicação por telefonia, têm-se preocupado tanto com os transmissores móveis (telefones celulares) quanto com os fixos (Estações Rádio Base – ERBs). Via de regra, as ERBs emitem potências muito maiores que os aparelhos móveis, mas como normalmente as pessoas estão razoavelmente afastadas das antenas das ERBs (mais que 50 a 100 metros em sua direção de maior irradiação), a taxa de absorção específica (SAR – Specific Absorption Rate) calculada em qualquer região do corpo, resulta em valores abaixo dos níveis limites das normas mais difundidas, especialmente aquelas que consideram somente os efeitos térmicos. Por outro lado, no caso dos telefones móveis, observa-se que a SAR calculada na cabeça dos usuários dos aparelhos que utilizam as antenas tipo monopolo convencionais, nas condições normais de uso, é significativamente maior que os limites estabelecidos nas normas, mesmo aquelas que consideram apenas os efeitos térmicos (BERNARDI *et al.*, 2001; ISKANDER, YUN & QUINTERO-LLERA, 2000; JENSEN & RAHMAT-SAMII, 1995).

Obviamente, se fossem considerados também os efeitos não térmicos, a situação seria muito mais crítica para os usuários desses telefones móveis. Isso devido ao tipo convencional de antena usado (monopolo) que irradia de forma quase simétrica em um plano perpendicular a elas. Em condições normais de uso, quando

essa antena é operada muito próxima à cabeça, cerca de 2,5 centímetros ou menos, a maior parte da energia irradiada é absorvida pelos tecidos da cabeça, como, por exemplo, o cérebro, e uma parcela menor de potência é irradiada para o sentido da ERB com a qual o equipamento se comunica. Essa situação é desaconselhável uma vez que diminui a qualidade da comunicação e aumentam os riscos à saúde dos usuários, além do maior consumo de bateria (Escola Superior do Ministério Público de São Paulo, 2004).

Por muito tempo, só foi possível interconectar computadores através de cabos. Mais recentemente, com o advento do Wi-Fi (do inglês "*Wireless fidelity*") passou a ser possível a interconexão de computadores através de redes sem fios. A utilização desse tipo de rede tem se tornado cada vez mais comum não só nos ambientes domésticos e empresariais, mas também em locais públicos como bares, shoppings, livrarias, aeroportos e instituições acadêmicas. Novas preocupações, agora em relação às radiações eletromagnéticas do Wi-Fi podem ser detectadas através da imprensa mundial.

Uma onda de especulações sobre eventuais efeitos nocivos do Wi-Fi à saúde gerou um movimento em escolas inglesas. Uma espécie de fobia levou várias instituições a tirar suas redes sem fio do ar. Professores e pais de alunos culpavam as ondas do Wi-Fi por efeitos como dores de cabeça e náuseas sentidas pelos alunos. A discussão foi parar nas páginas do jornal "The Times" que recebeu um grande número de cartas dos leitores (INFOABRIL, 2006).

Pesquisas sobre o efeito da radiação de microondas são muito heterogêneas. Esses estudos incluem culturas de células e tecidos (*in vitro*) (FRIENDMAN et al. 2007) e animais de laboratório (*in vivo*) (WEISBROT et al. 2003), além de seres humanos (voluntários) (BLACK & HEYNICK, 2003; Organização Mundial da Saúde, 2006). Por um lado, essas pesquisas têm como foco mudanças funcionais no cérebro e efeitos na cognição e bem-estar, isto é, a interferência da radiação sobre o sistema nervoso central (Organização Mundial da Saúde, 2006; BERNHARDT, 1992; BRONZINO, 1995). Por outro lado, esses estudos analisam a relação entre o uso desses aparelhos móveis e processos carcinogênicos, a reprodução e o desenvolvimento, o sistema cardiovascular e a longevidade, ou seja, o efeito da exposição à radiação sobre todo o organismo. Porém, resultados quanto às alterações em nível molecular associadas com o desenvolvimento de câncer são inconsistentes e contraditórios (Organização Mundial da Saúde, 2006).

Estudos epidemiológicos se concentram na possibilidade de relação entre o uso de telefones móveis e a ocorrência de tumores cerebrais, neuromas acústicos, tumores de glândulas salivares, leucemias e linfomas (Organização mundial da saúde, 2006; BERNHART, 1992; BRONZINO, 1995). Brahim Selmaoui, Jacques Lambrozo e Yvan Toutilou relataram em 1997 que homens russos apresentavam fadiga, dor de cabeça, perda de sono e outros distúrbios após serem expostos à campos eletromagnéticos de baixa frequência, e além disso, reforçam a possível associação entre depressão e esse tipo de radiação.

Os primeiros sinais de neurotoxicidade em um organismo refletem-se primariamente em mudanças dos padrões de comportamento e, posteriormente, nos

anatômicos (SAILZINGER, 1994). As variações de comportamento dos animais são conseqüências de distúrbios de saúde, e alguns estudos mostram mudanças comportamentais cognitivas em primatas não-humanos, quando expostos a campos de alta e baixa freqüência e por isso, é bastante clara a necessidade de estudos em humanos (REPACHOLI, 2001).

Em 2002, foi demonstrado que campos eletromagnéticos podem afetar tecidos vivos, mesmo possuindo energia muito menores comparados àqueles que causam mudanças na temperatura desses tecidos (LESZCZYNSKI et al. 2002). Uma das respostas celulares mais freqüentes quanto à curta exposição a campos eletromagnéticos na freqüência de microondas é a indução de transcrição de proteínas específicas (GOODMAN & BLANK, 2002), como as proteínas *heat-shock* (HSPs) (LIN et al. 1997; FRENCH et al. 2001; LESZCZYNSKI et al. 2002; CARANGLIA et al. 2005). Similarmente, ondas de alta freqüência irradiadas por esses aparelhos também podem afetar a expressão de proteínas, tais como as proteínas c-Jun e c-Fos (CHAUHAN et al. 2006a, STAGG et al. 2001). O aumento da expressão dessas proteínas, causado por telefones móveis, pode induzir diversos processos celulares, incluindo replicação (NYLUND & LESZCZYNSKI, 2004), progressão do ciclo celular (CAPRI et al. 2004) e até apoptose (CARANGLIA et al. 2005; HOOK et al. 2004).

1.2 Hipotálamo, hipófise

A hipófise, também conhecida como pituitária, é uma pequena glândula que fica localizada na sela túrcica – uma cavidade óssea na base do cérebro – e se liga

ao hipotálamo através do pedúnculo hipofisário, também conhecido por infundíbulo, através do qual é controlada por mecanismos neuronais e hormonais (CONSTANZO, 2005). Em humanos, ela apresenta diâmetro de aproximadamente 1 centímetro e pesa de 0,5 à 1 grama (GUYTON & HALL, 2006).

Fisiologicamente, a hipófise possui duas porções distintas: a hipófise anterior, também chamada de adeno-hipófise e a hipófise posterior ou neuro-hipófise. Entre estas duas regiões existe outra porção chamada de pars intermedia, quase sempre inexistente em humanos, porém, é maior e mais funcional em alguns animais inferiores.

Embriologicamente, as duas porções possuem origens diferentes – a hipófise anterior surge a partir de uma invaginação embrionária do epitélio faríngeo chamada de bolsa de Rathke; já a hipófise posterior é derivada do crescimento de um tecido neural a partir do hipotálamo. A origem de cada uma dessas regiões é capaz de explicar a natureza epitelióide das células da porção anterior, e a natureza neural das células da porção posterior, na qual se observa grande número de células gliais (GUYTON & HALL, 2006).

O hipotálamo e a hipófise atuam de forma coordenada, para harmonizar muitos sistemas endócrinos. A unidade hipotálamo-hipófise regula o funcionamento da tireóide, da supra-renal e gônadas, além de controlar, o crescimento, a produção e ejeção de leite e a osmorregulação, tudo isso por secreção de hormônios (Figura 1) (CONSTANZO, 2005).

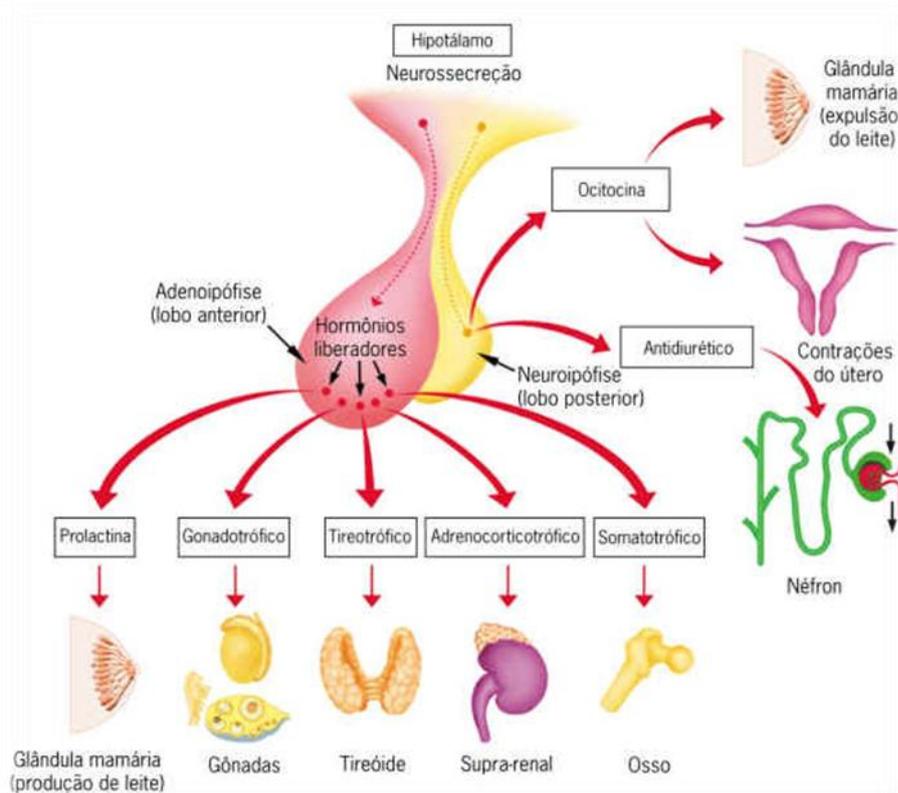


Figura 1: Representação da relação hipotálamo-hipófise com a regulação de glândulas e tecidos (CÉZAR & CEZAR, 2002).

Os mais importantes hormônios peptídicos sintetizados e secretados pela adeno-hipófise são o hormônio do crescimento ou somatotropina (GH), estimulante da tireóide ou tireotropina (TSH), prolactina (PRL), hormônio folículo-estimulante (FSH), luteinizante (LH) e o adrenocorticotrópico ou corticotropina (ACTH). Os dois hormônios peptídicos mais relevantes da neuro-hipófise são o antidiurético ou vasopressina (ADH) e a ocitocina.

O hormônio do crescimento é produzido e secretado pelos somatotropos, possui 191 aminoácidos em uma única cadeia e apresenta massa molecular de 22.005 Daltons (Da). Ele promove o crescimento de quase todos os tecidos do corpo que são capazes de crescer, aumentando o número e tamanho das células, como,

por exemplo, em células de crescimento ósseo e musculares, responsáveis por promover o crescimento dos ossos longos. Além disso, estimula a proliferação celular do tecido cartilaginoso, pelo aumento da síntese e diminuição do catabolismo de proteínas, aumentando o transporte de aminoácidos e o nível de RNA's mensageiros nas células, além de ser responsável pelo metabolismo de carboidratos e lipídeos controlando a utilização da glicose pelos tecidos e a lipólise (AIRES, 1991; GUYTON & HALL, 2006).

O hormônio estimulante da tireóide ou tireotropina (TSH) é uma glicoproteína composta de uma subunidade alfa com 89 aminoácidos e uma beta com 112 possuindo, juntas, massa molecular de aproximadamente 28.000 Da e é produzido pelos tireotropos. Ele é responsável pelo aumento da proteólise de tireoglobulinas armazenadas nas células foliculares da glândula tireóide provocando a liberação de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) que foram sintetizadas por essas mesmas células. Também é responsável pelo aumento da atividade da bomba de iodeto, aumentando a taxa de captação desse íon pelas células glandulares, além disso, gera aumento da iodização da tirosina gerando os hormônios da tireóide T3 e T4, e promove o aumento do número e da atividade secretória das células tireoidianas (AIRES, 1991; ANTUNES, *et al.*, 2004).

A prolactina é um hormônio peptídico de cadeia única com 198 aminoácidos, possuindo massa molecular de 150.000 Da, é produzida pelos lactotrofos e é responsável pela promoção de secreção de leite pelas glândulas mamárias (GUYTON & HALL, 2006).

O hormônio luteinizante e o folículo-estimulante são dois hormônios glicoprotéicos gonadotrópicos e são produzidos e secretados por tipos celulares especializados da hipófise anterior, chamados gonadotropos. Ambos possuem duas subunidades, uma alfa e outra beta. A subunidade alfa do LH e do FSH possui 89 aminoácidos, porém, a beta de cada um deles possui quantidades diferentes de aminoácido, 112 e 115, respectivamente, e massa molecular de aproximadamente 30.000 Da. De formas diferentes, eles controlam o crescimento e a atividade hormonal e reprodutiva dos testículos e ovários. Por um lado, o FSH regula o desenvolvimento dos folículos ovarianos e regula a espermatogênese nos testículos, por outro lado o LH promove a ovulação e formação do corpo lúteo nos ovários, estimula a produção de estrogênio e progesterona por essas gônadas e estimula a produção de testosterona pelos testículos (LOHMEIER, 2003; LONGO & FINCH, 2003).

O hormônio adrenocorticotrópico é produzido e secretado por células especializadas da adeno-hipófise chamadas de corticotropos e possui uma única cadeia composta por 39 aminoácidos e é o responsável por coordenar a secreção dos hormônios adrenocorticais: cortisol, androgênios e estrogênios adrenais produzidos pelas células da zona fasciculada e dos androgênios desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona produzidos pela zona reticular, ambas zonas do córtex adrenal (GUYTON & HALL, 2006; LONGO & FINCH, 2003).

A neuro-hipófise, outra região muito importante da hipófise, é composta basicamente por pituícitos - células muito semelhantes às células gliais - e não são capazes de secretar hormônios. Elas servem como suporte para as inúmeras fibras

nervosas terminais e terminações nervosas que são originadas dos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo que chegam até a neuro-hipófise através do pedúnculo hipofisário (infundíbulo), sendo as responsáveis pela secreção de dois importantes hormônios da hipófise posterior: o hormônio antidiurético (ADH), também chamado de vasopressina e a ocitocina (GUYTON & HALL, 2006).

O ADH é sintetizado em maior quantidade por corpos celulares de neurônios no núcleo supra-óptico e, em menor proporção, pelo núcleo paraventricular e é transportado e liberado pelas terminações nervosas até a neuro-hipófise e logo é captado por capilares adjacentes. Este hormônio, assim como a ocitocina, é um pequeno polipeptídeo constituído por nove aminoácidos e tem a função de permitir a reabsorção de água que foi excretada pelos ductos e túbulos secretores renais. Assim, o ADH tem a função de fazer o controle osmótico e também exerce efeitos vasoconstritores (diminuição do calibre de vasos sanguíneos) quando liberado em grandes quantidades na corrente sanguínea, sendo por isso, também chamado de vasopressina (LOHMEIER, 2003; LONGO & FINCH, 2003).

A ocitocina é sintetizada principalmente nos corpos celulares de neurônios do núcleo paraventricular, mas também, em menor quantidade, pelo supra-óptico. Tem a função de estimular a contração uterina de mamíferos gestantes e isso se comprova por sua alta concentração plasmática durante o trabalho de parto e pelo fato de que em animais hipofisectomizados (animais que tiveram a sua hipófise extraída por intervenção cirúrgica) apresentarem aumento do tempo de trabalho de parto. Além disso, ela atua na ejeção do leite pelas glândulas mamárias, fazendo

com que a o leite seja expulso dos alvéolos para os ductos mamários, onde pode ser sugado pelo bebê (GUYTON & HALL, 2006).

A síntese e secreção de todos os hormônios hipofisários citados acima são controlados pelo hipotálamo, seja por mecanismos neurais ou hormonais (CONSTANZO, 2005). Esta glândula se localiza abaixo do tálamo e exerce, claramente, um papel importante na regulação da função da hipófise. Ele é considerado a estação central de coleta e integração de sinais vindos de diversas regiões do organismo e que os redistribui para a hipófise. O controle hormonal feito pelo hipotálamo sobre a hipófise ocorre pela produção e liberação de seus hormônios por neurônios oriundos de diversas áreas do hipotálamo produtores de hormônios liberadores e inibidores hipotalâmicos. Tais hormônios são secretados na eminência mediana (região inferior do hipotálamo) e no tuber cinereum (região do hipotálamo que se estende para o pedúnculo hipofisário) e são captados pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário que desembocam nos vasos sinusóides da hipófise. São os chamados hormônios liberadores e hormônios inibidores de hormônios hipofisários (GUYTON & HALL, 2006; CONSTANZO, 2005).

A função dos hormônios hipotalâmicos de liberação e inibição é controlar a secreção dos hormônios da hipófise anterior e dentre os principais hormônios hipotalâmicos estão: o hormônio liberador de tireotropina (TRH) que age sobre os tireotropos estimulando a liberação do hormônio estimulante da tireóide (TSH); o hormônio liberador de corticotropina (CRH) que atua sobre os corticotropos, estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH); o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) que age promovendo a liberação do

hormônio do crescimento (GH) e de outro hormônio hipotalâmico, o inibidor do hormônio do crescimento (GHIH ou somatostatina) que inibe a liberação do hormônio do crescimento; o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) que estimula a liberação dos hormônios luteinizante e folículo-estimulante (LH e FSH) e por último, o hormônio inibidor da prolactina (PIH) que diminui a secreção de prolactina (PRL) (CONSTANZO, 2005; LOHMEIER, 2003; LONGO & FINCH, 2003).

1.3 MAPK's (Ras, Raf, MEK 1, MEK 2, ERK 1, ERK 2) e PKC

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK's) são proteínas que compõem uma família de serino/treonino quinases ativadas por fosforilação em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, o que dispara a fosforilação e ativação de numerosas proteínas intracelulares. As MAPK's são divididas em 3 subgrupos: 1) as ERK's (quinase regulada por sinal extracelular), que inclui a p42 (ERK 1) e a p44 (ERK 2); 2) proteínas quinase ativadas por estresse (c-Jun N-terminal quinase/ JNK); 3) grandes MAP quinases (BMK – Big MAP kinase) (ERK 5) (KLAUSEN *et al.* 2005).

A via de sinalização de MAPK's é o principal mecanismo de regulação da atividade transcricional gerada por estímulo extracelular, atuando na proliferação, diferenciação, metabolismo e resposta ao estresse (RUBINFELD & SEGER, 2005; SEGER & KREBS, 1995; YOON & SEGER, 2006). As enzimas ERK 1 e ERK 2 ativam diretamente fatores de transcrição gênica de hormônios hipofisários tais como GH, FSH e LH (KLAUSEN *et al.* 2005; DUAN *et al.* 2002). Além disso, também atuam diretamente na síntese e secreção dos hormônios hipotalâmicos e hipofisários (KLAUSEN *et al.* 2005). Dentre as proteínas que participam de vias de

sinalização de MAPK's estão a Ras, Raf, MEK 1, MEK 2, ERK 1 e ERK 2 (da família de proteínas serino/treonino quinases cuja ativação depende da fosforilação concomitante dos resíduos de serina e treonina da própria quinase), JNK (C-Jun N-terminal kinase) (FRIENDMAN *et al.* 2007; LESZCZYNSKI *et al.* 2002), SAPK 1 (proteína quinase ativada por estresse - 1), p38MAPK (SAPK 2) e BMK1 (grande MAPK 1; também conhecida como ERK 5) que são ativadas por seqüências de fosforilação, ativando proteínas regulatórias, incluindo fatores de transcrição, induzindo a expressão de genes. Segundo Joseph Friedman e colaboradores (2007), células em cultura do tipo Rat1 e HeLa apresentam aumento da expressão de ERK 1 e ERK 2 quando expostas à radiação de aparelhos celulares; tal fato pode acarretar em aumento da proliferação dessas células, sendo assim, relacionada com possível ocorrência de câncer.

A via de sinalização de ERK 1 e ERK 2 nas células da hipófise ocorre a partir, por exemplo, da ligação de um sinal tal como o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), secretado pelo hipotálamo, a uma proteína de membrana receptora específica, neste caso o receptor de GnRH (GnRHR), um receptor tirosino-quinase específico para este hormônio, e que, por sua vez, passa por um processo de autofosforilação fazendo com que a enzima Ras receba uma molécula de GTP (trifosfato de guanosina). A Ras torna-se ativa e, assim, adiciona um grupamento fosfato em um resíduo de aminoácido serina e outro em treonina da enzima Raf que, por sua vez, faz o mesmo nas enzimas MEK 1 e MEK 2 (quinase regulada por sinal mitógeno extracelular), que fosforilam resíduos dos aminoácidos treonina e tirosina de ERK 1 e ERK 2 que também se tornam ativas. ERK 1 e ERK 2 ativadas entram no núcleo e fosforilam fatores de transcrição que agem permitindo a expressão dos genes referentes aos hormônios hipofisários. A transdução de sinais desta mesma

via também ocorre nas células hipotalâmicas, porém, a sua ativação se dá por outros sinais e promovem a síntese e secreção de hormônios hipotalâmicos, sejam eles inibidores ou indutores de liberação de hormônios hipofisários (Figura 2) (RUBINFELD & SEGER, 2005; KLAUSEN *et al.* 2005).

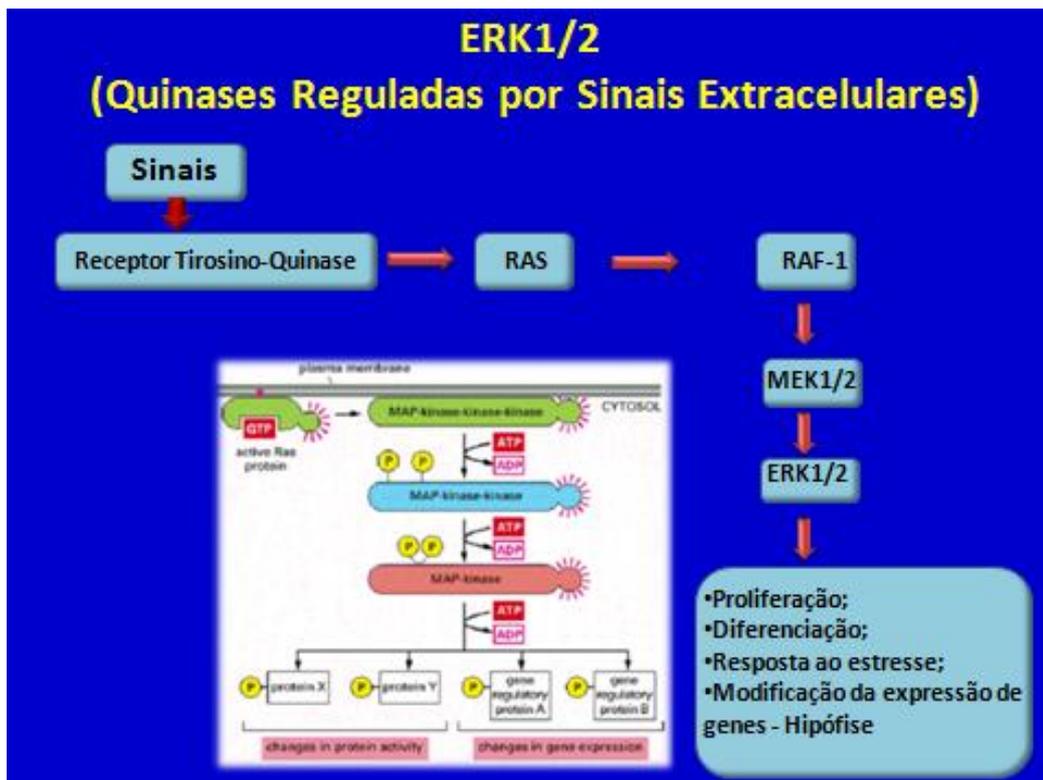


Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização das MAPK's, ERK 1 e ERK 2 e algumas das funções que coordenam (ALBERTS *et al.*, 2004).

As proteínas quinase C (PKC) fazem parte de outra família de quinases serino/treonina que está envolvida no controle de transformação neoplásica, carcinogênese, invasão de células tumorais e resistência a drogas. O papel dessa proteína na geração de tumores é complexo e depende das isoformas de PKC e dos tipos celulares/teciduais envolvidos (FIELDS & GUSTAFSON, 2003). Tais proteínas são a chave regulatória da proliferação celular, diferenciação e apoptose (ZHU *et al.* 2005). Elas também atuam na via de sinalização de ERK 1 e ERK 2 e sua

participação se dá por modificação na conformação da enzima Ras, promovendo a transdução de sinais até que ocorra a ativação de ERK 1 e ERK 2 por fosforilação (RUBINFELD & SEGER, 2005).

A família PKC é uma família heterogênea de proteínas quinases que regulam a atividade de várias outras proteínas. A fosforilação e desfosforilação de enzimas são importantes mecanismos utilizados para ativação e desativação da atividade enzimática (ALBERTS *et al.* 2006). Essas enzimas foram descobertas em 1977 por Nishizuka e colaboradores que as descreveram como uma proteína ativadora de histonas, cujo funcionamento é dependente de Ca^{2+} , fosfatidilserina, diacilglicerol ou forbol éster (WILKINSON & HALLAM, 1994).

Pelo menos 11 isoformas de PKC são conhecidas. Elas diferem entre si devido à estrutura, cofatores requeridos para a ativação e especificidade para o substrato. Estas isoformas são divididas em três grupos de acordo com os cofatores requeridos para a ativação: 1) as proteína quinase C convencionais (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ) que necessitam de diacilglicerol, fosfatidilserina e Ca^{2+} para serem ativadas; 2) as proteínas quinase C novas (δ , ϵ , η , θ , μ) que requerem apenas diacilglicerol e fosfatidilserina para a ativação, sendo portanto Ca^{2+} independentes; e 3) as proteínas quinase C atípicas (λ , ι , ζ) que não precisam de Ca^{2+} e nem de diacilglicerol para se tornarem ativadas. A regulação desse grupo de PKC não está claramente estabelecida, mas sabe-se que sua atividade é estimulada por fosfatidilserina (RUBINFELD & SEGER, 2005).

Todas as proteínas quinase C consistem em uma única cadeia polipeptídica que contém uma região regulatória amino-terminal de 20-70 kDa e um domínio quinase carboxi-terminal de aproximadamente 45 KDa (NEWTON, 1997). O diacilglicerol se liga à primeira região conservada (C1) do domínio regulatório da enzima PKC (WILKINSON & HALLAM, 1994). O diacilglicerol é um produto da clivagem do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato que está presente em pequenas quantidades na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática pela fosfolipase C- β (ALBERTS *et al.* 2006). Como o diacilglicerol permanece ligado à face citosólica da membrana, para que ocorra a ativação de proteínas quinase C convencionais e novas é necessário a translocação da PKC do citosol para a face interna da membrana plasmática. A ligação de Ca^{2+} intracelular na região C2 da PKC causa essa translocação possibilitando que a isoforma de proteína quinase C seja ativada pela ligação de diacilglicerol e fosfatidilserina no domínio C1 (WILKINSON & HALLAM, 1994; NEWTON, 1997; JAKEN, 1996).

Estudos indicam que a isoforma alfa de PKC está presente em células do núcleo paraventricular hipotalâmico, atuando na via que induz a secreção de hormônios hipotalâmicos indutores e inibidores de secreção de hormônios hipofisários, como por exemplo, a secreção do GnRH que induz a liberação de LH e FSH (Klausen, 2005b). Além disso, a PKC-alfa atua em células catecolaminérgicas cerebrais, induzindo a secreção de catecolaminas (BENAVIDES, 2005).

Após a secreção de GnRH pelo hipotálamo, ocorre ligação deste hormônio ao seu receptor específico (GnRHR) localizado na membrana das células gonadotróficas da hipófise. Tal evento estimula o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático, derivado de estoques internos, por liberação ativada por IP_3 (Inositol

1,4,5, – trifosfato) ou por influxo através de canais de Ca^{2+} , tipo L, sensíveis à voltagem, promovendo a transdução de sinais, via PKC-alfa e MAPK's até que aumente a expressão de genes dos hormônios gonadotrópicos LH e FSH (BURGER *et al.*, 2008). Tal fato já havia sido relatado, em 1993, por Haisenleder e colaboradores, após testes feitos em ratos.

Em 2005, Christian Klausen e colaboradores relataram que a isoforma alfa de PKC, ERK 1 e ERK 2 estão diretamente envolvidas na expressão do gene de GH (hormônio de crescimento), o que ocorre nas células somatotróficas da hipófise. Além disso, reportaram que a via das MAPK's pode ser ativada de maneira dependente e independente de PKC. Nesta glândula, a PKC pode promover a ativação da enzima Ras, o que acarreta na transdução de sinais até que ocorra a expressão de hormônios hipofisários.

Diante dessas informações se torna clara a grande importância dessas enzimas para o perfeito funcionamento da hipófise, e, conseqüentemente, na homeostase do sistema endócrino. Além disso, é de suma importância, que se verifique a possível influência da radiação emitida por aparelho celular sobre o funcionamento desta glândula.

2.Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para a compreensão do efeito de ondas eletromagnéticas irradiadas por aparelhos celulares sobre o sistema nervoso central.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer modelo animal para estudar o efeito da radiação de telefones móveis sobre a fisiologia de ratos Wistar;
- Estudar o efeito da exposição de ratos Wistar à radiação de ondas eletromagnéticas emitidas por aparelhos celulares sobre a expressão e atividade de ERK1 e ERK2, e expressão de isoforma alfa de PKC em células da hipófise.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção, exposição à radiação e sacrifício dos animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 60 dias, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas (7 às 19 h - claro e 19 às 7 h - escuro).

Foram criados quatro grupos experimentais dos quais em dois destes os animais foram expostos a ondas eletromagnéticas emitidas por aparelho celular (*Siemens* Modelo A55) que opera a uma frequência de 1800 MHz, sem a interferência do som do toque ou sistema de vibração, ao executar ligações de 25 segundos em intervalos de 2 minutos, durante três ou dez dias. Para execução destes dois tipos de exposição foi desenvolvido um equipamento denominado “*mecanismo de acionamento do aparelho celular*” que foi usado para executar as ligações. Os outros dois grupos foram expostos sob o mesmo tipo de radiação, porém, um deles foi exposto por um período de uma hora e o outro por três horas, ambos sem intervalo a fim de simular ligações de 1 hora ou 3 horas, e por isso, sem o auxílio do mecanismo de acionamento do aparelho celular. Para cada grupo experimental havia um grupo controle que não foi exposto. Pelo fato de o “*mecanismo de acionamento do aparelho celular*” emitir ruído ao funcionar, também foram criados grupos controles negativos referentes aos tratamentos de 3 dias e de 10 dias de exposição, sendo que cada um deles também possuía um grupo controle. Essa medida foi realizada para verificar se a presença e o ruído do equipamento exerciam influência sobre a via de sinalização estudada neste trabalho. Durante

todos os tipos de exposição (tratamento), o aparelho celular foi mantido ligado à rede elétrica.

Após a exposição, os animais foram sacrificados utilizando tiopental de sódio na dose de 60 mg/kg, por via intraperitoneal (MASSERANO e WEINER, 1979) e, posteriormente, foi retirada a hipófise. As glândulas foram armazenadas em tubos individuais contendo 400 µL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, na presença de 2 mM de ortovanadato de sódio (responsável por minimizar a desfosforilação de proteínas) e coquetel de inibidores de proteases, sendo o tecido macerado e posteriormente congelado em nitrogênio líquido.

3.2 Construção do mecanismo acionador do aparelho celular e das caixas especiais dos animais

O mecanismo usado para acionar o aparelho celular foi construído no Laboratório de Óptica Aplicada do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

O mecanismo agiu como uma mão mecânica e foi programado para iniciar uma ligação de 25 segundos de duração em intervalos de 2 minutos durante 3 ou 10 dias.

Foram construídas caixas especiais com 40 cm de altura, 60 cm de comprimento e 35 cm de largura e que foram revestidas externamente com papel laminado com o objetivo de evitar a dispersão da radiação emitida pelo aparelho

celular até a caixa dos animais controle que foram mantidos a uma distância de 3 metros da caixa que continha os animais submetidos à radiação do telefone móvel. As tampas das caixas foram adaptadas fazendo um orifício com diâmetro de 17 cm no seu centro, onde foi colocado um tubo de PVC com vários orifícios de 0,5 cm de diâmetro (Figura 7). O objetivo da instalação do tubo foi impedir o contato direto dos animais com o mecanismo acionador do aparelho celular. As caixas dos animais controles e tratados eram idênticas.

Em todas as situações experimentais, a intensidade média da radiação emitida pelo telefone móvel, dentro da caixa contendo os animais do grupo tratado (exposto) foi de $15.5 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$. Dentro da caixa contendo os animais do grupo controle a intensidade média foi aproximadamente cem vezes menor (Tabela 2).

3.3 Medidas de campo elétrico dentro das caixas de manutenção dos animais

Foram feitas medidas de intensidade de campo elétrico dentro da caixa utilizada durante a exposição dos animais ao longo dos quatro tipos de tratamento (1 hora, 3 horas, 3 dias e 10 dias) gerado pela emissão de radiação do aparelho celular (Figura 3). Tal procedimento foi realizado para verificar se existiam variações do campo elétrico dentro desta caixa, já que os animais permaneciam em constante movimento. Também foram feitas medições na caixa dos animais do grupo controle que se localizava a 3 metros de distância da que continha o grupo tratado e enquanto o aparelho celular executava uma ligação.

As medições foram feitas em 3 pontos da caixa dos animais tratados (A, B e C) e em um ponto da caixa dos animais controles (D). O ponto A corresponde ao ponto de maior aproximação dos animais em relação ao aparelho celular (3 cm) dentro da caixa; o ponto B corresponde ao ponto mais distante entre os animais e o aparelho celular (20 cm); o ponto C corresponde a um ponto intermediário (15 cm) e o ponto D corresponde ao local onde foi feita a leitura dentro da caixa contendo os animais controle enquanto o aparelho celular realizava uma ligação dentro da caixa contendo os animais do grupo tratado. As medições feitas no ponto D tiveram como objetivo verificar se a radiação emitida pelo aparelho celular dentro da caixa contendo os animais do grupo tratado poderia afetar os animais da outra caixa (grupo controle) (Figura 3).

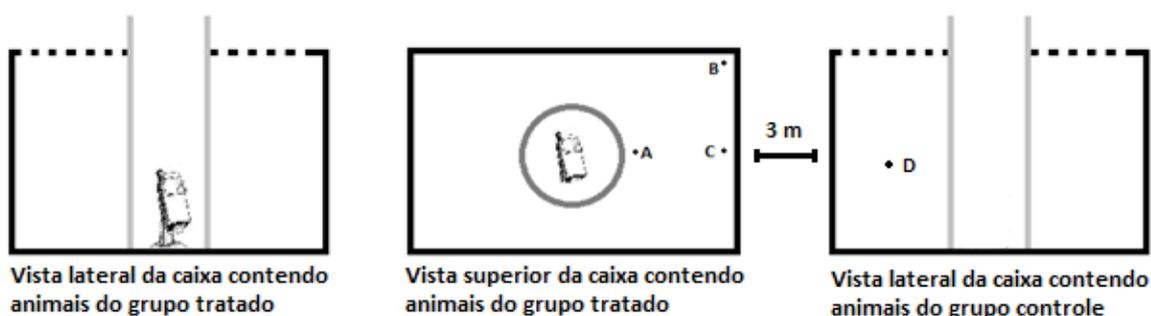


Figura 3: Representação esquemática das medições de radiação emitida por telefone dentro da caixa contendo os animais do grupo controle e exposto.

Foram feitas medições enquanto o aparelho celular efetuava ligação e quando não efetuava, além disso, essas medições foram feitas quando ele estava acoplado à rede elétrica e quando não estava. A indicação ‘‘Ligação’’ na tabela 2 refere-se às medidas feitas enquanto o aparelho efetuava ligação, já a indicação ‘‘Standby’’ refere-se às medidas feitas enquanto o aparelho estava ligado, porém

sem executar ligação. Durante as medições ocorriam variações nas medidas de intensidade, por isso, foram considerados os valores máximos e mínimos.

3.4 Teste para avaliar a capacidade de penetração da radiação emitida pelo aparelho celular através da calota craniana e o efeito sobre a temperatura

Foi construída uma cela blindada revestida por papel laminado a fim de verificar se a radiação emitida pelo aparelho celular era capaz de atravessar os ossos do crânio (Figura 9), atingindo, assim o tecido encefálico, e verificar se esta radiação é capaz de gerar aumento de temperatura destes tecidos dos animais expostos (Figura 5). O papel laminado que reveste a cela teve a função de impedir que a radiação emitida chegasse ao seu interior.

Após o sacrifício de um animal, sob a mesma metodologia citada no item 3.1, a cabeça foi separada do corpo e dela foi retirado todo o tecido que reveste os ossos do crânio. Posteriormente, os ossos da região superior da cabeça (calota craniana) foram separados do restante e encaixados num orifício feito sob medida na cela revestida por papel laminado (cela blindada). O aparelho celular foi posicionado a uma distância de 20 cm ou a 3 cm dessa calota (distância máxima e mínima possível entre a cabeça do animal e o aparelho celular dentro das caixas usadas na experimentação) e foram efetuadas ligações para verificar se a radiação era capaz de atravessar a calota craniana, usando uma sonda isotrópica (sonda de campo) (Wandel & Goltermann) (Figura 4) que fazia medidas de intensidade de campo elétrico gerado por radiação com faixa de frequência compreendida entre 100 KHz e

3 GHz, apresentando leituras em $V \times m^{-1}$, dentro da cela. Também foi feita a mesma medida da radiação que atravessava a caixa com o orifício sem a calota craniana.

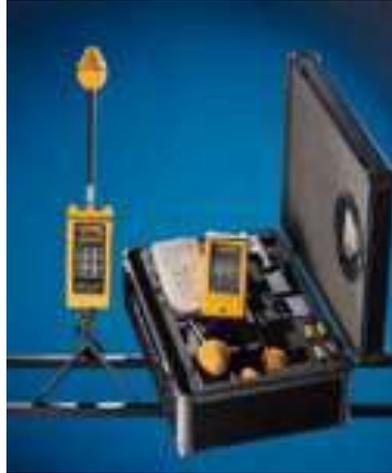


Figura 4: Sonda isotrópica: equipamento utilizado para medir a intensidade do campo elétrico gerado pelo aparelho celular.

Um teste semelhante foi feito para verificar se ocorreria aumento de temperatura do tecido encefálico. Para isso, foram usados outros dois animais e efetuada a separação da cabeça do resto do corpo, seguido da retirada de todo o tecido que revestia a calota craniana e fazendo uma abertura pela região inferior da cabeça a fim de retirar todo o tecido encefálico, sendo substituído por 1,5 mL de água destilada. Logo depois, a cabeça do animal foi encaixada num orifício de 1 x 1,5 cm feito numa placa de papelão suspenso por hastes de bambu para verificar se a radiação era capaz de promover o aquecimento da água presente no crânio usando um termômetro de mercúrio. Este processo foi realizado com exposição do material à radiação emitida pelo aparelho celular posicionado a 3 ou 20 cm durante 1 ou 3 horas de ligação sem interrupção. Também foi feito um teste controle no qual foi utilizado material de outro animal nas mesmas condições descritas acima, porém, que estava num local cuja leitura da intensidade de campo eletromagnético foi nula,

ou seja, sem o efeito da radiação a 5 metros de distância do aparelho celular. Tal manobra foi realizada ao mesmo tempo em que o outro material era exposto à radiação e na mesma sala (Figura 5). Medidas da temperatura ambiente e da água dentro do crânio dos animais expostos e do crânio livre da influência da radiação foram feitas a cada 30 minutos, durante todo o tempo de teste.

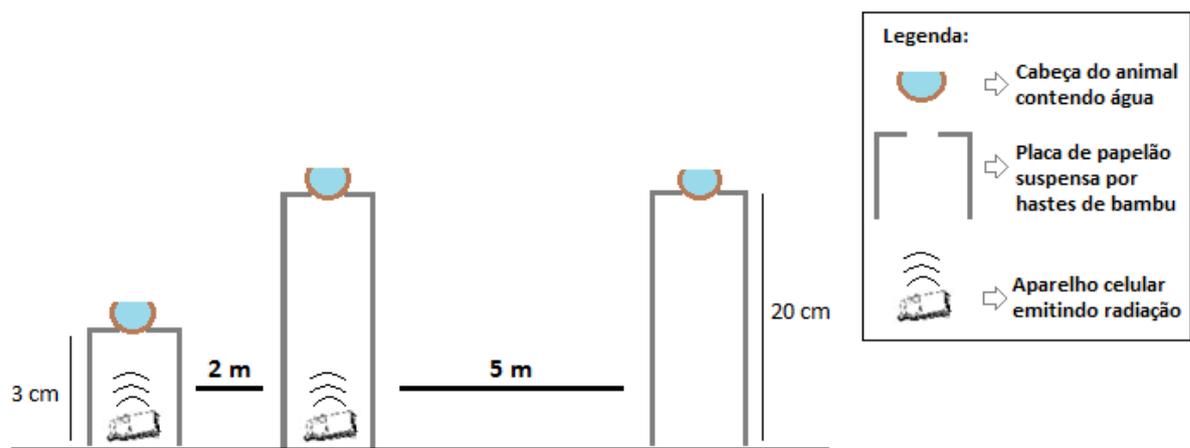


Figura 5: Representação esquemática do teste de verificação da temperatura da água depositada na calota craniana do animal. O material biológico foi encaixado numa placa de papelão contendo um orifício de 1 x 1,5 cm de tamanho. As placas foram suspensas por hastes de bambu permanecendo a 3 ou 20 cm de distância do aparelho celular em funcionamento por 1 ou 3 horas. A temperatura foi verificada introduzindo o termômetro na água contida na calota craniana do animal.

3.5 Análise da expressão e atividade de ERK 1 E ERK 2 e da expressão da isoforma alfa de PKC

Após as hipófises dos animais serem processadas de acordo com a metodologia citada no item 3.1, os homogenatos foram centrifugados por 5 minutos a 10.621 g e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os efeitos da exposição às ondas eletromagnéticas sobre essas proteínas foram analisados através da separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior Western Blot.

Após a dosagem, as proteínas foram desnaturadas em tampão SDS (dodecil sulfato de sódio) na presença de β -mercaptoetanol e aquecimento a 95°C por cinco minutos. Posteriormente foi feita eletroforese usando o equipamento Mini-Protean (Bio-Rad) funcionando a 100 V e com amperagem livre por período de 140 minutos para a separação das proteínas em géis de poliacrilamida 10%, junto com marcadores de massa molecular pré-corados (GE, Healthcare). Foram utilizados 100 μ g de proteínas por amostra. Tal procedimento foi seguido por eletrotransferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose por período de 60 minutos sob a voltagem de 100 V e amperagem livre.

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com tampão Tris (TBS) 20 mM, pH 7,6, por 30 segundos e incubadas em TBS com 5% de leite em pó caseiro, durante 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir as membranas foram novamente lavadas com TBS por 30 segundos e incubadas em solução TBS com 1% de leite, contendo anticorpos primários policlonais contra as enzimas ERK 1 e ERK 2, de massa molecular de 42 kDa e 44 kDa, respectivamente (Cell Signaling Technology), na proporção de 1 μ L de anticorpo para cada 1000 μ L de TBS (1:1000), ou contendo anticorpos primários policlonais contra as enzimas ERK 1 e ERK 2 fosforiladas em resíduos dos aminoácidos treonina (Thr183) e tirosina (Tyr185) (Cell Signaling Technology), na proporção de 1 μ L de anticorpo para cada 1000 μ L de TBS (1:1000) ou contendo anticorpos monoclonais contra o domínio C2 de PKC-alfa (82 kDa) (BD Biosciences), na proporção de 1 μ L de anticorpo para

cada 1000 μL de TBS (1:1000) durante, aproximadamente, 12 horas. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com TBS e incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, com segundo anticorpo conjugado à peroxidase (Life Sciences Ltda.).

Logo depois, as membranas foram lavadas três vezes com TBS e incubadas em solução de revelação com luminol (Kit ECL plus, Amersham Biosciences) seguida de revelação (Hyperfilm – ECL, Amersham) promovendo sua exposição, por 30 segundos para a detecção das bandas geradas pela marcação das enzimas ERK 1 e ERK 2 fosforiladas ou totais ou por 40 minutos para a detecção das bandas geradas pela marcação da enzima PKC-alfa. As proteínas imunorreativas foram digitalizadas e a avaliação/quantificação foi feita com o auxílio do programa ABEletro v 1.0, desenvolvido e patenteado por estudantes e professores do Laboratório de Óptica Aplicada – ICE e do Laboratório de Biologia Celular – ICB da UFJF. Os resultados foram obtidos determinando a área vezes intensidade das bandas analisadas.

3.6 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e as comparações foram feitas usando o teste *t* de Student, considerando significativos os valores de $p < 0,05$. Além disso, os dados também foram avaliados pelo teste Mann Whitney usando o programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

4. RESULTADOS

4.1 Construção do mecanismo acionador do aparelho celular

A Figura 6 é a imagem do mecanismo acionador do aparelho celular, usado nos experimentos.

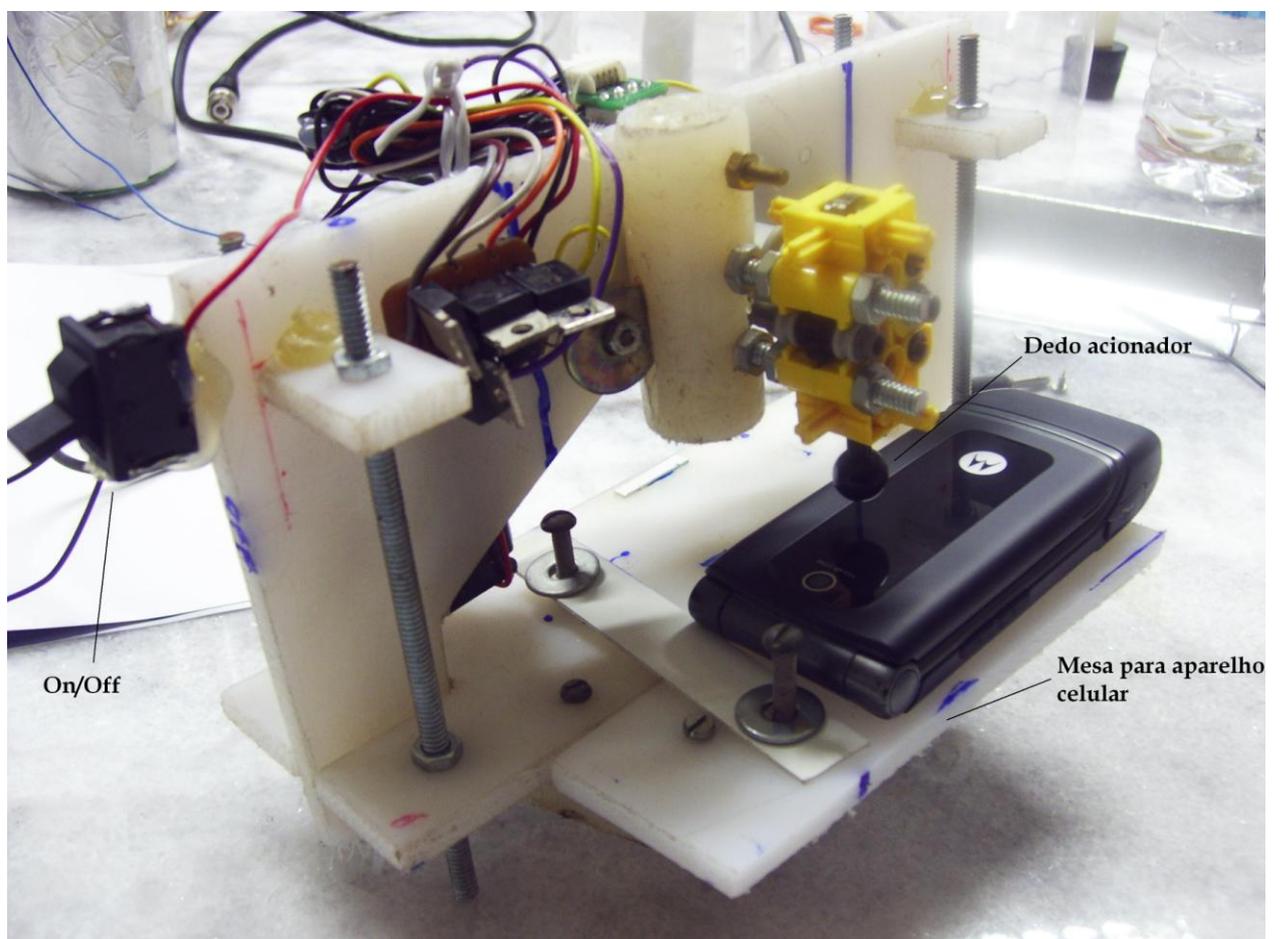


Figura 6: Mecanismo usado para acionar o aparelho celular durante 3 ou 10 dias de exposição. O aparelho celular foi acionado por 25 segundos em intervalos de 2 minutos.

4.2 Construção das caixas especiais para a acomodação dos animais

A Figura 7 é a imagem da caixa usada para acomodar e expor os animais a radiação emitida pelo telefone celular, ou somente acomodar os animais controles.



Figura 7: Caixa usada para acomodar os animais, o mecanismo acionador do aparelho celular durante o período de 1 hora, 3 horas, 3 dias ou 10 dias de exposição.

4.3 Medições de campo elétrico nas caixas de acomodação dos animais

A Tabela 2 apresenta as medidas de campo elétrico feitas pela sonda isotrópica enquanto o aparelho celular efetuava ligações e quando não efetuava. Além disso, essas medições foram feitas quando ele estava acoplado à rede elétrica e quando não estava. Os dados de leitura de intensidade indicados pelo medidor isotrópico são dados em $V \times m^{-1}$.

De acordo com os dados, a intensidade média da radiação emitida quando o aparelho está efetuando ligação quando alimentado pela rede elétrica foi de $15,5 V \times m^{-1}$, enquanto que a valor da média quando não estava ligado a rede elétrica foi de $9,4 V \times m^{-1}$. Além disso, a intensidade média da radiação dentro da caixa contendo os animais controle era de aproximadamente cem vezes menor que o primeiro valor ($0,12 V \times m^{-1}$).

Tabela 2: Medidas de campo elétrico.

Valor	Desligada da rede elétrica		Ligada à rede elétrica		Caixa com animais controle (Ponto D)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
	V x m⁻¹	V x m⁻¹	V x m⁻¹	V x m⁻¹	V x m⁻¹	V x m⁻¹
Ligação (Ponto A)	8	12	15	20	0,11	0,11
Standby (Ponto A)	1	1	8	10	0,11	0,11
Ligação (Ponto B)	8	10	11	19	0,17	0,17
Standby (Ponto B)	0,45	0,5	8,4	8,4	0,17	0,17
Ligação (Ponto C)	6,8	11,5	12	16	0	0,17
Standby (Ponto C)	0,36	0,45	8,2	8,4	0	0,17

4.4 Teste de penetração da radiação emitida pelo aparelho celular através da calota craniana dos animais

A Figura 8 representa a maneira de como foram feitos os testes para avaliar se a radiação emitida pelo aparelho celular tem poder de penetração na caixa craniana e, conseqüentemente, atingir o tecido encefálico.

As leituras de intensidade de campo elétrico dentro da cela blindada, enquanto esta não possuía orifício que permitisse a passagem da radiação, foram 0 V x m^{-1} tanto quando o aparelho celular se localizava a 3 cm quanto a 20 cm de distância da cela (Tabela 3). Após a abertura de um orifício de 1 cm x 1,5 cm, a leitura de intensidade de campo, dentro da cela, foi de $0,35 \text{ V x m}^{-1}$ tanto a 3 cm e a 20 cm de distância entre o aparelho celular e o orifício; após o posicionamento da calota craniana sobre tal orifício, cobrindo-o totalmente e vedando as bordas da calota com papel laminado, a leitura de intensidade observada foi de $0,35 \text{ V x m}^{-1}$ e $0,23 \text{ V x m}^{-1}$ no momento em que o aparelho celular estava posicionado a 3 cm ou 20 cm da cela, respectivamente.

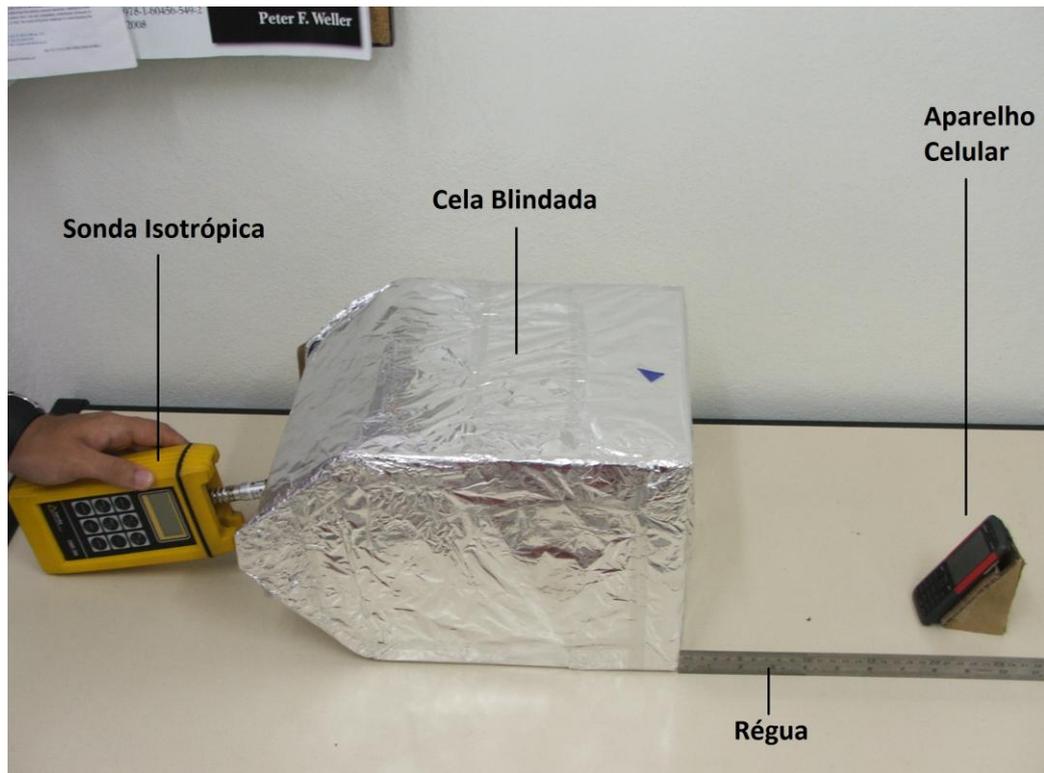


Figura 8: Imagem representativa dos testes de medição da passagem da radiação (medida de intensidade – $V \times m^{-1}$) através da calota craniana que foi posicionada sobre um orifício de $1 \times 1,5$ cm de tamanho feito na cela blindada com papal laminado.

Tabela 3: Valores de campo elétrico ($V \times m^{-1}$) dentro da cela blindada apresentados pela sonda isotrópica.

<i>Distância da calota em relação ao aparelho celular (cm)</i>	<i>Intensidade dentro da cela durante a ligação sem o orifício ($V \times m^{-1}$)</i>	<i>Intensidade dentro da cela durante a ligação sem a calota craniana posicionada no orifício ($V \times m^{-1}$)</i>	<i>Intensidade dentro da cela durante a ligação com a calota craniana posicionada no orifício ($V \times m^{-1}$)</i>
Distância de 3 cm	$0 V \times m^{-1}$	$0.35 V \times m^{-1}$	$0.35 V \times m^{-1}$
Distância de 20 cm	$0 V \times m^{-1}$	$0.35 V \times m^{-1}$	$0.23 V \times m^{-1}$

4.5 Análise do efeito da radiação sobre a temperatura da água colocada na calota craniana

Como descrito em Material e Métodos, foi executado um teste de verificação da temperatura dentro da calota craniana de ratos Wistar (Figura 5).

Durante todo o período do teste, a temperatura da água que estava dentro das calotas cranianas mantidas a 3 ou 20 cm de distância do aparelho celular se manteve igual à temperatura ambiente (Tabela 4). Estes resultados sugerem que a radiação não foi capaz de gerar modificações da temperatura da água contida nas calotas.

Tabela 4: Efeito da radiação sobre a temperatura da água contida na calota craniana dos animais.

<i>Tempo de emissão de radiação</i>	<i>Temperatura ambiente</i>	<i>Temperatura da água na calota controle</i>	<i>Temperatura da água na calota a uma distancia de 3 cm do aparelho celular</i>	<i>Temperatura da água na calota a uma distância de 20 cm do aparelho celular</i>
0 minuto	26° C	26° C	26° C	26° C
30 minutos	26° C	26° C	26° C	26° C
60 minutos (1 hora)	26° C	26° C	26° C	26° C
90 minutos	26° C	26° C	26° C	26° C
120 minutos	26° C	26° C	26° C	26° C
150 minutos	26° C	26° C	26° C	26° C
180 minutos (3 horas)	26° C	26° C	26° C	26° C

4.6 Análise da atividade de ERK 1 (3 dias / controle negativo)

Todas as análises de expressão e atividade protéica foram feitas utilizando a técnica de Western blot (eletroforese: 140 minutos; 100 V; eletrotransferência: 60 minutos; 100 V). Os valores foram obtidos pela medida da área e densidade das bandas sob análise.

A Figura 9 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos não apresentaram modificação significativa na atividade de ERK 1 ($p=0,1293$). O grupo controle (Controle 1) apresentou média de $75,24 \pm 1,838$, $n=2$, enquanto o grupo controle negativo (Controle 2) apresentou média de $70,96 \pm 1,194$, $n=3$, quando estes foram expostos por 10 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p=0,7000$.

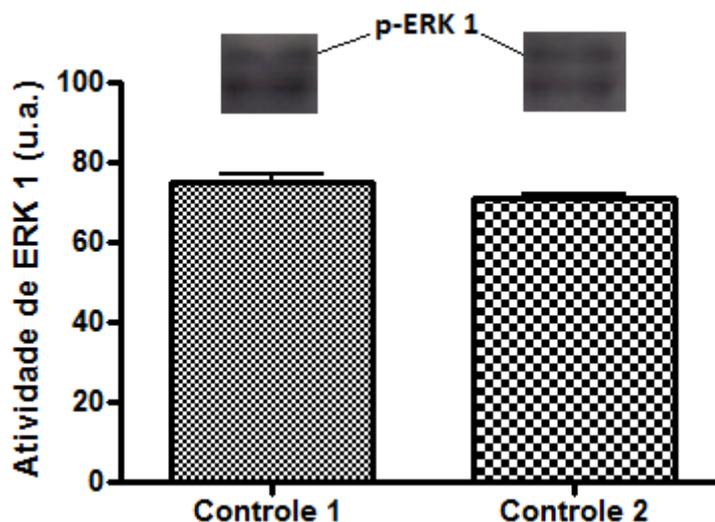


Figura 9: Efeito da exposição apenas ao mecanismo acionador do aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 1 em ratos do grupo controle – Controle 1 ($n=2$) e controle negativo – Controle 2 ($n=3$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.7 Análise da atividade de ERK 2 (3 dias / controle negativo)

A Figura 10 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos aos ruídos do equipamento não apresentaram modificações significativas na atividade de ERK 2 ($p= 0,7068$). O grupo controle apresentou média de $75,97 \pm 2,863$, $n= 2$, enquanto o grupo controle negativo apresentou média de $74,73 \pm 1,650$, $n= 3$, quando estes foram expostos por 10 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,4000$.

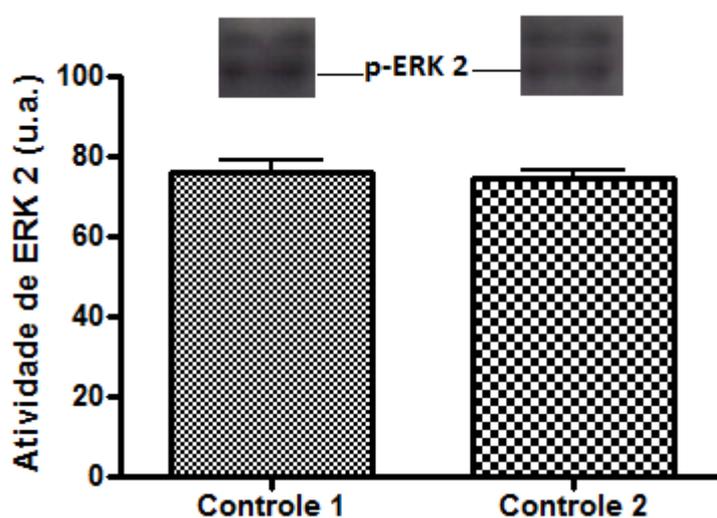


Figura 10: Efeito da exposição apenas ao mecanismo acionador do aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 2 em ratos do grupo controle – Controle 1 ($n= 2$) e controle negativo – Controle 2 ($n= 3$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.8 Análise da expressão de ERK 1 (1 hora)

A Figura 11 apresenta o efeito da radiação sobre a expressão de ERK1. As células hipofisárias não apresentaram alteração significativa na expressão total destas proteínas ($p= 0,9533$). O grupo controle apresentou média de $73,30 \pm 0,4289$, $n= 6$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $73,33 \pm 0,4519$, $n= 6$, quando estes foram expostos por 1 hora à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,6991$.

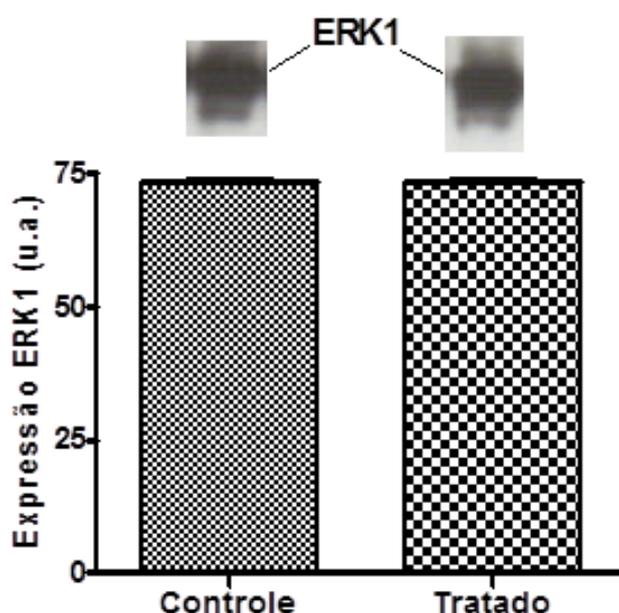


Figura 11: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a expressão de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 6$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.9 Análise da expressão de ERK 2 (1 hora)

A Figura 12 mostra o efeito da radiação sobre a expressão de ERK 2 nas células de hipófise de animais do grupo controle e exposto. As células hipofisárias dos animais submetidos à radiação não apresentaram alteração significativa na expressão de ERK 2 ($p= 0,8380$). O grupo controle apresentou média de $39,12 \pm 4,386$, $n= 6$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $37,92 \pm 3,664$, $n= 6$, quando estes foram expostos por 1 hora à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,8182$.

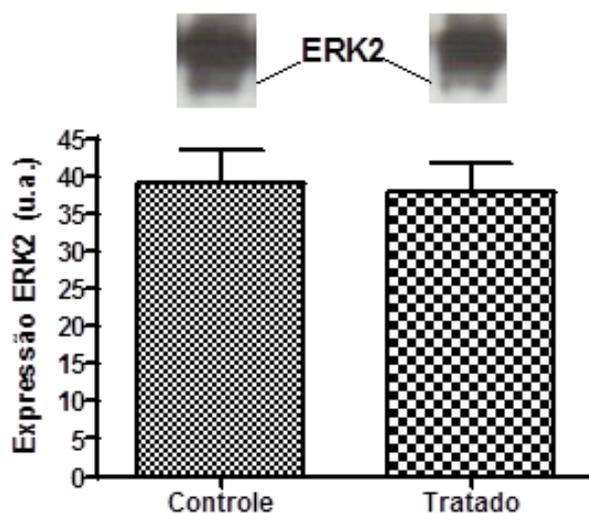


Figura 12: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a expressão de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 6$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.10 Análise da atividade de ERK 1 (1 hora)

A Figura 13 mostra que as células hipofisárias dos animais submetidos à radiação emitida por 1 hora apresentaram redução significativa na atividade de ERK 1 ($p= 0,0042$). O grupo controle apresentou média de $22,21 \pm 2,351$, $n= 5$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $8,669 \pm 2,491$, $n= 5$, quando estes foram expostos por 1 hora à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0159$.

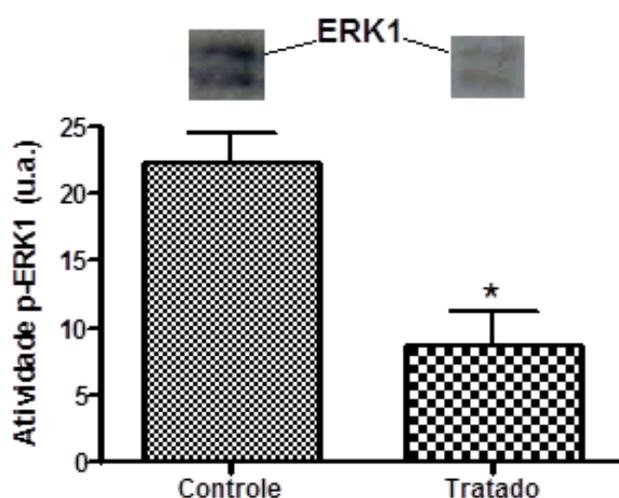


Figura 13: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a atividade de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 5$) e tratado ($n= 5$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.11 Análise da atividade de ERK 2 (1 hora)

A Figura 14 mostra que as células hipofisárias dos animais submetidos à radiação emitida por 1 hora apresentaram diminuição significativa na atividade de ERK 2 ($p= 0,0007$). O grupo controle apresentou média de $24,21 \pm 1,902$, $n= 5$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $9,129 \pm 2,056$, $n= 5$, quando estes foram expostos por 1 hora à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0079$.

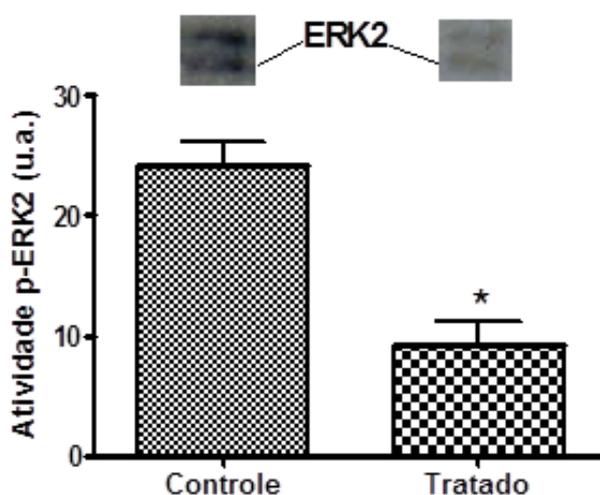


Figura 14: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a atividade de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 5$) e tratado ($n= 5$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.12 Análise da expressão de PKC-alfa (1 hora)

A Figura 15 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos não apresentaram modificação significativa na expressão de PKC-alfa ($p= 0,8562$). O grupo controle apresentou média de $41,67 \pm 1,592$, $n= 3$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $42,20 \pm 1,906$, $n= 5$, quando estes foram expostos por 1 hora à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 1,0000$.

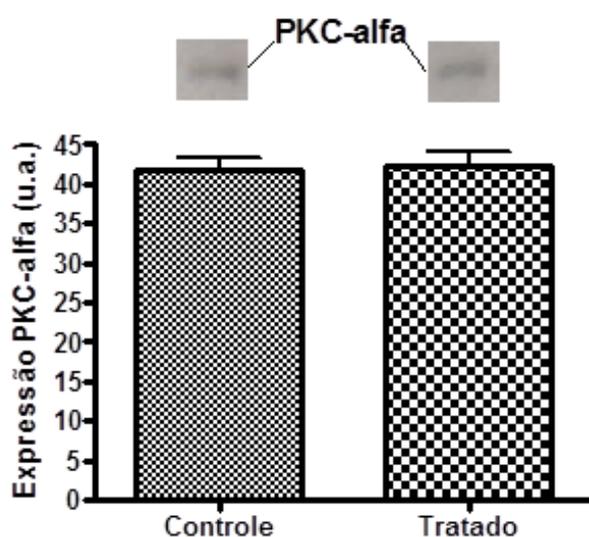


Figura 15: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 1 hora sobre a expressão de PKC-alfa em ratos do grupo controle ($n= 3$) e tratado ($n= 5$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.13 Análise da expressão de ERK 1 (3 horas)

A Figura 16 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos por 3 horas não apresentaram modificação significativa na expressão de ERK 1 ($p=0,1922$). O grupo controle apresentou média de $67,45 \pm 1,464$, $n=6$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $71,05 \pm 2,209$, $n=4$, quando estes foram expostos por 3 horas à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p=0,9372$.

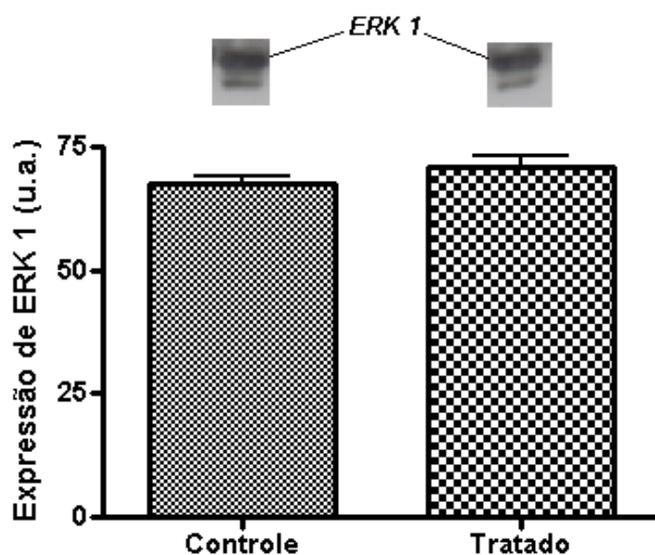


Figura 16: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a expressão de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n=6$) e tratado ($n=4$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.14 Análise da expressão de ERK 2 (3 horas)

A Figura 17 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos não apresentaram alteração significativa na expressão de ERK 2 ($p= 0,4151$). O grupo controle apresentou média de $35,45 \pm 0,5758$, $n= 6$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $34,58 \pm 0,8492$, $n =6$, quando estes foram expostos por 3 horas à radiação do aparelho celular de acordo com a metodologia citada. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,6991$.

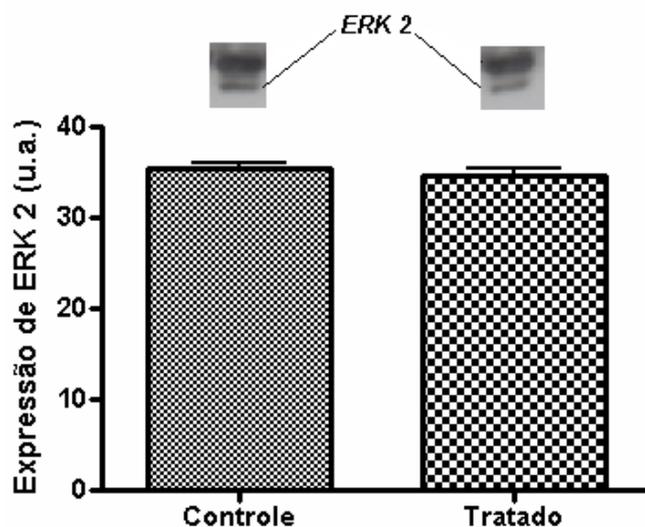


Figura 17: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a expressão de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 6$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.15 Análise da atividade de ERK 1 (3 horas)

De acordo com a Figura 18, as células da hipófise dos ratos expostos apresentaram diminuição significativa na atividade de ERK 1 ($p= 0,0195$). O grupo controle apresentou média de $48,74 \pm 2,755$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $40,25 \pm 1,551$, $n= 6$, quando estes foram expostos por 3 horas à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0159$.

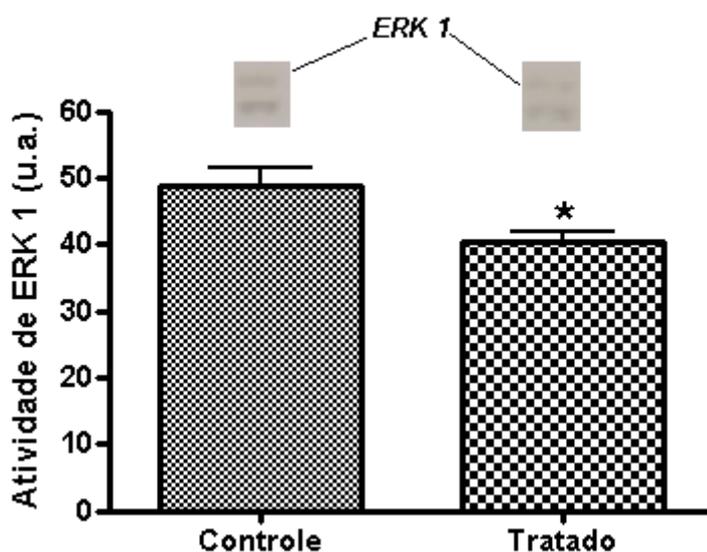


Figura 18: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a atividade de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.16 Análise da atividade de ERK 2 (3 horas)

A Figura 19 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição significativa na atividade de ERK 2 ($p= 0,0053$). O grupo controle apresentou média de $50,15 \pm 2,488$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $40,65 \pm 1,238$, $n= 6$, quando estes foram expostos por 3 horas à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0095$.

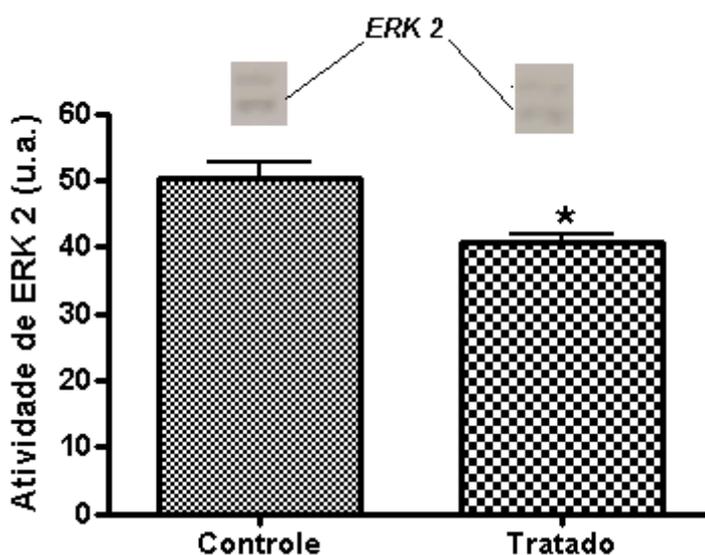


Figura 19: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a atividade de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.17 Análise da expressão de PKC-alfa (3 horas)

A Figura 20 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição significativa na expressão de PKC-alfa ($p= 0,0039$). O grupo controle apresentou média de $39,20 \pm 0,6493$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $36,01 \pm 0,2714$, $n= 4$, quando estes foram expostos por 3 horas à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0286$.

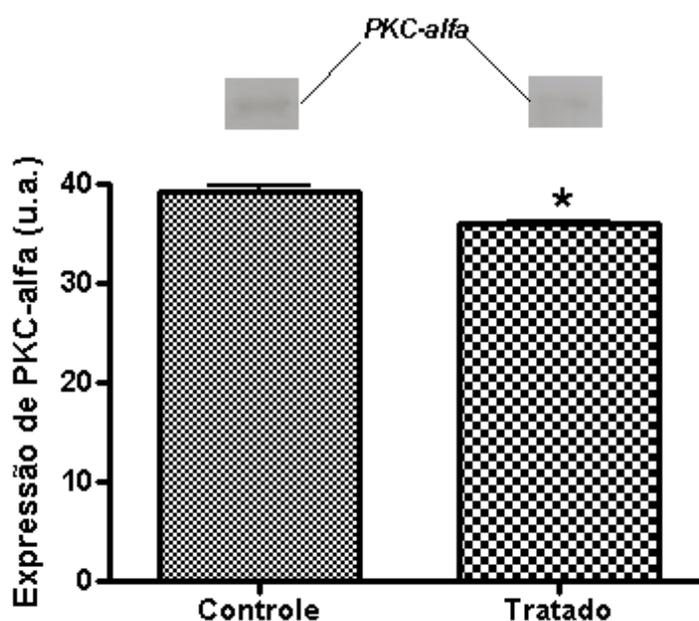


Figura 20: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 horas sobre a expressão de PKC-alfa em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 4$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.18 Análise da expressão de ERK 1 (3 dias)

A Figura 21 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram aumento significativo da expressão de ERK 1 ($p= 0,0128$). O grupo controle apresentou média de $46,22 \pm 0,8843$, $n= 6$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $49,70 \pm 0,6158$, $n= 5$, quando este foi exposto por 3 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0303$.

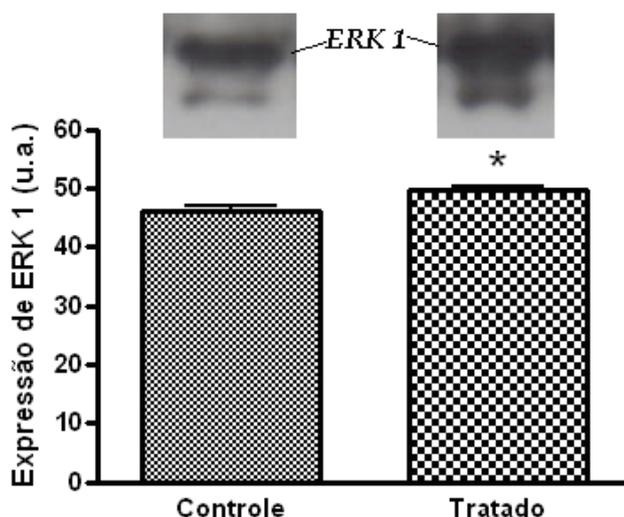


Figura 21: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a expressão de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 6$) e tratado ($n= 5$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.19 Análise da expressão de ERK 2 (3 dias)

A Figura 22 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram aumento significativo da expressão de ERK 2 ($p= 0,0463$). O grupo controle apresentou média de $22,10 \pm 2,132$, $n= 5$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $29,41 \pm 2,066$, $n= 4$, quando este foi exposto por 3 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0286$.

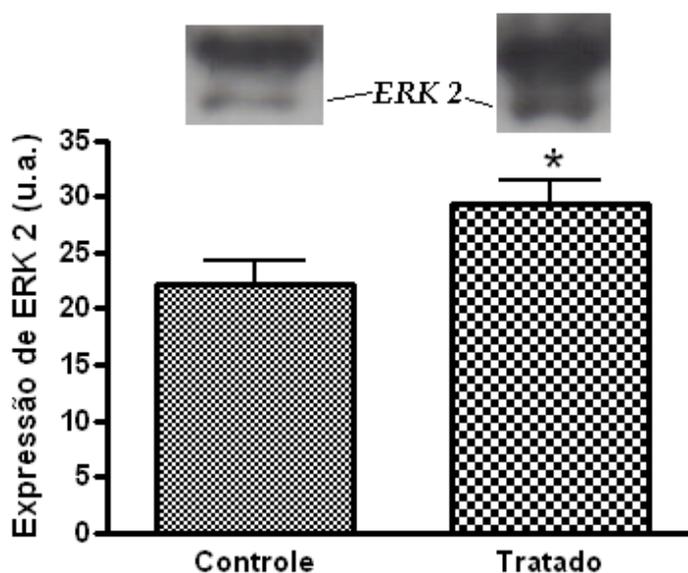


Figura 22: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a expressão de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 5$) e tratado ($n= 4$). Acima de cada coluna há imagens bandas representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. $*p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.20 Análise da atividade de ERK 1 (3 dias)

De acordo com a Figura 23, as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição significativa na atividade de ERK 1 ($p= 0,0028$). O grupo controle apresentou média de $47,36 \pm 1,824$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $40,33 \pm 0,6406$, $n= 6$, quando este foi exposto por 3 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0173$.

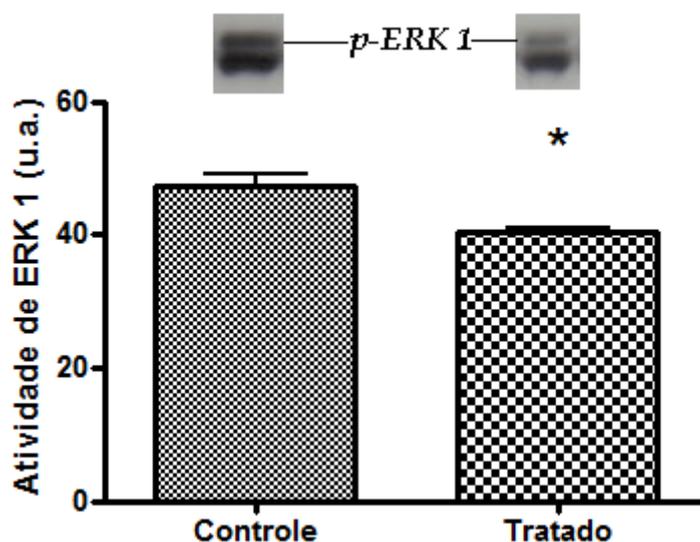


Figura 23: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.21 Análise da atividade de ERK 2 (3 dias)

A Figura 24 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição significativa na atividade de ERK 2 ($p= 0,0303$). O grupo controle apresentou média de $86,52 \pm 0,7627$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $83,94 \pm 0,6197$, $n= 6$, quando este foi exposto por 3 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0381$.

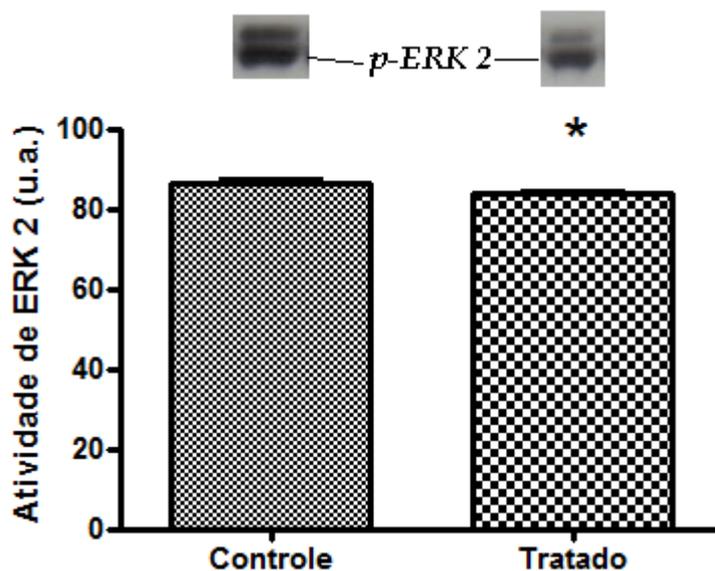


Figura 24: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a atividade de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 6$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.22 Análise da expressão de PKC – alfa (3 dias)

A Figura 25 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos não apresentaram alteração significativa na expressão de PKC-alfa ($p= 0,3648$). O grupo controle apresentou média de $71,08 \pm 0,2060$, $n= 3$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $69,93 \pm 1,103$, $n= 3$, quando este foi exposto por 3 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,6857$.

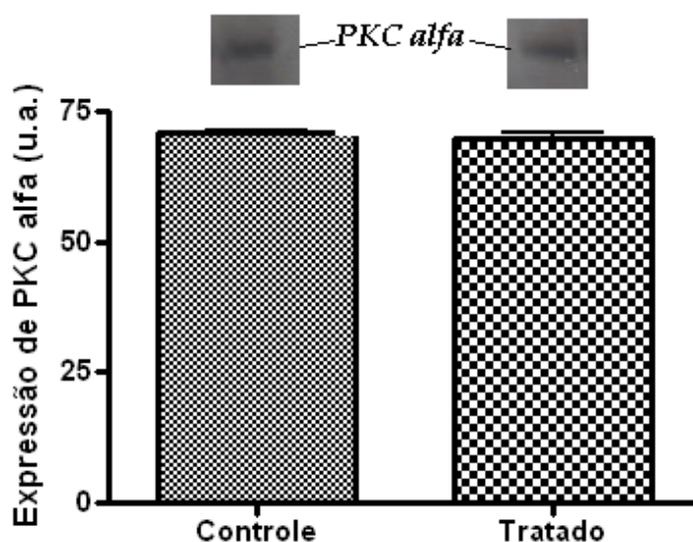


Figura 25: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias sobre a expressão de PKC-alfa em ratos do grupo controle ($n= 3$) e tratado ($n= 3$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.23 Análise da expressão de ERK 1 (10 dias)

A Figura 26 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição significativa na expressão de ERK 1 ($p= 0,0220$). O grupo controle apresentou média de $85,10 \pm 0,2695$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $73,78 \pm 4,109$, $n= 3$, quando estes foram expostos por 10 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0286$.

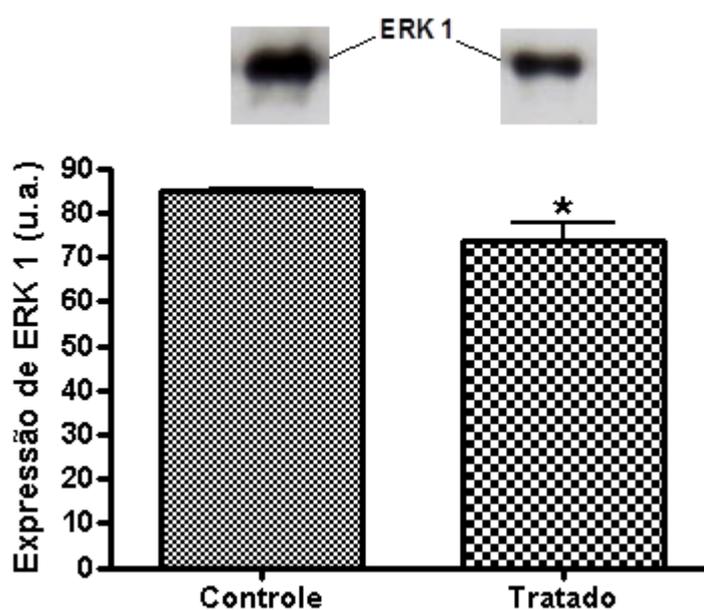


Figura 26: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a expressão de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 3$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.24 Análise da expressão de ERK 2 (10 dias)

A Figura 27 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição significativa na expressão de ERK 2 ($p= 0,0288$). O grupo controle apresentou média de $34,39 \pm 1,831$, $n= 4$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $25,24 \pm 2,621$, $n= 4$, quando estes foram expostos por 10 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 0,0571$.

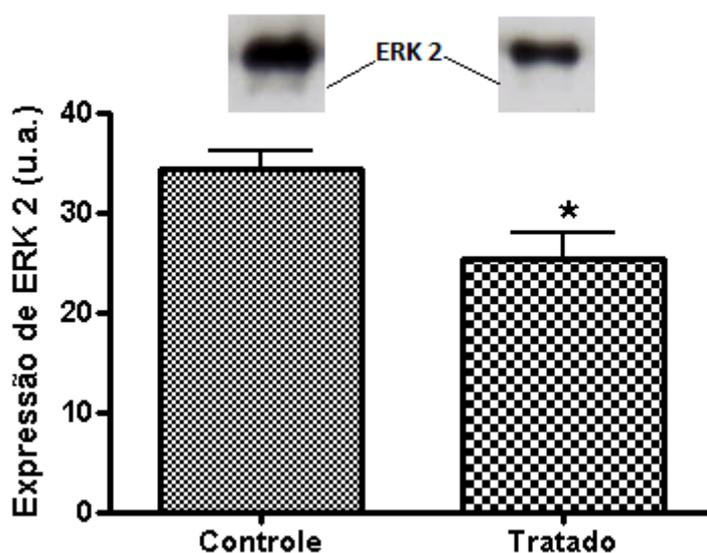


Figura 27: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a expressão de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 4$) e tratado ($n= 4$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos ratos controle.

4.25 Análise da atividade de ERK 1 (10 dias)

Como é mostrado na Figura 28, as células hipofisárias dos animais expostos não apresentaram alteração significativa na atividade de ERK 1 ($p= 0,5949$). O grupo controle apresentou média de $27,12 \pm 1,109$, $n= 3$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $26,21 \pm 1,134$, $n= 3$, quando estes foram expostos por 10 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 1,000$.

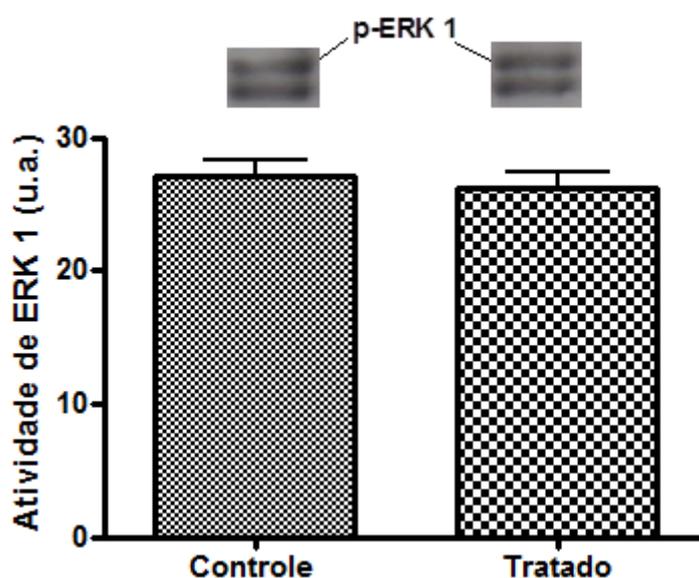


Figura 28: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a atividade de ERK 1 em ratos do grupo controle ($n= 3$) e tratado ($n= 3$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.26 Análise da atividade de ERK 2 (10 dias)

A Figura 29 mostra que as células hipofisárias dos animais expostos não apresentaram alteração significativa na atividade de ERK 2 ($p= 0,6655$). O grupo controle apresentou média de $30,90 \pm 0,8079$, $n= 3$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $29,64 \pm 2,585$, $n= 3$, quando estes foram expostos por 10 dias à radiação do aparelho celular. A análise dos dados pelo teste Mann – Whitney apresentou $p= 1,000$.

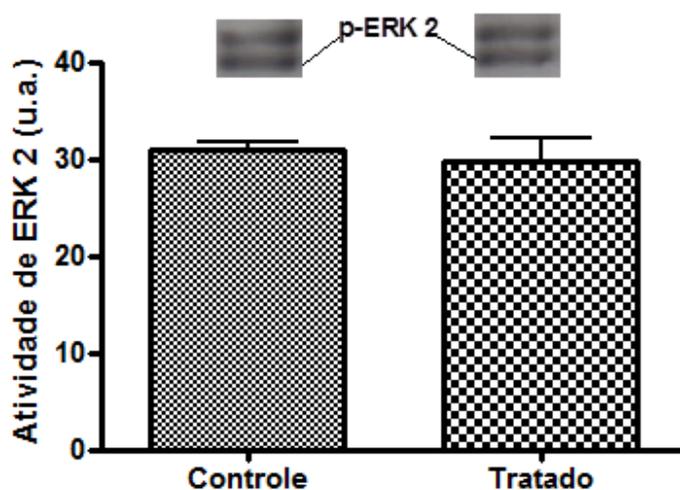


Figura 29: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 10 dias sobre a atividade de ERK 2 em ratos do grupo controle ($n= 3$) e tratado ($n= 3$). Acima de cada coluna há imagens representativas dos resultados obtidos por Western Blot. Os dados são expressos como média \pm EPM.

5. Discussão

Este trabalho tem como objetivos estabelecer um modelo animal para o estudo do efeito da radiação emitida por aparelhos celulares com a frequência de 1800 MHz e avaliar as consequências desta radiação sobre o sistema nervoso central. Foram estudadas a expressão e atividade de ERK 1 e ERK 2 (quinase regulada por sinais extracelulares), e a expressão de PKC-alfa (isoforma alfa da proteína quinase C) das células hipofisárias de ratos Wistar. Na hipófise, a via de sinalização da qual participam PKC-alfa e ERK 1 e 2 tem papel central na regulação da expressão gênica e secreção de diversos hormônios (KLAUSEN *et al.* 2005; DUAN *et al.* 2002).

No presente trabalho, foi determinado um protocolo que possibilitasse a análise do efeito da radiação emitida por telefones móveis sobre as células hipofisárias de ratos Wistar após muitas ligações curtas (25 segundos a cada 2 minutos) por período de 3 ou 10 dias e após uma única ligação (1 hora ou 3 horas). Este protocolo de exposição dos animais à radiação do aparelho celular provocou alterações na via de sinalização estudada.

Como dito na metodologia, foram feitas medidas para verificar se a radiação emitida durante a exposição dos animais do grupo tratado era homogênea em qualquer ponto da caixa e se esta radiação atingia os animais do grupo controle, que se localizava, em todos os tipos de testes, a uma distância de 3 metros da caixa contendo o aparelho celular. As medidas de intensidade de campo elétrico foram feitas dentro da caixa contendo o telefone móvel e dentro da outra caixa e, como

mostra a tabela 2, a intensidade da radiação no interior da primeira foi similar em todos pontos medidos com média de $15,5 \text{ V x m}^{-1}$, enquanto que dentro da segunda caixa era de $0,12 \text{ V x m}^{-1}$, cerca de cem vezes menor. Com isso, podemos dizer que os animais do grupo tratado receberam a mesma radiação, independentemente da posição dentro da caixa, e que a blindagem feita nas caixas com papel laminado funcionou, protegendo os animais controles. Estas medidas foram feitas enquanto o aparelho celular realizava ligação e enquanto era alimentado pela rede elétrica.

Com o intuito de avaliar a capacidade que a radiação em estudo tem de chegar ao tecido encefálico de ratos Wistar com 60 dias de idade, foi feito um teste a fim de verificar se tal radiação era capaz de atravessar os ossos da calota craniana (Figura 8). De acordo com a tabela 3, a medida da intensidade da radiação que atravessou a calota craniana, enquanto o telefone efetuava ligação a uma distância de 3 cm dos ossos, foi de $0,35 \text{ V x m}^{-1}$, o mesmo valor encontrado dentro da cela blindada quando a 3 cm do aparelho emissor de radiação sem os ossos da calota, mostrando que, nestas condições, a calota não funciona como barreira para a passagem da radiação. A medida da intensidade dentro da cela enquanto o celular fazia uma ligação a 20 cm da calota posicionada no orifício foi de $0,23 \text{ V x m}^{-1}$, já o valor sem a calota foi de $0,35 \text{ V x m}^{-1}$, mostrando que, mesmo a distância, a radiação atravessa os ossos da caixa craniana, embora ocorra uma diminuição de aproximadamente 34% da intensidade inicial. Com isso, acreditamos que a radiação foi capaz de chegar ao tecido encefálico, tanto no momento em que os animais se posicionavam a 3 quanto a 20 cm (distância mínima e máxima entre os animais e o aparelho celular dentro da caixa).

Também foi realizado um teste para saber se a radiação emitida pelo aparelho móvel era capaz de modificar a temperatura do tecido encefálico dos animais expostos após 1 hora e 3 horas de exposição à distância de 3 cm ou 20 cm do aparelho (Figura 5). Acreditamos que não seria interessante realizar este teste com a exposição por períodos de 3 ou 10 dias com ligações de 25 segundos como dito na metodologia pelo fato de que esse tipo de radiação só é capaz de promover aquecimento após longo período e exposição ininterrupta (Escola Superior do Ministério Público de São Paulo, 2004). Como mostrado na tabela 4, a radiação emitida de acordo com a descrição feita na metodologia foi incapaz de promover aquecimento da água contida no crânio dos animais posicionado a 3 ou 20 cm do celular e muito menos do material controle posicionado a 5 metros dele. O tecido cerebral foi substituído por água pelo fato de ela ser o principal componente das células, cerca de 70% (GUYTON & HALL, 2006), e assim seria mais fácil efetuar as medidas de temperatura.

Como pôde ser observado nos resultados, os diversos tratamentos executados neste trabalho apresentaram modificações no funcionamento da via das MAPK's e, diante destes dados, acreditamos que as modificações relatadas são causadas pelo efeito da radiação e não por modificação no funcionamento das células hipofisárias devido ao calor gerado ou por ativação de mecanismos de controle térmico coordenados pelo hipotálamo.

A radiação emitida por celular é considerada não ionizante. Porém, ela é capaz de promover aquecimento de tecido ou qualquer outro material, quando ele é exposto por um período maior que alguns minutos (Escola Superior do Ministério

Público de São Paulo, 2004). Uma explicação para os nossos resultados, que não indicaram variação na temperatura da água, é que pode ter ocorrido uma variação térmica não detectada pelo termômetro utilizado devido à sua baixa sensibilidade (foi utilizado um termômetro de mercúrio comercial). Além disso, pode ter ocorrido troca de calor com o meio, já que o experimento não poderia ser realizado num local com isolamento térmico, tal como uma estufa, porque neste caso ocorreria perda de sinal do celular. Portanto, pode-se imaginar que melhorando as condições experimentais observaremos variação na temperatura da água causada pela radiação.

Além disso, diante da possibilidade de que o ruído emitido pelo funcionamento do mecanismo acionador do aparelho celular durante a exposição por período de 3 e 10 dias, possa alterar os parâmetros avaliados, foram criados dois grupos experimentais adicionais neste trabalho. Cada um desses dois novos grupos continha, um subgrupo de animais controle que não foram expostos à presença da radiação e um subgrupo denominado controle negativo com animais que foram acomodados numa caixa contendo o mecanismo desenvolvido para acionar o aparelho celular, sem o telefone móvel. Portanto, o único fator com possível capacidade, neste caso, de provocar estresse seria o ruído emitido pelo robô durante seu funcionamento. Foram feitas análises da atividade das enzimas ERK 1 e ERK 2 das amostras provenientes dos animais do grupo contendo controles e controles negativos expostos por 3 dias à presença do mecanismo acionador do aparelho celular em funcionamento, e como esperado, não houve diferença significativa quando comparados os dois subgrupos, tanto para ERK 1 quanto para ERK 2 (Figuras 9 e 10). Não temos os dados referentes à análise da atividade de ERK 1 e ERK 2 dos animais controles e controles negativos expostos por 10 dias

devido, também, a problemas com a importação do anticorpo específico para estas enzimas.

A exposição dos animais à radiação emitida pelos telefones móveis durante 1 hora não alterou a expressão de ERK 1 e 2 e de PKC-alfa nas células da hipófise (Figuras 11, 12 e 15). Estes resultados eram esperados já que se sabe que o período de 1 hora é insuficiente para a detecção de pequena variação na expressão dessas proteínas pelo método de Western blot (DAGNINO-SUBIABRE *et al.* 2006; CHUAN-CHANG *et al.* 1998). Porém, a exposição por 1 hora foi suficiente para diminuir a atividade de ERK 1 e 2 (Figuras 13 e 14). A ausência de efeito sobre a expressão de ERK1 e ERK2 corroboram os resultados de Joseph Friedman e colaboradores (2007), que observaram ausência de diferença significativa na expressão dessas enzimas após a exposição de células HeLa e Rat-1 a radiação de frequência igual a 875 MHz, porém, a diminuição da atividade destas enzimas mostradas em nossos ensaios divergem dos dados desses pesquisadores que constataram aumento de sua atividade.

Há várias explicações possíveis para esta divergência. É necessário considerar que Friedman e colaboradores fizeram seus testes em cultura de células HeLa e Rat1 e utilizaram radiação com frequência de 875 MHz por períodos que variaram de 5 a 30 minutos. Nossos experimentos foram feitos *in vivo* e usamos frequência de 1800 MHz por períodos de 1 hora, 3 horas, 3 dias e 10 dias. Assim, em nosso estudo, as células hipofisárias estavam sujeitas à comunicação com outros tipos celulares, sejam do mesmo tecido ou não, e a radiação com maior

freqüência e por maior tempo. Além disso, em diferentes tipos celulares as mesmas ERK 1 e ERK 2 podem ter mecanismos diferentes de regulação.

Por fim, é importante considerar que os testes de Friedman e colaboradores foram realizados com um gerador de freqüência acoplado a uma antena, como objeto emissor de radiação, enquanto nós usamos um aparelho celular padrão (GSM). Assim, podem haver outras diferenças na radiação à qual os animais foram submetidos além da freqüência, como, por exemplo, na intensidade da radiação. Esta diferença metodológica também se reflete nos experimentos de 3 e 10 dias já que mesmo quando o aparelho estava em *standby*, intervalos de 2 minutos (sem ligação), ele emitia radiação. Por isso, consideramos que nossos experimentos são mais condizentes à realidade.

As enzimas ERK 1 e ERK 2 ativam diretamente fatores de transcrição gênica de hormônios hipofisários tais como GH, FSH e LH (KLAUSEN *et al.* 2005; DUAN *et al.* 2002). Isto nos permite supor que estes animais apresentam menor concentração plasmática de hormônios hipofisários, o que é reforçado pela demonstração de que o aumento da atividade de ERK 1 e ERK 2 aumenta a secreção de hormônios em culturas de gonadotropos (ARMSTRONG *et al.* 2009; BLISS *et al.* 2010).

Além disso, já se sabe que a secreção de hormônios hipofisários pode ser controlada pela via das MAPK's de maneira dependente e independente de PKC (KLAUSEN *et al.* 2005). Tal evento também ocorre no processo de secreção de catecolaminas em células adrenais (COX & PARSON, 1997). Desta maneira, é cabível que ocorra diminuição da atividade de ERK 1 e ERK 2 mesmo sem ter

ocorrido alteração na expressão de PKC-alfa, como é observado nas figuras 13, 14 e 15.

Após a exposição dos animais a radiação por 3 horas, verificamos que, como esperado, a expressão de ERK 1 e ERK 2 manteve-se sem alterações significativas (Figuras 16 e 17). Assim como nos experimentos de uma hora, a atividade dessas enzimas também diminuiu (Figuras 18 e 19) mostrando que a radiação continua provocando modificação na via das MAPKs. Mas, diferente do resultado anterior, a expressão de PKC-alfa diminuiu (Figura 20). Neste caso, é possível que a redução da expressão de PKC-alfa afete, reduzindo, a atividade de ERK 1 e ERK 2. Não podemos, por isso, excluir a possibilidade da via de ativação de ERK's independente de PKC ter sido afetada pela radiação. Certamente são necessários experimentos para avaliar a atividade de PKC-alfa, a sua relação com ERK 1 e ERK 2 e estudar a via de regulação de ERK 1 e ERK 2 independente de PKC.

Assim como descrito acima, podemos supor que esses animais apresentam concentrações plasmáticas de hormônios hipofisários menores em relação ao grupo controle.

A exposição dos animais à radiação emitida durante 25 segundos de ligação, em intervalos de 2 minutos, ao longo de 3 dias de experimento, aumentou a expressão de ERK 1 e ERK 2 nas células da hipófise (Figuras 21 e 22). Nossos dados mostram, por outro lado, que a atividade dessas enzimas diminuiu (Figuras 23 e 24) e que a expressão de PKC-alfa não foi alterada (Figura 25). O aumento da expressão de ERK 1 e ERK 2 nos parece ser consequência da ativação de

mecanismos de contrarregulação das células hipofisárias na tentativa de reverter ou minimizar a redução da atividade causada pela radiação. Mas, os resultados mostram que mesmo com o aumento da expressão, a atividade dessas enzimas ainda continua significativamente menor do que o observado nos animais do grupo controle. Isto pode ser consequência de modificação na via de sinalização que determina a regulação da atividade de ERK 1 e ERK 2. Não encontramos artigo mostrando este mecanismo de contrarregulação em ERK, mas isto já foi descrito para outras enzimas (CZYZYK-KRZESKA *et al.*, 1994).

Assim como nos experimentos de 1 e 3 horas de exposição dos animais, propomos que após 3 dias, os níveis plasmáticos de hormônios hipofisários nesses animais também devem estar abaixo do normal, quando comparados como os animais do grupo controle.

Após 10 dias de exposição, pela mesma metodologia dos ensaios de 3 dias de exposição, as células hipofisárias dos animais expostos apresentaram diminuição na expressão das enzimas ERK 1 e ERK 2 (Figuras 26 e 27), porém a atividade foi similar à do grupo controle (Figuras 28 e 29).

Isto indica que, após 10 dias de exposição, as células finalmente reverterem o efeito da radiação sobre a atividade de ERK 1 e ERK 2 e, talvez, se adaptam ao estresse provocado pelo telefone celular.

Ainda não temos os resultados referentes à enzima PKC-alfa, devido a problemas com a aquisição do anticorpo específico para sua detecção.

Sabe-se que os hormônios hipofisários regulam a secreção de outros hormônios tais como T3, T4, cortisol, testosterona e outros (BLISS et al. 2010), assim a radiação emitida por telefones celulares pode ter efeitos mais amplos sobre o sistema endócrino, hipótese que deve ser testada.

Como ERK 1 e 2 também atuam diretamente na indução de fatores de transcrição gênica de importantes proteínas reguladoras do ciclo celular (CAPRI et al. 2004), é possível especular que a regulação da multiplicação celular pode estar afetada nas células hipofisárias e, com isso, também afetar o funcionamento da hipófise.

Resumindo, os resultados mostram que o modelo estabelecido pode ser útil para estudar o efeito da radiação emitida por telefones móveis sobre a fisiologia de mamíferos e permitem sugerir que esta radiação modifica os processos de sinalização intracelular nas células hipofisárias o que deve afetar o processo de síntese e secreção dos seus hormônios e ter conseqüências sobre o sistema endócrino. São necessários estudos mais detalhados sobre os mecanismos de regulação da atividade de ERK 1 e ERK 2 e sua relação com a síntese e secreção de hormônios hipofisários e não hipofisários. Também consideramos a necessidade de estudar o efeito da radiação sobre o hipotálamo e a sua relação com a hipófise e, talvez, a modificação do protocolo experimental de 3 e 10 dias.

6. Conclusões

- O modelo animal estabelecido para estudar o efeito da radiação de telefones móveis sobre a fisiologia de ratos Wistar se mostrou adequado;
- A exposição à radiação emitida por telefones móveis afeta a via de sinalização das MAPK's em células da hipófise de ratos Wistar machos;
- A atividade de ERK 1 e ERK 2 é diminuída nas células hipofisárias dos animais expostos por 1 hora, 3 horas e 3 dias mas não nos expostos por 10 dias;
- A expressão de ERK 1 e ERK 2 apresentou-se alterada apenas após 3 (aumentada) e 10 dias (diminuída) de exposição;
- Após 10 dias de exposição, a atividade de ERK 1 e ERK 2 das células hipofisárias volta aos níveis normais;
- A expressão de PKC-alfa foi alterada (diminuída) somente após a exposição dos animais por 3 horas.

7. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES. Brasil fecha 2010 com 202,9 milhões de celulares (<http://www.anatel.gov.br/Portal/exibirPortalInternet.do> , acessado 19 de janeiro de 2011).

AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES. Brasil já tem 20,8 milhões de celulares (http://www.anatel.gov.br/Portal/verificaDocumentos/documento.asp?numeroPublicacao=17802&assuntoPublicacao=Brasil%20j%C3%A1%20tem%2020,8%20milh%C3%B5es%20de%20celulares&caminhoRel=null&filtro=1&documentoPath=biblioteca/releases/2000/release_21_11_2000.pdf, acessado em dezembro de 2010).

AIRES, M. M.; NUNES, M. T. 1991. Fisiologia *In*: AIRES, M. M.; NUNES, M. T. Fisiologia. Editora Guanabara Koogan S.A. 1: 57-679.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 4ª edição, Porto Alegre, Editora Artmed, 2004

ANTUNES, R. J.; de CASTRO, M.; ELIAS, L. L. *et al.* Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiology Review**, v. **84**, p. 169-173, 2004.

ARMSTRONG, S. P.; CAUNT, C. J.; MCARDLE, C. A. Gonadotropin-Releasing Hormone and Protein Kinase C Signaling to ERK: Spatiotemporal Regulation of ERK by Docking Domains and Dual-Specificity Phosphatases. **Molecular Endocrinology**, v. **23**, n. 4, p. 510–519, 2009.

BENAVIDES, M.; LAORDEN, M. L.; MARÍN, M. T. and MILANÉS, M. V. Role of PKC- α , γ isoforms in regulation of c-Fos and TH expression after naloxone-induced morphine withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups. **Journal of Neurochemistry**, v. **95**, p. 1249–1258, 2005.

BERNARDI, P.; CAVAGNARO, M.; PISA, S. and PIUZZI, E. Power absorption and temperature elevation induced in the human head by a dual-band monopole-helix antenna phone. **IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques**. v. **49**, p. 2539-2546, 2001.

BERNHARDT, J.H. Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields. **Physics on Medicine and Biology**, v. **37**, p. 807-844, 1992.

BESSER, G. M. THORNER, M. O. *Comprehensive Clinical Endocrinology*, 3ª edição, Philadelphia, Editora Elsevier, 2002.

BLACK, D. R.; HEYNICK, L. N. Radiofrequency (RF) Effects on Blood Cells, Cardiac, Endocrine, and Immunological Functions. **Bioelectromagnetics**, v. 6, p. 187-195, 2003.

BLISS, S. P.; NAVRATIL, A. N.; XIE, J. and ROBERSON, M. S. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p. 322–340, 2010.

BOATTRIGHT, J. H.; RUBIM, N. M. and LUVONE, P. M. Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by melatonin: the role of GABA. **Vis. Neurosci.** v. 11, p. 1013–1018, 1994.

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

BRONZINO, J.D., EDITOR. The Biomedical Engineering Handbook. New York: CRC Press & IEEE Press: 1380-1440, 1995.

BURGER, L. L.; HAISENLEDER, D. J.; AYLOR, K. W. and MARSHALL, J. C. Regulation of Intracellular Signaling Cascades by GNRH Pulse Frequency in the Rat Pituitary: Roles for CaMK II, ERK, and JNK Activation. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 947–953, 2008.

CAPRI, M.; SCARCELLA, E.; FUMELLI, C.; BIANCHI, E.; SALVIOLI, S.; MESIRCA, P.; AGOSTINI, C.; ANTOLINI, A.; SCHIAVONI, A.; CASTELLANI, G. *et al.* *In vitro* exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. **Radiat. Res.** v. 162, p. 211-218, 2004.

CARANGLIA, M.; MARRA, M.; MANCINELLI, F.; D'AMBROSIO, G.; MASSA, R.; GIORDANO, A.; BUDILLON, A.; ABBRUZZESE, A. and BISMUTO, E. Electromagnetic fields at mobile phone frequency induces apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. **J. Cell. Physiol.** v. 204, p. 539-548, 2005.

CÉSAR & CEZAR. *Biologia* 2ª edição. São Paulo, Editora Saraiva, 2002.

CHAUHAN, V.; MARIAMPILLAI, A.; BELLIER, P. V.; QUTOB, S. S.; GAJDA, G. B.; LEMAY, E.; THANSANDOTE, A. and McNAMEE, J. P. Gene expression analysis of a human lymphoblastoma cell line exposed *in vitro* to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. **Radiat. Res.** v. 165, p. 424-429, 2006a.

CHAUHAN, V.; MARIAMPILLAI, A.; GAJDA, G. B.; THANSANDOTE, A. and McNAMEE, J. P. Analysis of proto-oncogenesis and heat-shock protein gene expression in human derived cell-lines exposed *in vitro* to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. **Int. J. Radiat. Biol.** v. 82, p. 347-354, 2006b.

CHUAN-CHANG, C.; SAI-KOONG, T.; LUNG-KUO, T.; JIN-PING, H.; FUNG-FANG, W. Evidence for the involvement of protein kinase C in the inhibition of prolactin gene

expression by transforming growth factor-B2. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 1054–1061, 1998.

CONSTANZO, S. L. Fisiologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara 223 p., 2005.

CZYZYK-KRZESKA, M. F.; FURNARI, B. A.; LAWSON, E. E. and MILLHORN, D. E. Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 760-764, 1994.

DAGNINO-SUBIABRE, A.; ORELLANA, J.A.; CARMONA-FONTAINE, C.; MONTIEL, J.; DÍAZ-VELÍZ, G.; SERÓN-FERRÉ, M.; WYNEKEN, U.; CONCHA, M.L.; ABOITIZ, F. Chronic stress decreases the expression of sympathetic markers in the pineal gland and increases plasma melatonin concentration in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1279–1287, 2006.

ESCOLA SUPERIOR DO MINISTÉRIO PÚBLICO DE SÃO PAULO. Caderno Jurídico, São Paulo, v. 6, nº 2, p. 7-12, abril/junho de 2004.

FIELDS, A. P.; GUSTAFSON, W. C. Protein kinase C in disease: cancer. **Methods. Mol. Biol.** v. 233, p. 519-537, 2003.

FRENCH, P. W.; PENNY, R.; LAURENCE, J. A. and McKENZIE, D. R. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. **Differentiation**, v. 67, p. 93-97, 2001.

FRIEDMAN, J.; KRAUS, S.; HAUPTMAN, Y.; SCHIFF, Y. and SEGER, R. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. **Biochem. J.** v. 405, p. 559-568, 2007.

GOODMAN, R. and BLANK, M. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. **J. Cell. Physiol.** v. 192, p. 16-22, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª edição, Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2006.

HAISENLEDER, D. J.; YASIN, M.; MARSHALL, J. C. The regulation of prolactin, thyrotropin and gonadotropin subunit gene expression by pulsatile or continuous calcium signals. **Endocrinology**, v. 133, p.2055–2061, 1993.

HOOK, G. J.; ZHANG, P.; LAGROYE, I.; LI, L.; HIGASHIKUBO, R.; MOROS, E. G.; STRAUBE, W. L.; PICHARD, W. F.; BATY, J. D. and ROTI ROTI, J. L. Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after *in vitro* exposure to radiofrequency radiation. **Radiat. Res.** v. 161, p. 193-200, 2004.

HOSSMANN, K. A. and HERMANN, D. M. Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system. **Bioelectromagnetics**,v. 24, p. 49–62, 2003.

INFOABRIL, 2006, "Wi-Fi vira fobia em escolas inglesas", www.info.abril.com.br

ISKANDER, M. F.; YUN, Z. and QUINTERO-LLERA, R. Polarization and human body effects on the microwave absorption in a human head exposed to radiation from hand held devices. **IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques**, v. **48**, p. 1979-1987, 2000.

ISKANDER, M. F.; YUN, Z. and QUINTERO-LLERA, R. Polarization and human body effects on the microwave absorption in a human head exposed to radiation from hand held devices. **IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques**, v. **48**, p. 1979-1987, 2000.

JENSEN, M. A. and RAHMAT-SAMII, Y. EM interaction of handset antennas and a human in personal communications. **Proceedings of the IEEE**, v. **83**, p. 7-17, 1995.

KELLNER, M.; YASSOURIDIS, A., MANZ, B.; HOLSBOER, F. WEIDEMANN, K. Corticotropin-releasing hormone inhibits melatonin secretion in healthy volunteers – a potential link to low-melatonin syndrome in depression? **Neuroendocrinology**, v. **65**, p. 284-290, 1999.

KLAUSEN, C., TSUCHIYA, T., CHANG, J. P. and HABIBI, H. R. PKC and ERK are differentially involved in gonadotropin-releasing hormone-induced growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. **289**, p. R1625–R1633, 2005.

KLAUSEN, C.; SEVERSON, D. L.; CHANG, J. P. and HABIBI, H. R. Role of PKC in the regulation of gonadotropin subunit mRNA levels: interaction with two native forms of gonadotropin-releasing hormone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. **289**, p. R1634–R1643, 2005b.

KOH, P. O. Melatonin attenuates the focal cerebral ischemic injury by inhibiting the dissociation of pBad from 14-3-3. **J. Pineal Res.** v. **44**, p. 101–106, 2008.

KOH, P. O. Melatonin prevents the injury-induced decline of Akt/forkhead transcription factors phosphorylation. **J. Pineal Res.** v. **45**, p. 199–203, 2008.

LAUDON M., HYDE, J. F. BEN-JONATHAN, N. Ontogeny of prolactin releasing and inhibiting activities in the posterior pituitary of male rats. **Neuroendocrinology**, v. **50**, p. 644–649, 1989.

LESZCZYNSKI, D.; JOENVAARA, S.; REIVINEN, J. and KUOKKA, R. Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. **Differentiation**, v. **70**, p. 120-129, 2002.

LIN, H.; OPLER, M.; HEAD, M.; BLANK, M. and GOODMAN, R. Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. **J. Cell. Biochem.** v. **66**, p. 482-488, 1997.

LOHMEIER, T. E. Neurohypophysial hormones. **Am. Journal of Physiology Regulation Integ. Comp. Physiol.**, v. **285**, p. 715-720, 2003.

LONGO, V. D.; FINCH, C. E. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? **Science**, v. **299**, p. 1342-1349, 2003.

MAIER, M. Brain and mobile phones. **BMJ**, v. **332**, p. 864-865, 2006.

MALDONADO, M. D., MURILLO-CABEZAS, F., TERRON, M. P., FLORES, L. J., TAN, D. X., MANCHESTER, L. C. and REITER, R. J. . The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma. **J. Pineal Res.** v. **42**, p. 1–11, 2007.

MANDA, K., UENO, M. and ANZAI, K. AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. **J. Pineal Res.** v. **42**, p. 386–393, 2007.

MASSERANO, J. M. and WEINER, N. The rapid activation of adrenal tyrosine hydroxylase by decaptation and its relationship to a cyclic AMP-dependent phosphorylating mechanism. **Molecular Pharmacology**, v. **16**, p. 513-528, 1979.

MURPHY, L. O. and BLENIS, J. **Trends Biochem. Sci.** v. **31**, p. 268–275, 2006.

MUSAT, M.; KORBONITS, M.; KOLA, B.; BORBOLI, N.; HANSON, M.R.; NANZER, A.M.; GRIGSON, J.; JORDAN, S.; MORRIS, D.G.; GUEORGUIEV, M.; COCULESCU, M.; BASU, S. and GROSSMAN, A. B. Enhanced protein kinase B/Akt signaling in pituitary tumours. **Endocrine-Related Cancer**, v. **12**, p. 423-433, 2005.

NATIONAL RADIOLOGICAL PROTECTION BOARD. Mobile phones and health: report by the Board of NRPB. Chilton, Didot, Oxfordshire, National Radiological Protection Board, 2004. (Documents of the NRPB, volume 15, no. 5; http://www.hpa.org.uk/radiation/publications/documents_of_nrbp/pdfs/doc_15_5.pdf, accessed 15 October 2007).

NYLUND, R. and LESZCZYNSKI, D. Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seem to be genome- and proteome-dependent. **Proteomics**, v. **6**, p. 4769-4780, 2006.

NYLUND, R. and LESZCZYNSKI, D. Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation. **Proteomics**, v. **4**, p. 1359-1365, 2004.

PEI, Z. and CHEUNG, R. T. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **J. Pineal Res.** v. **37**, p. 85–91, 2004.

REMONDINI, D.; NYLUND, R.; REIVINEN, J.; POULLETIER DE GANNES, F.; VEYRET, B.; LAGROYE, I.; HARO, E.; TRILLO, M. A.; CAPRI, M.; FRANCESCHI, C. et al. Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. **Proteomics**, v. **6**, p. 4745-4754, 2006.

REPACHOLI, M. H. Health risks from the use of mobile phones. **Toxicology Letters.** v. **120**, p. 323-331, 2001.

Resolução da AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES – ANATEL: Res. 340 (18/06/03).

RUBINFELD, H. and SEGER, R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. **Mol. Biotechnol.** v. 31, p. 151-174, 2005.

SALZINGER, K. Behavioral effects of electromagnetic fields in animals. In: Carpenter, D.O., Ayrapetyan, S. (Eds.), Biological Effects of Electric and Magnetic Fields, vol. 1. Academic Press, New York, 315–331, 1994.

SÁNCHEZ, E. What effects do mobile phones have on people's health? Copenhagen, WHO Regional Office for Europe (Health Evidence Network report: <http://www.euro.who.int/document/e89486.pdf>, accessed [28 september, 2007]), 2006.

SANTIAGO, B., DOTTORI, H., DUTRA, C., et al., Hipertextos do Observatorio Astronômico da UFRGS: <http://www.if.ufrgs.br>, accessed [25 de julho de 2009], 2008.

SEGER, R. and KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **FASEB J.** v. 9, p. 726-735, 1995.

SELMAOUI, B.; LABROZO, J. and TOUITOU, Y. Endocrine functions in young mem exposed for one night to a 50 Hz magnetic field. A circadian study of pituitary, thyroid and adrenocortical hormones. **Life Sciences**, v. 61, p. 473-486, 1997.

SIMONNEAUX, V. and RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.** v. 55, p. 325–395, 2003.

STAGG, R. B.; III, L. H.; PASTORIAN, K.; CAIN, C.; ADEY, W. R. and BYUS, C. V. Effect of immobilization and concurrent exposure to a pulse-modulated microwave field on core body temperature, plasma ACTH and corticosteroid, and brain ornithine decarboxylase, Fos and Jun mRNA. **Radiat. Res.** v. 155, p. 584-592, 2001.

STEVENS, R.G.; DAVIS, S.; THOMAS, D.B. et al. Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer. **FASEB J.** v. 6, p. 853-860, 1992.

VIVANCO I and SAWYERS C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. **Nature Review Cancer**, v. 2, p. 489-501, 2002.

WEISBROT, D.; LIN, H.; YE, L.; BLANK, M. and GOODMAN, R. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. **J. Cell. Biochem.** v. 89, p. 48-55, 2003.

WILSON, B.W.; STEVENS, R.G.; ANDERSON, L.E.; Neuroendocrine mediated effect of electromagnetic-field exposure: possible role of the pineal gland. **Life Sci.** v. 45, p. 1319-1332, 1989.

YOON, S. and SEGER, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**, v. **24**, p. 21-44, 2006.

ZHANG, B.; HOU, Y.; VOOGT, J. L. Effects of opioid antagonism on prolactin secretion and c-Fos/TH expression during lactation in rats. **Endocrine Journal**, v. **25**, p. 131-136, 2004.

ZHU, Y.; DONG, Q.; TAN, B. J.; LIM, W. G.; ZHOU, S. and DUAN, W. The PKC α -D294G mutant found in pituitary and thyroid tumors fails to transducer extracellular signals. **Cancer Res.** v. **65**, p. 4520-4524, 2005.