

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Luiz Carlos de Caires Júnior

**O EFEITO DA RADIAÇÃO EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS
SOBRE A VIA DAS MAPK'S, O HIPOTÁLAMO, A HIPÓFISE E
ADRENAL, MEMÓRIA E ANSIEDADE EM RATOS WISTAR (*Rattus
norvegicus* BERKENHOUT, 1769)**

Juiz de Fora
2014

Luiz Carlos de Caires Júnior

**O EFEITO DA RADIAÇÃO EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS
SOBRE A VIA DAS MAPK'S, O HIPOTÁLAMO, A HIPÓFISE E
ADRENAL, MEMÓRIA E ANSIEDADE EM RATOS WISTAR (*Rattus
norvegicus* BERKENHOUT, 1769)**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para a obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia

Juiz de Fora

2014

DE CAIRES JUNIOR, LUIZ CARLOS.

O EFEITO DA RADIAÇÃO EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS SOBRE A VIA DAS MAPK'S, O HIPOTÁLAMO, A HIPÓFISE E ADRENAL, MEMÓRIA E ANSIEDADE EM RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, 1769) / LUIZ CARLOS DE CAIRES JUNIOR. -- 2014.

95 f. : il.

Orientador: Raúl Marcel González Garcia

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Radiação eletromagnética. 2. Telefones Móveis. 3. MAPK. 4. Catecolaminas. 5. Memória. I. González Garcia , Raúl Marcel, orient. II. Título.

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, e a Universidade Federal de Juiz de Fora pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho e, a Bioclin / Quibasa, por conceder kits para medidas de glicemia.

Aos meus queridos pais (Luiz, Dircinha) e irmãos (Renato, Renan, Daninha e Helen), pelo exemplo, apoio e amor incondicional, fundamental para que eu continuasse a minha trajetória. Sem vocês, nada seria possível. Somos UM...e sempre seremos!!!!!!!!!!

À família *Manso Musso* (Éder, Maurília, Mariane, Murilo, Rafael e Camila), que está se fundindo à família *Caires*. Obrigado por todo o amor e dedicação.

Aos meus familiares, por entenderem e apoiarem as minhas constantes ausências.

Ao professor Raúl Marcel González Garcia, meu orientador, por confiar em mim, pela enorme contribuição na minha formação profissional e pessoal. Acima de tudo, agradeço PELA AMIZADE, que construímos nesses quase 8 anos de parceria. Você é especial!

Aos grandes amigos, Luiza Paiva, Eduardo Toledo, Pablo Salles, Tatianne Rosa e Ernesto...grandes companheiros.

Aos *Bons & Velhos* amigos de toda a vida, por serem capazes de me fazer esquecer que me tornei um adulto...por estarem comigo em absolutamente todos os momentos.

Aos companheiros de laboratório, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos professores dos laboratórios de Física, Genética, Bioquímica, Biologia Celular e Fisiologia, que sempre deixam as portas abertas discussões científicas e para utilização de equipamentos.

Ao Silvione, amigo, técnico de laboratório, professor, e exemplo pessoal.

Ao professor Carlos Maranduba, pela amizade e por acreditar em mim.

Ao professor Peter I. Lelkes, por me receber e tratar como um filho no Departamento de Bioengenharia (Temple University) e por me ensinar uma nova ciência. You changed my life!

Ao professor Cezary Marcinkienwicz, pela dedicação e ensinamentos.

Aos grandes amigos da Temple University: Collin, Annie, Helen, Seda, Mario, Riddhi, Sean, John...e todos os outros... I won't forget you!

Aos amigos do "Edge Student Village", Vitor, Giovanni, Tamires, Tamine, pela força nos momentos mais difíceis.

...a você Camila, apenas uma palavra: Amor!

RESUMO

O sistema de telecomunicação móvel tem crescido ao longo dos anos. A comunidade científica tem demonstrado uma crescente preocupação sobre os possíveis efeitos da exposição à radiação electromagnética de radiofrequência (RF-EMR) emitida por dispositivos móveis sobre a saúde dos usuários. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da RF-EMR sobre a via de MAPKs, verificando os níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise, sobre a secreção de catecolaminas, nível de glicose sérica, consolidação da memória de longo prazo e estabelecimento de comportamento de ansiedade. Ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, foram expostos à radiação emitida pelos telefones celulares (1,8 GHz) em condições agudas (1 e 3 horas de exposição) e crônicas (3 e 10 noites de exposição). Os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 foram alterados em células hipotalâmicas de animais expostos por 1 hora. Após 3 horas, 3 noites e 10 noites, foi observada alteração somente no nível de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2, em células hipotalâmicas; e nenhuma alteração foi constatada na fosforilação das enzimas MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células hipofisárias. As exposições por períodos agudos promoveram aumento da secreção basal de catecolaminas e a glicemia foi alterada após 1 hora e 10 noites. Não foi constatado comportamento estado de ansiedade pelo teste de cruz elevada em quaisquer períodos de exposição. Porém, a exposição crônica, por 10 noites, aumentou a secreção de catecolamina, estimulada por cafeína, concomitantemente à diminuição a glicemia, podendo afetar a consolidação da memória. Os resultados sugerem que a exposição de ratos a campos electromagnéticos emitidos por celulares é capaz de alterar a via de MAPKs, mudar o perfil de secreção basal e estimulada de catecolaminas, de glicemia, além de afetar a consolidação de memória de longo prazo.

Palavras-Chave: Radiação eletromagnética. Telefones móveis. MAPK. Catecolaminas. Memória.

ABSTRACT

The mobile telecommunication system has grown over the years. There has been a growing concern about the possible effects of exposure to radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMR) emitted by mobile devices on the health of users. This study aimed to evaluate the effects of whole-body RF-EMR exposure on MAPK's pathway, verifying the phosphorylation levels of MEK 1 / 2 and ERK 1 / 2, in hypothalamus and pituitary cells, catecholamine secretion, serum glucose, long-term memory consolidation and anxiety-like behavior occurrence. Male Wistar rats, 60 days old, were subjected to electromagnetic waves emitted by mobile phones (1.8 GHz) in acute (1 and 3 hours of exposure) and chronic (3 and 10 nights of exposure) conditions. The phosphorylation levels of MEK 1 / 2 and ERK 1 / 2 changed in hypothalamus cells after 1 hour of exposure. After 3 hours, 3 nights and 10 nights, we have found changes only in phosphorylation of MEK 1 / 2 (hypothalamus); no changes were found in MEK 1 / 2 and ERK 1 / 2 from pituitary cells. The acute exposures lead to the increase of basal catecholamine secretion and the glycemia changed after 1 hour and 10 nights. On the other hand, the chronic exposure increased the catecholamine release, by caffeine stimulation, but decreased the serum glucose level, disturbing the memory consolidation. The results suggest that exposure of rats to electromagnetic fields emitted by mobile phones is able to change the MAPK's pathway, profile of basal and stimulated secretion of catecholamines, and serum glucose level besides affecting long-term memory.

Keywords: Electromagnetic radiation. Mobile phone. MAPK. Catecholamines. Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Relação entre população mundial e número de aparelhos celulares habilitados entre os anos de 2005 e 2013	15
Figura 2	Espectro eletromagnético	18
Figura 3	Representação esquemática de uma onda eletromagnética se propagando na direção z	19
Figura 4	Representação da relação hipotálamo-hipófise com a regulação de glândulas e tecidos	24
Figura 5	Representação esquemática de uma via de sinalização das MAPK's	31
Figura 6	Gaiolas de experimentação	43
Figura 7	Representação esquemática da gaiola utilizada para acomodar os animais durante os experimentos, e representação dos pontos de mensuração de intensidade de campo elétrico gerado pelo aparelho celular	45
Figura 8	Mecanismo usado para acionar o aparelho celular	46
Figura 9	Representação esquemática da câmara utilizada para as medições da absorção da radiação pelo crânio e outros tecidos	47
Figura 10	Intensidade do campo elétrico em função do tempo	56
Figura 11	Intensidade do campo elétrico dentro da câmara blindada em função do tempo	57
Figura 12	Valores de temperatura medidos em função do tempo para os diferentes tecidos biológicos.....	58
Figura 13	Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 1 hora, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar	60
Figura 14	Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 3 horas, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e	

	ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar	62
Figura 15	Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 3 noites, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar	64
Figura 16	Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 10 noites, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar	66
Figura 17	Efeito da exposição à RF-EMR sobre a secreção basal e estimulada de catecolaminas em ratos Wistar	68
Figura 18	Efeito da exposição à RF-EMR sobre o nível sérico de glicose em ratos Wistar	69
Figura 19	Efeito da exposição à RF-EMF sobre o estabelecimento de estado de ansiedade em ratos Wistar	70
Figura 20	Efeito da exposição de ratos Wistar a RF-EMF sobre o estabelecimento memória de longo prazo	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira Geração de Telefonia Móvel
2G	Segunda Geração de Telefonia Móvel
3G	Terceira Geração de Telefonia Móvel
4G	Quarta Geração de Telefonia Móvel
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
ADH	Hormônio Antidiurético
ANATEL	Agência Nacional de Telecomunicações
BMK	Grandes proteínas quinases ativadas por mitógenos
CDMA	Acesso Múltiplo por Divisão de Código
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DAG	Diacilglicerol
DBH	Dopamina β -hidroxilase
DHEA	Desidroepiandrosterona
DOPA	Di-hidroxifenilalanina
EA	Braços fechados do aparato de cruz elevada
ERB	Estações Rádio-Base
ERK	Proteínas quinases reguladas por sinal extracelular
EMR	Radiação Eletromagnética
EPM	Erro Padrão da Média ou Teste de Cruz Elevada
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
GH	Hormônio do Crescimento
GHIH	Hormônio inibidor do hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina
GnRHR	Receptor de GnRH
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GHz	Giga Hertz
GSM	Padrão Global Móvel
GTP	Trifosfato de guanosina
LH	Hormônio Luteinizante
mAChR	Receptores muscarínicos de acetilcolina

nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
HSP	Proteína <i>heat-shock</i>
Hz	Hertz
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICE	Instituto de Ciências Exatas
ICNIRP	<i>International Commission on Non Ionizing Radiation Protection</i>
IEEE	<i>Institute of Electrical and Electronics Engineers</i>
IPs	Identificação de Dispositivos
IP ₃	Fosfatidil inositol trifosfato
ITU	<i>International Telecommunication Union</i>
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEK	Proteína quinase-quinase ativada por mitógeno
MHz	Mega Hertz
OMS	Organização Mundial da Saúde
OA	Braços abertos do aparato de cruz elevada
PDA's	Assistentes Pessoais Digitais
PIH	Hormônio inibidor da prolactina
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
PLC	Fosfolipase C
PNMT	Feniletanolamina-N-metil transferase
PRL	Prolactina
PVC	Cloreto de Polivinila
RF	Radiofrequência
RF-EMR	Radiação Eletromagnética de Radiofrequência
RNI	Radiação não-ionizante
SAPK	Proteínas quinases ativadas por estresse
SAR	Taxa de Absorção Específica
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TDMA	Acesso Múltiplo por Divisão de Tempo
TH	Tirosina Hidroxilase
TRH	Hormônio liberador de tireotropina
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
Wi-Fi	<i>Wireless Fidelity</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	Mais ou Menos
B _y	Campo Magnético
E	Intensidade do Campo Elétrico
E _x	Campo Elétrico
<i>f</i>	Frequência
H	Campo Magnético
S	Densidade de potência ou Intensidade
λ	Comprimento de onda
V x m ⁻¹	Volts por metro
W x m ⁻²	Watts por metro quadrado
W / Kg	Watts por kilograma
KDa	Kilo Daltons
mg / kg	Miligramma por kilograma
mM	Milimolar
μ L	Microlitro
g	Gramma ou unidade de medida gravitacional
V	Volts
mg	Miligramma
v / v	Volume por volume
n	Número de animais utilizados para compor grupos experimentais
rpm	Rotações por minuto
% tOA	Tempo gasto nos braços abertos
mA	Miliamperes
<i>p</i>	Valor de <i>p</i> estatístico
t	Tempo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O SISTEMA DE TELECOMUNICAÇÃO MÓVEL	15
1.2	RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA	17
1.3	RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA E SAÚDE	20
1.4	O HIPOTÁLAMO E A HIPÓFISE	23
1.5	PROTEÍNAS QUINASES	28
1.5.1	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK's)	28
1.5.2	Proteínas Quinases C (PKC's)	33
1.6	CATECOLAMINAS E SEUS EFEITOS SOBRE A FORMAÇÃO DE MEMÓRIA	34
2	OBJETIVOS	41
2.1	OBJETIVO GERAL	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA	42
3.2	ANIMAIS	42
3.3	PREPARAÇÃO DAS GAIOLAS PARA MANUTENÇÃO E EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS	42
3.4	MECANISMO ACIONADOR DO TELEFONE CELULAR	45
3.5	MEDIDAS DA ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO PELA CALOTA CRANIANA DOS RATOS	46
3.6	EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS	47
3.7	ANÁLISE DE FOSFORILAÇÃO DAS ENZIMAS MEK1, MEK2, ERK1 E ERK2	48
3.8	AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS	50
3.8.1	Secreção Basal e Estimulada de Catecolaminas	50
3.9	AVALIAÇÃO DA GLICEMIA	51
3.10	TESTE DE CRUZ ELEVADA	52
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4	RESULTADOS	55
4.1	ABSORÇÃO DA RADIAÇÃO PELA CALOTA CRANIANA DOS RATOS	55

4.1.1	Intensidade do Campo Elétrico no Interior da Câmara	55
4.1.2	Intensidade do Campo Elétrico no Interior da Câmara com o Crânio	56
4.2	TEMPERATURA DOS TECIDOS SOB EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO	57
4.3	NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DE MEK 1, MEK 2, ERK 1 E ERK 2 EM CÉLULAS DO HIPOTÁLAMO E HIPÓFISE APÓS EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO	58
4.3.1	Nível de Fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 após 1 Hora de Exposição	58
4.3.2	Nível de Fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 após 3 Horas de Exposição	60
4.3.3	Nível de Fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 após 3 Noites de Exposição	62
4.3.4	Nível de Fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 após 10 Noites de Exposição	64
4.4	SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS	66
4.5	NÍVEL DE GLICOSE SÉRICA	68
4.6	TESTE DE CRUZ ELEVADA	69
4.7	ESQUIVA INIBITÓRIA	70
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	81
7	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA DE TELECOMUNICAÇÃO MÓVEL

O sistema de telecomunicação móvel vem crescendo significativamente, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, de maneira que os telefones celulares se tornaram indispensável em nosso dia a dia. O número de aparelhos móveis habilitados chegou a 6,8 bilhões em 2013, quase alcançando o número de pessoas no mundo como representado na figura 1, o que significa uma taxa de dispersão global de 96 % (INTERNATIONAL TELECOMMUNICATION UNION, 2013). Segundo dados da Agência Nacional de Telecomunicações (ANATEL, 2014), o Brasil atingiu 271,10 milhões de linhas ativas no final de 2013, apresentando teledensidade de 136,45 acessos por 100 habitantes.

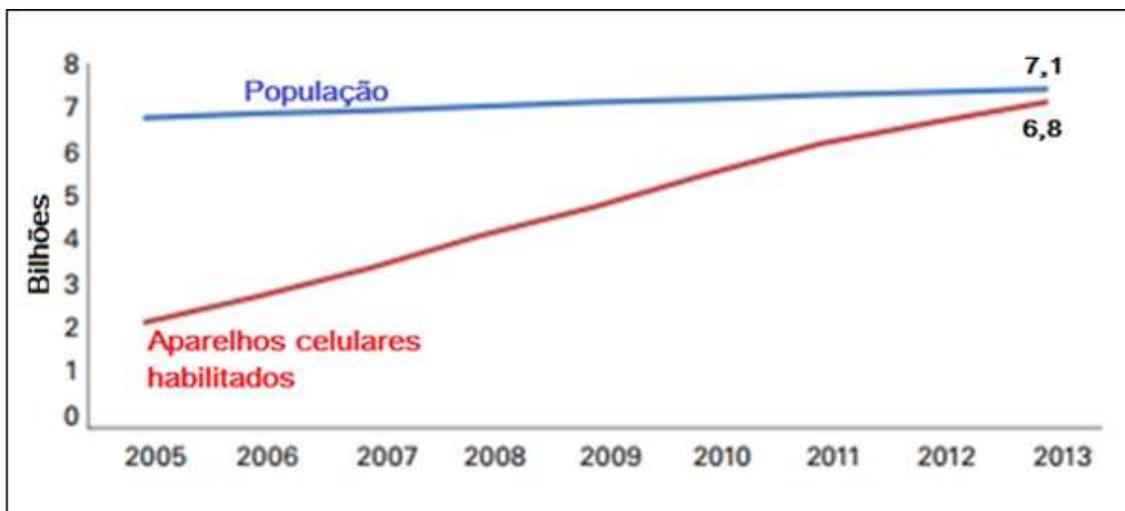


Figura 1. Relação entre população mundial e número de aparelhos celulares habilitados entre os anos de 2005 e 2013.

Fonte: ITU World Telecommunication / ICT Indicators database, 2013.

A rápida expansão dos serviços de telecomunicação móvel aumentou a quantidade de campos de irradiação e de energia no ambiente, pois tanto os transmissores móveis (telefones celulares) quanto os fixos (Estações Rádio Base – ERBs), além de outros equipamentos, operam através de radiação eletromagnética.

Esse aumento tem suscitado, junto à opinião pública, ao meio científico e à comunidade médica, uma crescente preocupação sobre os possíveis efeitos da exposição à radiação sobre a saúde dos usuários.

O crescimento exponencial na utilização de telefones móveis veio acompanhado do desenvolvimento de novas tecnologias, trazendo benefícios para a vida moderna. 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).

Atualmente existem quatro gerações de telefonia móvel. A primeira geração (1G) foi implantada na década de 1970, operando com a tecnologia analógica e utilizando frequências entre 450 e 800 MHz. Na década de 1990, surgiu a segunda geração da telefonia móvel (2G), utilizando os padrões de transmissão TDMA (Acesso Múltiplo por Divisão de Tempo), CDMA (Acesso Múltiplo por Divisão de Código) e GSM (Padrão Global Móvel). 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 enquanto que no padrão CDMA o aparelho celular do usuário utiliza um canal codificado reconhecido pelo aparelho do receptor sem cruzamento de linhas; ambos, CDMA e TDMA, utilizam frequências entre 800 e 900 MHz. Já o padrão GSM é um sistema de transmissão digital, a versão mais moderna do padrão TDMA que opera através de um cartão *Sim* (*Sim-Card*), utilizando frequências que podem variar de 900 a 1900 MHz. Em 2005, foi implantada a terceira geração de telefones móveis (3G), acompanhada de grandes avanços tecnológicos, permitindo o acesso à internet em alta velocidade, qualidade na transmissão de dados (imagens, músicas e mensagens) e voz; tal tecnologia opera utilizando frequências acima de 2.1 GHz (ANATEL, 2012). O aumento da frequência de operação está relacionado a maior eficiência na transmissão de dados (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2012). Atualmente, tem sido implantada a quarta geração (4G), capaz de integrar diversos dispositivos eletrônicos através da identificação de dispositivos (IPs) (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2012).

Para ambos os tipos de telefonia móvel, analógica e digital, os sinais transmitidos e recebidos estão na forma de microondas, um tipo de radiação eletromagnética, denominada radiação eletromagnética de radiofrequência (RF-EMR).

1.2 RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA

A radiação eletromagnética de radiofrequência é caracterizada como radiação não ionizante, com frequências que variam de 300 MHz a 300 GHz (SÁNCHEZ, 2006). A radiação eletromagnética pode assumir diversas formas: luz visível, ondas de rádio, microondas, raios X, infravermelho, ultravioleta, raios gama; cada uma delas definida em um intervalo de comprimentos de onda, frequência e energia (GOMIDE-JÚNIOR, 2008), como representado na figura 2.

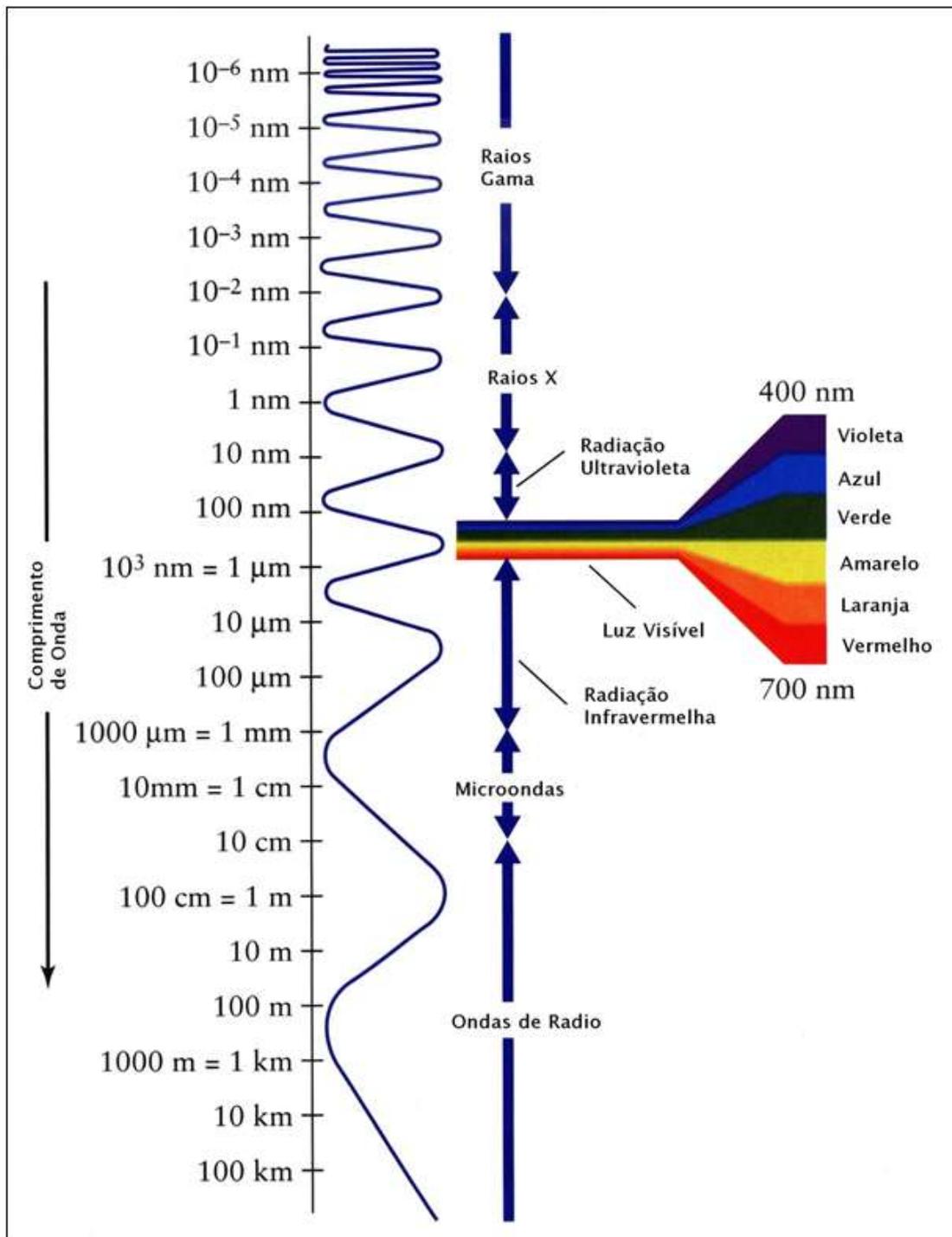


Figura 2. Espectro Eletromagnético.
 Fonte: <http://www.brasilecola.com>

O termo radiofrequência (RF) refere-se às partes do espectro eletromagnético que pode ser utilizado para comunicação e que se situam abaixo da região do infravermelho, com frequências entre 100 kHz to 300 GHz.

As ondas eletromagnéticas são compostas por um campo elétrico (E_x) e um campo magnético (B_y) que vibram em planos perpendiculares entre si, oscilando entre valores positivos e negativos em uma frequência f . A distância ao longo de uma onda, entre dois picos positivos (ou negativos) adjacentes, é chamada comprimento de onda, λ , o qual é inversamente proporcional a frequência (Figura 3).

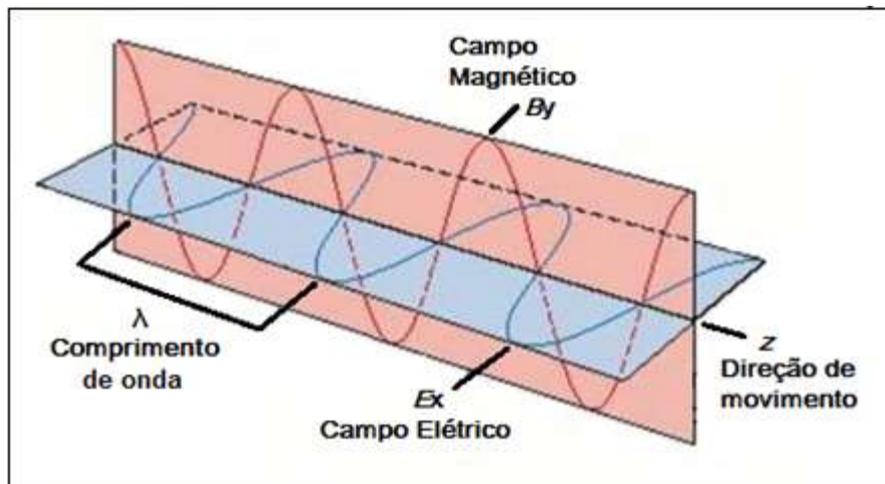


Figura 3. Representação esquemática de uma onda eletromagnética se propagando na direção z . E_x representa o campo elétrico e B_y , o campo magnético; λ representa o comprimento de onda.

Fonte: <http://www.astro.iag.usp.br>

Uma onda eletromagnética pode ser caracterizada pela intensidade do campo elétrico E expresso em volts por metro ($V \times m^{-1}$) e intensidade do campo magnético H expresso em amperes por metro ($A \times m^{-1}$). A quantidade de energia eletromagnética, por unidade de área e por segundo, é chamada densidade de potência (intensidade), S , e é expressa em watts por metro quadrado ($W \times m^{-2}$). Os picos dos campos, elétrico e magnético, ocorrem ao mesmo tempo no espaço; em outras palavras, eles estão em fase e a densidade de potência é igual à intensidade

do campo elétrico multiplicada pela intensidade do campo magnético. A densidade de potência diminui com o aumento da distância a partir da fonte (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2012).

1.3 RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA E SAÚDE

As pessoas estão diariamente expostas à radiação emitida por inúmeras fontes, tais como transmissores de rádio e televisão, satélites, aparelhos celulares e estações de base, radares, assistentes pessoais digitais (PDAs), aplicações sem fio como Bluetooth e Wi-Fi (*Wireless Fidelity*), entre outras.

Essa constante exposição à RF-EMR tem gerado preocupação motivada 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).

Existem limites de emissão e exposição a campos eletromagnéticos, estabelecidos pela *International Commission on Non Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) e o *Institute of Electrical and Electronics Engineers* (IEEE). Os limites de exposição à radiação emitida por telefones móveis são apresentados como medidas de SAR (Taxa de Absorção Específica); nos Estados Unidos e Europa, os valores limites são 1,6 W / Kg e 2,0 W / Kg, respectivamente (ICNRP, 1998; IEEE, 2005).

A preocupação também envolve as 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 do 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 (JENSEN e RAHMAT-SAMII, 1995; ISKANDER et al., 2000; BERNARDI et al., 2001).

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).

Pesquisas sobre o efeito da radiação de microondas são muito heterogêneas. Esses estudos incluem culturas de células e tecidos (*in vitro*) (FRIEDMAN et al. 2007) e animais de laboratório (*in vivo*) (WEISBROT et al. 2003), além de seres humanos (BLACK e HEYNICK, 2003; SÁNCHEZ, 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 (SÁNCHEZ, 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 (SÁNCHEZ, 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 (SÁNCHEZ, 2006;

BERNHART, 1992; BRONZINO, 1995). Brahim Selmaoui, Jacques Lambrozo e Yvan Touitou relataram em 1997 que homens russos apresentavam fadiga, dor de cabeça, perda de sono e outros distúrbios após serem expostos a 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 consequências de distúrbios de saúde, e alguns estudos mostram mudanças comportamentais cognitivas em primatas não-humanos, quando expostos a campos de alta e baixa frequência 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 frequentes quanto à curta exposição a campos eletromagnéticos na frequência de microondas é a indução de transcrição de proteínas específicas (GOODMAN e 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 frequência irradiadas por esses aparelhos também podem afetar a expressão de proteínas, tais como as proteínas c-Jun e c-Fos (STAGG et al. 2001; CHAUHAN et al. 2006a, 2006B). O aumento da expressão dessas proteínas, causado por telefones móveis, pode induzir diversos processos celulares, incluindo replicação (NYLUND e LESZCZYNSKI, 2004, 2006), progressão do ciclo celular (CAPRI et al. 2004) e até apoptose (CARANGLIA et al. 2005; HOOK et al. 2004).

1.4 O HIPOTÁLAMO E A 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, 2011). Em humanos, ela apresenta diâmetro de aproximadamente 1 centímetro e pesa de 0,5 a 1 grama (GUYTON e 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 intermédia, quase sempre inexistente em humanos, porém, é maior e mais funcional em outros animais.

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 um grande número de células gliais (GUYTON e 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 4) (CONSTANZO, 2011).

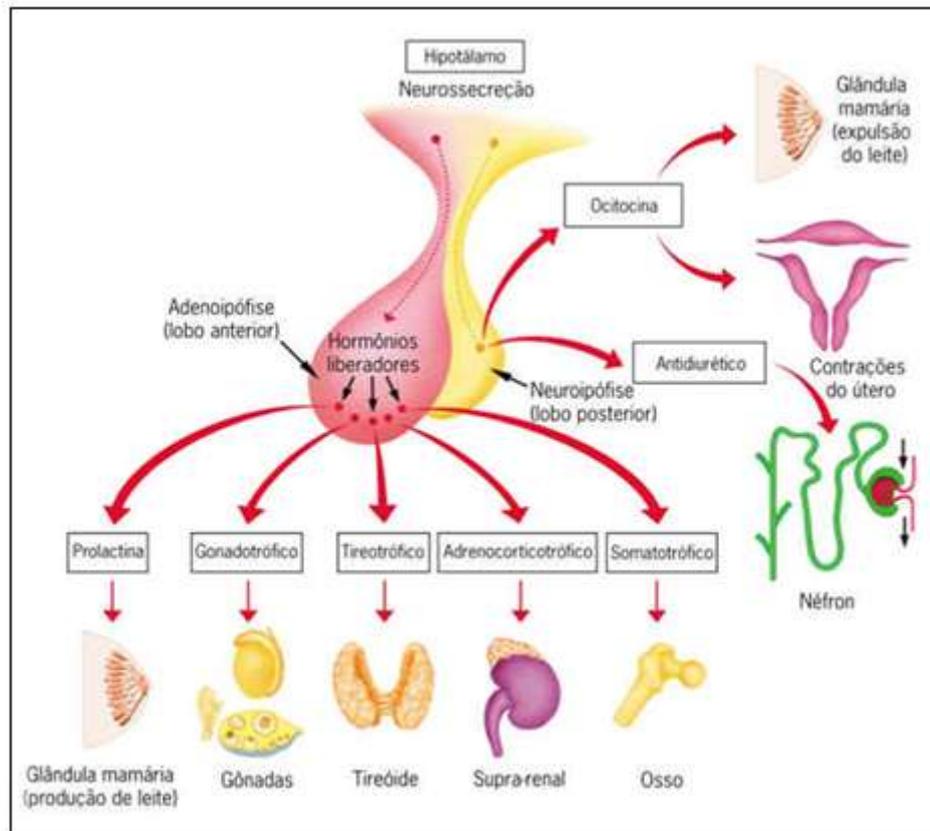


Figura 4. Representação da relação hipotálamo-hipófise com a regulação de glândulas e tecidos (CÉZAR e CEZAR, 2002).

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 kilodaltons (kDa). Ele promove o crescimento de quase todos os tecidos do corpo que são capazes de crescer, aumentando o número e tamanho das células. 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, 2008; GUYTON e 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 Kda, e é sintetizado 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, elevando 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, 2008; ANTUNES, et al., 2004).

A prolactina é um hormônio peptídico de cadeia única com 198 aminoácidos, possuindo massa molecular de 150 kDa, é produzida pelos lactotrofos e é responsável pela promoção de secreção de leite pelas glândulas mamárias (GUYTON e 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 é constituída de quantidades diferentes de aminoácido, 112 e 115, respectivamente, e massa molecular de aproximadamente 30 kDa. 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 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 a produção de testosterona pelos testículos (LOHMEIER, 2003; LONGO e FINCH, 2003).

O hormônio adrenocorticotrópico é produzido e secretado por células especializadas da adeno-hipófise denominadas 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, androgênios desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona produzidos pela zona reticular, ambas zonas do córtex adrenal (GUYTON e HALL, 2006; LONGO e FINCH, 2003).

A neuro-hipófise, outra região muito importante, 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, sendo as responsáveis pela secreção de dois importantes hormônios da hipófise posterior: o hormônio antidiurético (ADH), também chamado de vasopressina e a ocitocina (GUYTON e 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 e 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 o leite seja expulso dos alvéolos para os ductos mamários, onde pode ser sugado pelo bebê (GUYTON e HALL, 2006).

A síntese e secreção de todos os hormônios hipofisários citados acima são controladas pelo hipotálamo, seja por mecanismos neurais ou hormonais (CONSTANZO, 2011). 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 secreção de hormônios estimuladores e inibidores. 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 e HALL, 2006; CONSTANZO, 2011).

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); 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, 2011; LOHMEIER, 2003; LONGO e FINCH, 2003).

Uma vez que o uso de aparelhos celulares tem aumentado, e que ocorre exposição de tecidos do sistema nervoso ao campo eletromagnético durante o seu uso, a comunidade científica tem buscado entender os potenciais efeitos de tal no SNC e as consequências sobre processos coordenados por ele. Além disso, sabe-se que diferentes partes do cérebro são irradiadas por distintas magnitudes de radiação, e tal fato ocorre devido à natureza tecidual de cada região encefálica e do modelo do aparelho emissor de ondas (Takebayashi et al. 2008).

Em 2010, Christ e colaboradores demonstraram que após a exposição de modelos de cabeça e pescoço humanos (crianças jovens a adultos), constituídos de materiais muito semelhantes à tecidos reais - *Phantoms*, não foi detectada diferença na quantidade de radiação absorvida por diferentes regiões tais como córtex, hipocampo e hipotálamo. Além disso, Eskander e colaboradores demonstraram, em 2012, que os níveis dos hormônios ACTH, cortisol, T3, T4, prolactina e testosterona, em humanos, foram alterados após 1 a 6 anos de exposição à radiação emitida por estações rádio-base, indicando alterações no eixo hipófise-adrenal. Já em 2013, após a exposição de ratos a radiação com frequência de 1,8 GHz por 1 a 4 meses, Aboul Ezz e colaboradores obtiveram resultados que mostravam alterações significativas nas concentrações de dopamina, noradrenalina e serotonina, os quais apresentaram flutuações que poderiam indicar alterações no estabelecimento de memória, aprendizado e indução de estresse. Porém, estudos ainda são necessários para o melhor entendimento das possíveis consequências da exposição de mamíferos à radiação eletromagnética de radiofrequência emitida por aparelhos celulares.

1.5 PROTEÍNAS QUINASES

1.5.1 PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK's)

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (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: proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK's); proteínas quinases ativadas por estresse (SAPK's) e grandes proteínas quinases ativadas por mitógenos (BMK's) (KLAUSEN et al., 2005a; YOON e SEGER, 2006; BAR-GILL et al., 2013).

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 e SEGER, 2005; SEGER e KREBS, 1995; YOON e SEGER, 2006; BAR-GILL et al., 2013; LV et al., 2014). As enzimas ERK 1 e ERK 2 ativam diretamente fatores de transcrição gênica de hormônios hipofisários tais como GH, FSH e LH (DUAN et al. 2002; KLAUSEN et al. 2005a; LV et al. 2014). Além disso, também atuam diretamente na síntese e secreção dos hormônios hipotalâmicos (KLAUSEN et al., 2005a). Dentre as proteínas que participam de vias de sinalização de MAPK's estão Ras, Raf, MEK 1, MEK 2, ERK 1 e ERK 2 pertencentes à família de proteínas serino / treonino quinases cuja ativação é dependente da fosforilação concomitante dos resíduos de serina e treonina da própria quinase, e JNK (FRIEDMAN et al., 2007; LESZCZYNSKI et al., 2002; UHLIROVA et al., 2005, COOK et al., 2009; LV et al., 2014), SAPK 1, p38MAPK (SAPK 2) e BMK1 (também conhecida como ERK 5) que são ativadas por sequências 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. Porém, Caraglia e colaboradores mostraram, em 2005, que células KB (células de câncer de boca humanas) não apresentaram alteração na expressão dessas enzimas após serem expostas por 3 horas à radiação com 1,95 GHz de frequência, emitida por um gerador de microondas.

A via de sinalização de ERK 1 e ERK 2 nas células da hipófise inicia-se com a ligação de um sinal, como por exemplo 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 5) (RUBINFELD e SEGER, 2005; KLAUSEN et al. 2005a; UHLIROVA et al. 2005, COOK et al. 2009; LV et al. 2014).

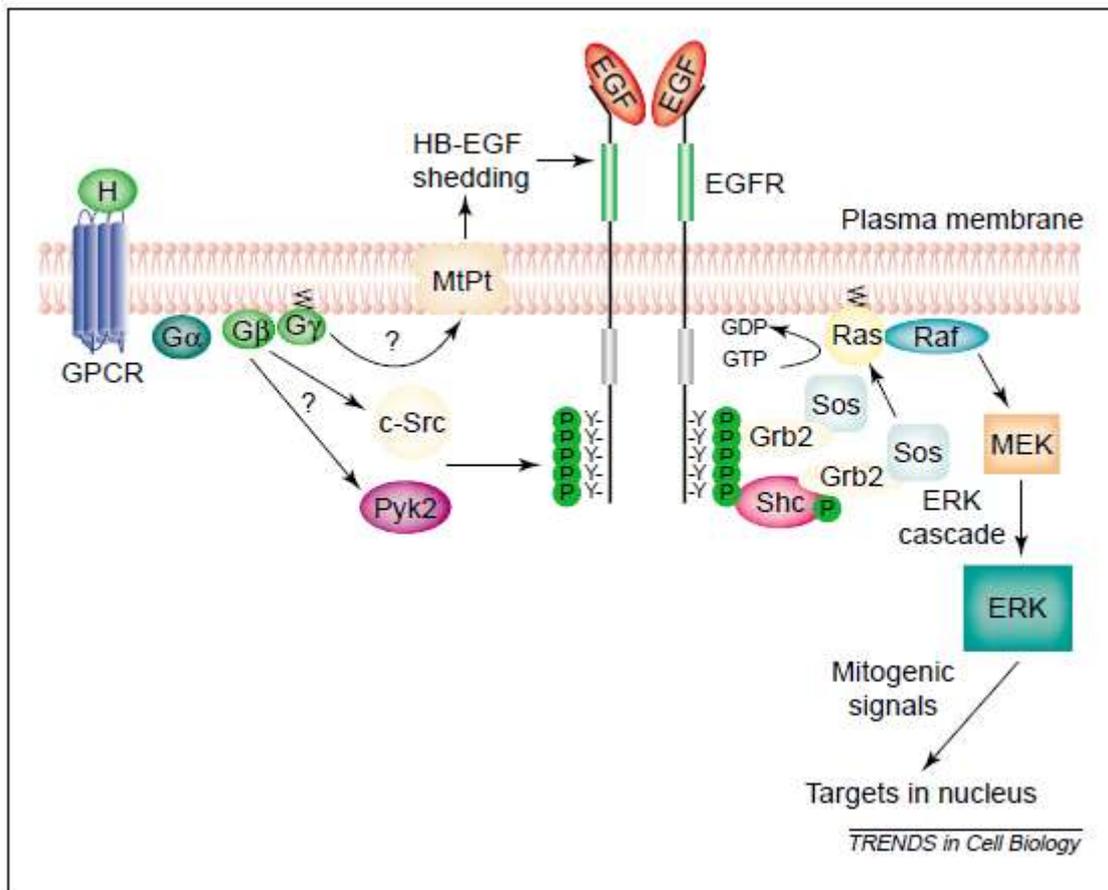


Figura 5. Representação esquemática de uma das vias de sinalização das MAPK's (KHOLODENKO, 2002).

Estudos também tem demonstrado que a exposição de células PC12 (células bipotentes com características neuronais ou endócrinas de acordo com estímulo, porém provenientes de tumores de medula adrenal de ratos) à radiação com frequência de 1,8 GHz, por 16 ou 24 horas, não modifica no funcionamento de MAPK (VALBONESI et al., 2014). Resultados similares foram encontrados por Shigeki Inoue e colaboradores, em 2008, após a exposição de PC12, por 1 hora, à radiação de 2,45 GHz. Além disso, Jae-Seon Lee e colaboradores também observaram (2006) que a exposição de astrócitos, mantidos em cultura, à radiação com frequência de 1,7 GHz, por 30 minutos ou por 1 hora, não promoveu alteração do funcionamento das enzimas ERK 1, ERK 2, JNK 1 e JNK 2. Após a exposição de

Drosophila à radiação eletromagnética (835 MHz), Lee e colaboradores, em 2008, demonstraram aumento na expressão de ERK 1 e 2, o que foi relacionado com aumento da ativação de vias de sinalização que promovem manutenção de sobrevivência das células, uma vez que o aumento de expressão de ERK ocorreu paralelamente ao aumento de JNK, enzima que possui importante atuação no controle de sobrevivência celular.

1.5.2 PROTEÍNAS QUINASE C (PKC's)

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 dessas proteínas na geração de tumores é complexo e depende das isoformas de PKC e dos tipos celulares / teciduais envolvidos (FIELDS e GUSTAFSON, 2003). Tais proteínas atuam na atividade regulatória da proliferação celular, diferenciação e apoptose (ZHU *et al.* 2005; WOUTERS *et al.* 2014). Elas também atuam na via de sinalização de ERK 1 e ERK 2 e sua participação se dá por ativação da enzima Ras, promovendo a transdução de sinais até que ocorra a ativação de ERK 1 e ERK 2 por fosforilação (RUBINFELD e SEGER, 2005; WOUTERS *et al.* 2014).

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.* 2010). Essas enzimas foram descobertas em 1995 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 e 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 e SEGER, 2005; LEVIN, 2011; SORIANO-CAROT *et al.* 2014).

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 e 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.* 2010; LEVIN, 2011; SORIANO-CAROT *et al.* 2014). 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 e HALLAM, 1994; NEWTON, 1997; JAKEN, 1996; WOUTERS *et al.* 2014).

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

gonadotrópicas 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.

Klausen e colaboradores (2005b) 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.

1.6 CATECOLAMINAS E SEUS EFEITOS SOBRE A FORMAÇÃO DE MEMÓRIA

As glândulas adrenais são órgãos bilaterais, localizadas na cavidade retroperitoneal, próximas aos polos superiores de cada rim. Essas glândulas possuem comprimento de aproximadamente 5 cm e espessura de 1 cm, e são consideradas complexas pelo fato de serem histologicamente formadas por dois tecidos distintos que possuem origens embrionárias, bioquímica e características funcionais diferentes. Dentre eles estão a medula adrenal, posicionada centralmente, e que é responsável por secretar catecolaminas, e o córtex, que circunda a medula e secreta corticoides (DOUGLAS, 2000; CONSTANZO, 2011).

O córtex adrenal é embriologicamente originado de células do mesoderma da zona urogenital, que se acumulam entre os somitos e o tubo neural, formando o primórdio córtex adrenal, que posteriormente serão divididos em três camadas distintas: a zona reticular, responsável pela produção de androgênios desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona; a zona fasciculada, que produz cortisol, androgênios e estrogênios adrenais; e a zona glomerulosa, responsável, principalmente, pela produção de aldosterona (GUYTON e HALL, 2006; LONGO e FINCH, 2003), representando cerca de 80% da massa da glândula (LINDA, 2010). Posteriormente, células do ectoderma de linhagem simpatoadrenal, provenientes da crista neural se agregam na periferia do primórdio córtex adrenal e, em seguida, migram para seu interior, constituindo a medula (AUNIS e LANGLEY, 1999), que representa aproximadamente 20% da adrenal (LINDA, 2010). A segregação entre as células da medula e do córtex é um resultado da expressão de diferentes moléculas de adesão entre elas (LANGLEY e AUNIS, 1984; LEON et al., 1992).

A medula adrenal é composta basicamente por células cromafins, neurônios colinérgicos (AUNIS e LANGLEY, 1999; GUYTON e HALL, 2010; LONGO e FINCH, 2003). As células cromafins receberam tal nome por serem facilmente coradas pelo ácido crômico e podem ser classificadas como adrenérgicas: células microscopicamente reconhecidas por possuírem núcleos arredondados e homogeneamente distribuídos no citosol, produtoras de adrenalina; ou noradrenérgicas, que possuem grânulos escuros e de formato irregular, e são produtoras de noradrenalina (ARTALEJO, 1995; DOUGLAS, 2000). Em seres humanos e bovinos, cerca de 75% das células cromafins das adrenais são adrenérgicas, o que em ratos são aproximadamente 85% (AUNIS e LANGLEY, 1999).

A secreção de catecolaminas pelas células cromafins adrenais pode ser modulada pela secreção de outros compostos tais como opióides, encefalinas, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), somatostatina, neurotensina, peptídeo natriurético atrial, neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, também estocados em grânulos de tais células. Além de também serem capazes de secretar dopamina, histamina e serotonina (BURGOYNE, 1991; ARTALEJO, 1995).

O controle da secreção de catecolaminas ocorre através da atuação de fibras pré-ganglionares simpáticas colinérgicas do nervo esplâncnico provenientes da medula espinhal (YAMAGUCHI, 1992). As células cromafins adrenérgicas e noradrenérgicas são inervadas por populações de neurônios pré-ganglionares distintos (EDWARDS et al. 1996), além de que cada uma é individualmente estimulada, sendo desnecessária a união elétrica entre elas (LEON et al., 1992; ZAIKA et al., 2004; GARCÍA, 2012).

Fisiologicamente, as células cromafins são estimuladas pela acetilcolina (ACh), que pode ativar duas classes de receptores de membrana: receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR), disparando uma complexa cadeia de eventos que levam a secreção de catecolaminas (MALHOTRA, 1989; ARTALEJO, 1995). As células adrenérgicas expressam, predominantemente, nAChR, enquanto que as noradrenérgicas expressão mais mAChR (ZAIKA et al., 2004; GARCÍA, 2012).

A eficiência de diferentes classes de agonistas em estimular a secreção de catecolaminas pelas células cromafins depende de sua habilidade em elevar a concentração citoplasmática de íons Ca^{2+} livres através do influxo a partir do meio extracelular ou pela liberação desses íons de pools intracelulares (BURGOYNE, 1991). O principal sinal para a secreção de catecolaminas induzida por ACh é o aumento da concentração intracelular de cálcio livres devido ao influxo deste íon a partir do meio extracelular (ARTALEJO, 1995; GARCÍA, 2012).

A ativação de receptores nicotínicos das células cromafins permite a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} através de canais iônicos. O influxo desses íons promove a abertura de canais de Na^+ dependentes de voltagem, de modo que o processo de despolarização da membrana é dirigido essencialmente pelo Na^+ extracelular (NOONEY et al., 1992; GARCÍA, 2012). A despolarização da membrana plasmática leva à abertura de vários tipos de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e consequente aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} livre devido ao influxo proveniente do meio extracelular (ARTALEJO, 1995; GARCIA et al, 2006).

A estimulação de mAChR pela ACh gera a ativação de fosfolipase C (PLC) que promove a formação de 1,4,5 trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) a partir da quebra de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, localizado na face interna da membrana plasmática. O DAG permanece ancorado à membrana e atua na ativação de PKC. Já o IP_3 , ativa receptores de IP_3 localizados no retículo endoplasmático liso, gerando o efluxo de Ca^{2+} para o citosol (MALHOTRA, 1989; BURGOYNE, 1991). Contudo, a estimulação de nAChRs também pode resultar na elevação da atividade da PLC (EBERHARD e HOLZ, 1988); e o IP_3 também pode elevar a concentração de Ca^{2+} citosólico livre por meio do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} não dependentes de voltagem (MOCHIZUKI-ODA et al., 1991).

Além do efeito da ACh sobre a secreção de catecolaminas, outras substâncias também podem atuar como secretagogos de catecolaminas em células cromafins. Entre elas estão a carbamilcolina, altas concentrações de íons K^+ e cafeína, conhecidos por serem utilizados em estudos de secreção de catecolaminas (ANDREAZZI, 2011; FHANER, 2013; LUKEWICH, 2014).

A carbamilcolina é um análogo sintético da ACh capaz de se ligar aos receptores de ACh localizados na membrana das células cromafins (ANDREAZZI, 2011) e tem sido utilizada em pesquisa pelo fato de não ser degradada pela acetilcolinesterase (ARTALEJO, 1995). Altas concentrações de íons K^+ são capazes de promover a despolarização de membrana plasmática e o disparo de potenciais de ação com, conseqüente abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (FHANER, 2013). Já a cafeína é uma molécula que promove a mobilização de Ca^{2+} após sua ligação a receptores presentes no retículo endoplasmático (GARCIA et al., 2006). Além disso, sabe-se que a cafeína desencadeia a liberação de Ca^{2+} do estoque intracelular, por um mecanismo de cálcio induzido por cálcio (CICR), pode ser oriundo do meio extracelular (O'SULLIVAN et al., 1989) ou da mobilização de outro estoque intracelular (STAUDERMAN et al., 1991).

O processo secretório de catecolaminas está diretamente relacionado ao seu processo de síntese, por isso, a secreção de tais moléculas não promove a diminuição de seus estoques (DUNKLEY et al., 2004; BRIGGS et al., 2014). A biossíntese das catecolaminas se inicia com a captação do aminoácido tirosina, que

e convertida em DOPA (di-hidroxifenilalanina), por ação da enzima tirosina hidroxilase (TH), responsável por acrescentar um radical hidroxila ao anel benzênico de tal aminoácido formando o grupo catecol - sítio bioativo da molécula. A TH é a principal reguladora da via biossintética das catecolaminas e determina a velocidade de síntese; na próxima etapa da via de síntese ocorre com a conversão de DOPA em dopamina, por ação da DOPA descarboxilase. Posteriormente, a dopamina sofre ação da enzima dopamina β -hidroxilase (DBH), dando origem à noradrenalina. Já a síntese da adrenalina, que ocorre nas células cromafins adrenérgicas, é similar à previamente descrita, porém, com uma etapa adicional em que a enzima feniletanolamina-N-metil transferase (PNMT) age sobre a noradrenalina. Sabe-se que a PNMT é positivamente regulada pelo cortisol (GILMAN et al., 2001; WUA e MCLEISH, 2013; BRIGGS et al., 2014).

Já é sabido que as catecolaminas liberadas pela medula adrenal em resposta a diferentes situações exercem várias funções no controle da regulação de diversos processos fisiológicos, no desenvolvimento e manutenção neurológico, psiquiátrico, endócrino, sistema cardiovascular (EISENHOFER, 2004), coordenação da musculatura lisa e do tecido adiposo, pela ativação de proteínas de membrana (BADINO et al., 2005). Além disso, já foi demonstrado que a secreção de adrenalina participa do estabelecimento de memória em roedores e humanos (CAHILL e ALKIRE, 2003; GOLD, 2005; KOROL e GOLD, 2007).

As memórias são fenômenos biológicos de obtenção (aprendizagem), formação, conservação e recordação de informações. Dentre as principais formas de classificação, são denominadas pela função e tempo de duração. Uma delas, a memória de trabalho, é caracterizada como breve e fugaz, e está relacionada ao "gerenciamento da realidade", determinando o contexto em que os fatos, acontecimentos ou outras informações ocorrem, e é processada, fundamentalmente, no córtex pré-frontal. Ela mantém, por segundos ou poucos minutos, a informação que está sendo processada, e pode ser exemplificada com o fato de que quando perguntamos o número de telefone de alguma pessoa, e tal informação só é retida o tempo necessário para decidir o que fazer que os dígitos informados e logo é esquecida (IZQUIERDO, 2002). Dados publicados pelo nosso laboratório, demonstraram que ratos Wistar expostos, por 3 dias, à radiação emitida por telefone

móvel (1,8 GHz) não apresentaram alteração na memória de trabalho, apesar de terem apresentado comportamentos que indicassem estresse (CAIRES et al. 2013).

A memória de longa duração é um tipo de memória que é processada pelo hipocampo e demanda tempo para ser consolidada, além de serem susceptíveis a diversos fatores como traumatismos cranianos, eletrochoques convulsivos, uso de drogas e até à ocorrência de outras memórias (PERRY e IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO, 2002). A secreção moderada de hormônios, tais como adrenalina e corticoides, logo após o aprendizado, pode melhorar a consolidação desse tipo de memória, já o excesso, pode levar à amnésia. A memória de curto prazo, requer as mesmas estruturas nervosas que a de longo prazo (BARROS, 1998) e são aquelas que nos permite lembrar de detalhes de algo aprendido há poucos minutos ou horas. Ela dura poucas horas, justamente o tempo necessário para a consolidação e transformação de memória de longo prazo (IZQUIERDO, 2002).

A adrenalina secretada pelas adrenais não é capaz de chegar facilmente ao encéfalo devido à presença da barreira hematoencefálica, o que impossibilita sua ação direta sobre as funções cerebrais. Porém, ela é capaz de induzir a liberação de glicose estocada no fígado e musculatura esquelética, que, por sua vez, chega às células nervosas e atua na consolidação da memória (GOLD, 2005; KOROL e GOLD, 2007). Estudos mostraram que a utilização de antagonistas bloqueadores de receptores adrenérgicos periféricos promove o bloqueio no estabelecimento de memória após a administração de adrenalina exógena em ratos (STERNBERG et al., 1986). Já com administração de glicose nos mesmos animais, ocorre melhora no estabelecimento da memória, sugerindo que a glicose consegue chegar aos centros controladores de memória (MORRIS et al., 2010). Além disso, a glicose acentua a formação de memória, em ratos que estavam em jejum por 24 horas (TALLEY et al., 2000); e, aplicação de glicose nos ventrículos laterais, septo medial, hipocampo e amígdala também leva à melhora de memória (KREBS e PARENT, 2005; PSYCH et al., 2006; CANAL et al., 2005; MORRIS et al., 2010).

Atualmente, existem alguns estudos considerando o cérebro e sistema nervoso como alvos sensíveis a campos eletromagnéticos de radiofrequência (RF-EMFs) (NATIONAL RADIOLOGICAL PROTECTION BOARD, 2004; ABOUL-EZZ et

al., 2013). Também já foi relatado que cerca de 75% da energia gerada por telefones móveis podem penetrar profundamente à cabeça (WEINBERGER e RICHTER, 2002).

Estudos clínicos em humanos tem mostrado que a radiação emitida por telefones móveis podem afetar o sono e memória (WIHOLM et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que o sistema nervoso de ratos pode responder de maneiras diferentes ao número e duração da exposição (LAI, 1997); enquanto, pouco se sabe sobre o efeito de tal tipo de radiação sobre a secreção de neurotransmissores como, catecolaminas, serotonina e acetilcolina, em cérebro de mamíferos expostos à RF-EMF (ABOUL-EZZ et al., 2013), principalmente sobre a secreção de catecolaminas pelas medulas adrenais.

Diante dessas informações se torna clara a importância da avaliação dos efeitos da radiação emitida por telefones móveis sobre o funcionamento da via das enzimas ERK1 e ERK 2 no hipotálamo e hipófise, e consequências sobre a homeostase do sistema endócrino; e avaliar os efeitos de tal radiação sobre o perfil de secreção de catecolaminas, consolidação de memória de longo prazo e indução de ansiedade em ratos Wistar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição a ondas eletromagnéticas irradiadas por aparelhos celulares (1,8 GHz) sobre o sistema endócrino de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da exposição à radiação, emitida por telefones móveis, sobre os níveis de fosforilação das enzimas MEK 1, MEK 2, ERK 1 e ERK 2 em células do hipotálamo e hipófise;

Avaliar o efeito da exposição à radiação, emitida por telefones móveis, sobre a síntese e secreção de catecolaminas pela medula adrenal;

Avaliar o efeito da exposição à radiação, emitida por telefones móveis, sobre o nível de glicose sérica;

Avaliar o efeito da exposição à radiação, emitida por telefones móveis, sobre a consolidação de memória de longo prazo;

Avaliar se a exposição à radiação, emitida por telefones móveis, induz o estado de ansiedade em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Esse trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL U.S., 2011). O protocolo para uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brasil (Número de permissão: 059 / 2012).

3.2 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, 1769), com 60 dias de idade e 200 ± 20 g de massa corporal, provenientes do Centro da Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF foram usados para esse estudo. Os animais foram acomodados em grupos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 horas (07h00min às 19h00min - claro e 19h00min às 07h00min - escuro) no biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Todos os animais receberam água e ração comercial (Nuvital, Colombo, PR, BR) *ad libitum*.

3.3 PREPARAÇÃO DAS GAIOLAS PARA MANUTENÇÃO E EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS

Considerando a imobilização dos animais, durante processos os experimentais, como é feito na maioria dos trabalhos publicados (SALAMA et al. 2010; KESARI et al. 2010), um fator causador de estresse (KONDO et al., 2013; HAQUE et al., 2013), manter os ratos imóveis durante exposição à radiação poderia afetar os parâmetros avaliados neste estudo. Por isso, gaiolas especiais (Figura 6)

foram construídas para acomodar os animais durante os experimentos, as quais possibilitam a exposição dos animais enquanto estes estão se movimentando livremente, evitando assim alterações em resposta ao estresse.



Figura 6. Gaiolas de experimentação. A, Gaiola usada para acomodar os animais durante os experimentos; B, tampa com tubo PVC acoplado, no qual o aparelho celular permanece durante o período de exposição.

Essas gaiolas possuíam as dimensões de 35 cm de altura, 45 cm de comprimento, 36 cm de largura e foram externamente revestidas com papel alumínio para evitar a dispersão da radiação emitida pelo aparelho celular aos animais controle, os quais foram mantidos a uma distância de 3 m da gaiola contendo os animais expostos. As tampas das gaiolas tinham furos com 0,5 cm de diâmetro por toda a sua extensão, para facilitar a ventilação, e um furo no centro, no qual foi colocado um tubo de cloreto de polivinila (PVC) com um diâmetro de 15 cm. Vários furos de 0,5 cm de diâmetro foram feitos no tubo PVC, dentro do qual foi mantido o telefone celular durante os experimentos, evitando assim o contato direto dos animais com o aparelho. A gaiola está esquematicamente representada na figura 7. Todos os grupos experimentais, tanto controles quanto expostos, foram colocados

em gaiolas idênticas, 3 dias antes da exposição para adaptação, e mantidos durante todo o período experimental.

A intensidade do campo elétrico gerado pela radiação emitida pelo telefone celular dentro das gaiolas foi verificada para avaliar sua uniformidade, já que os animais tinham livre movimentação nas gaiolas. Mensurações da intensidade do campo elétrico também foram realizadas dentro da gaiola dos animais controles enquanto o aparelho celular efetuava ligações dentro da gaiola do animais expostos com o objetivo de verificar se a radiação emitida pelo aparelho poderia afetar os animais do grupo controle. Uma sonda EMR-300 NARDA foi usada para aferir as intensidades de campo elétrico.

As medições foram feitas em três pontos dentro gaiola dos animais expostos (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 telefone celular (3 cm); o ponto B corresponde ao ponto mais distante entre os animais e o aparelho celular (20 cm); o ponto C corresponde ao ponto intermediário (15 cm) e o ponto D corresponde ao local onde foi feita a medição na caixa dos animais controles enquanto o aparelho celular realizava uma ligação dentro da caixa contendo os animais expostos (Figura 7).

A média dos valores da intensidade do campo elétrico no interior da gaiola do grupo exposto foi de $4,7 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$, no ponto A, $4,5 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$, no ponto B e $3,2 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$, no ponto C. Assim, a intensidade média do campo elétrico no interior da gaiola do grupo exposto foi de $4,1 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$; a intensidade média do campo elétrico no interior da gaiola do grupo controle foi de $0,45 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$ no ponto D, cerca de dez vezes menor, e corresponde ao resíduo da radiação ambiente (CAIRES et al., 2011).

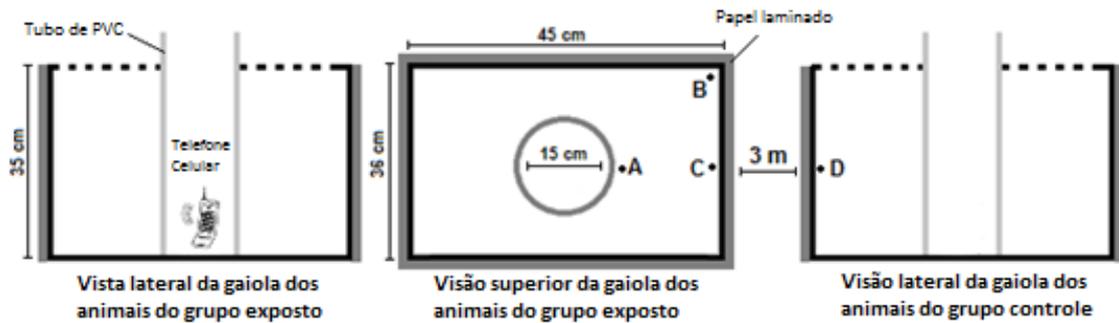


Figura 7. Representação esquemática da gaiola utilizada para acomodar os animais durante os experimentos e representação dos pontos de mensuração de intensidade de campo elétrico gerado pelo aparelho celular.

3.4 MECANISMO ACIONADOR DO TELEFONE CELULAR

O Laboratório de Ótica Aplicada do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF, em conjunto com o nosso Laboratório (Laboratório de Biologia Celular e Molecular - ICB), desenvolveram um mecanismo acionador do telefone celular (Figura 8). Esse mecanismo consiste em um dispositivo eletrônico micro-controlado. Tal dispositivo, além de conectado a uma fonte de alimentação de energia elétrica (tomada), permanece conectado a um sistema de alimentação secundário (*no-break*), o qual garante que o mecanismo funcione mesmo em caso de interrupção no fornecimento de energia primária.

O mecanismo acionador do telefone celular funciona como um *timer* e foi programado para ativar o celular para realizar ligações com duração de 25 segundos a cada 2 minutos. Tanto o mecanismo acionador quanto o aparelho celular operam sem som, luz ou vibração.

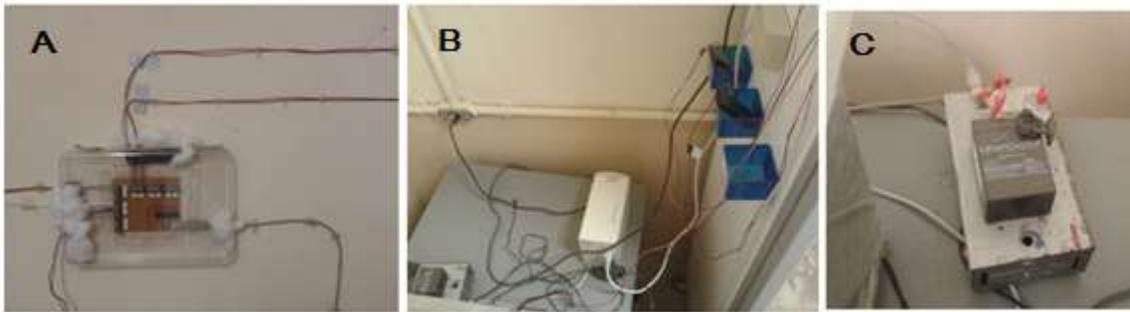


Figura 8. Mecanismo usado para acionar o aparelho celular, a fim de que ele realize chamadas com duração de 25 segundos a cada 2 minutos, durante 3 ou 10 noites. Dispositivo eletrônico micro-controlado (A), conectado aos telefones celulares (B), e ao no-break (C).

3.5 MEDIDAS DA ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO PELA CALOTA CRANIANA DOS RATOS

A taxa de absorção de energia pela calota craniana é relevante nesse estudo. Mais especificamente, nós objetivamos avaliar a energia eletromagnética que é convertida em calor nos tecidos expostos.

Para esta análise, foi construída uma câmara blindada usada para verificar se a radiação emitida por um telefone celular poderia penetrar através do crânio e afetar o tecido encefálico (Figura 9). A câmara foi revestida com papel alumínio para evitar que a radiação chegasse ao seu interior, exceto pelo orifício que não foi revestido. A sonda isotrópica EMR 300 foi posicionada no interior da câmara para mensuração da intensidade do campo elétrico gerada pelo aparelho celular que executava uma ligação. Várias medidas foram realizadas enquanto o crânio (ossos), crânio mais a pele e encéfalo estavam posicionados, em momentos diferentes, no orifício. Também foram realizadas medidas sem qualquer material no orifício (orifício desobstruído). A EMR 300 foi mantida na posição vertical e horizontal que estão relacionadas com a polarização da onda incidente. Um total de 8 experimentos foram realizados: 4 na posição vertical e 4 na posição horizontal.

Já as temperaturas do crânio-pele, encéfalo e ambiente foram monitoradas com o auxílio de um sensor encapsulado por papel alumínio (para evitar que a

radiação eletromagnética emitida pelo celular interferisse no funcionamento) que foram posicionados dentro do encéfalo, entre a pele e crânio e sobre o crânio com o propósito de medir a temperatura dos tecidos enquanto submetidos à radiação.

Posteriormente, o aparelho celular foi posicionado a 3 cm do orifício da câmara (distância mínima os animais e o celular dentro da caixa). Em cada experimento, o aparelho celular foi posicionado e programado para realizar uma ligação de uma hora e a intensidade do campo elétrico e temperatura ambiente e dos tecidos foram medidos.

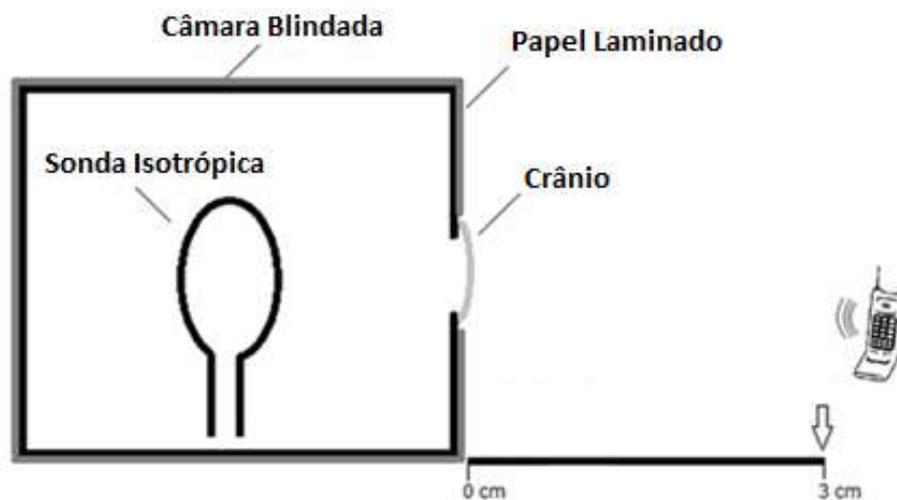


Figura 9. Representação esquemática da câmara utilizada para as medições da absorção da radiação pelo crânio e outros tecidos. A câmara foi revestida por papel alumínio, exceto no orifício usado para acomodar as amostras, e o aparelho celular foi posicionado a 3 cm do orifício. A sonda EMR 300 foi mantida na posição vertical no interior da câmara.

3.6 EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais, cada um contendo 6 animais. Os ratos de quatro dos grupos foram expostos a ondas eletromagnéticas emitidas por um telefone celular (GSM – *Global System for Mobile*) que opera a uma frequência de 1.8 GHz. A média da intensidade do campo elétrico quando o telefone executava ligação foi de $4,1 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$ e $0,1 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$, quando

estava em *stand-by*. Dois grupos de animais foram expostos à radiação emitida durante chamadas de 25 segundos a cada 2 minutos, um por 3 noites e outro por 10 noites (19h00min – 7h00min). Outros dois grupos foram expostos à radiação emitida durante uma única ligação realizada por 1 hora (23h – 00h) ou 3 horas (23h – 02h), sem interrupções. Para cada grupo exposto havia um grupo controle (não exposto). A exposição foi realizada durante o período noturno, pois este é o período de maior atividade desses roedores (PINHEIRO et al., 2011). O telefone celular foi mantido ligado à tomada durante todo o período de exposição e o mecanismo acionador do celular foi usado para realizar as ligações.

3.7 ANÁLISE DE FOSFORILAÇÃO DAS ENZIMAS MEK1, MEK2, ERK1 E ERK2

As análises da sinalização MEK/ERK em células do hipotálamo e hipófise tiveram como objetivo avaliar os efeitos da radiação emitida por telefone celular sobre o funcionamento das células dessas glândulas, e dessa maneira entender melhor os processos de regulação de mecanismos controladores da via de ERK que influenciam na coordenação da produção e secreção de hormônios hipotalâmicos e hipofisários, buscando entender, também, suas consequências sobre o organismo.

Ao fim da exposição, os animais foram submetidos à anestesia (xilazina – 10 mg / kg e quetamina 90 mg / kg), seguida de eutanásia por exsanguinação, para extração do hipotálamo e hipófise, que foram estocadas em microtubos individuais contendo 400 µL de solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, na presença de 2 mM de ortovanadato de sódio e coquetel de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich). Posteriormente, os tecidos foram congelados e o homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 10.621g, seguido da determinação da concentração de proteínas pela metodologia de Bradford (1976).

Os efeitos da exposição às ondas eletromagnética sobre os níveis de fosforilação de MEK1/2 e ERK1/2 foram analisados por eletroforese para separação de proteínas em gel de poliacrilamida, seguido de Western Blot. Para isso, as proteínas foram desnaturadas em tampão SDS (dodecil sulfato de sódio) na

presença de β -mercaptoetanol e aquecimento a 95°C por cinco minutos. A eletroforese foi realizada 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 (GE, Healthcare) 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 fosforiladas em resíduos dos aminoácidos treonina (Thr183) e tirosina (Tyr185), anti-coelho (Cell Signaling Technology, 1:1000) ou contendo anticorpos monoclonais contra as enzimas MEK 1 e MEK 2 fosforiladas em resíduos do aminoácido serina (Ser221), anti-coelho (Cell Signaling Technology, 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., 1:3000).

Logo depois, as membranas foram lavadas três vezes com TBS e incubadas em solução de revelação com luminol (Kit ECL prime; GE, Healthcare) seguida de revelação (Hyperfilm – ECL, Amersham) promovendo sua exposição, por 30 segundos para a detecção das bandas geradas pela marcação das enzimas das enzimas MEK1, MEK2, ERK 1 e ERK 2 fosforiladas. As proteínas imunorreativas foram digitalizadas e a avaliação/quantificação foi feita com o auxílio do programa ABEletr 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.

3.8 AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS

Outros grupos de animais foram formados para a avaliação da secreção de catecolaminas. Após o período de exposição e eutanásia, como descritos acima, a glândula adrenal esquerda de cada animal foi extraída e estocada em solução padrão de Krebs-HEPES (em mM, Cl^- 154.2; Na^+ 144.0; Ca^{2+} 2.5; Mg^{2+} 1.18; SO_4^{2-} 1.2; K^+ 3.5; glicose 11.1; HEPES 25.0; albumina de soro bovino - BSA 0.5%) e mantidas em banho de gelo. As medulas adrenais foram dissecadas pela retirada do córtex, com o auxílio microscópio estereoscópico e tesoura oftalmológica. A fim de facilitar a manipulação, as medulas isoladas foram empaladas em agulhas de aço.

3.8.1 SECREÇÃO BASAL E ESTIMULADA DE CATECOLAMINAS

Foram utilizadas placas Costar de 96 poços; cada poço continha 200 μL de solução padrão Krebs-HEPES ou solução padrão Krebs-HEPES com cafeína (25 mM), um conhecido indutor de liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático capaz de estimular secreção de catecolaminas (GUO et al., 1996). O pH de tais soluções foi mantido entre 7,0 e 7,2, à temperatura ambiente.

As medulas adrenais foram incubadas três vezes (5 minutos), em 3 poços sequenciais contendo solução padrão Krebs-HEPES, seguido de mais uma incubação em solução padrão Krebs-HEPES com cafeína (25 mM), pelo mesmo período de tempo. Subsequentemente, foram adicionados 20 μL de ácido acético P.A. a cada um dos poços para preservar as catecolaminas e todo o volume foi transferido para microtubos; as medulas adrenais foram armazenadas em outros microtubos contendo 200 μL de solução de ácido acético 10% (v / v), para posterior extração, por sonicação (60 MHz por 10 minutos), do conteúdo não secretado. A quantificação da secreção basal (n = 18) e estimulada por cafeína (n = 6) e das catecolaminas remanescentes nas medulas supra-renais foi realizada pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (excitação: 420 nm; emissão: 510 nm) (KELNER et al., 1985), e com a utilização do Variuskan Flash (Thermo). Os dados foram obtidos pela

plotagem dos valores em regressão linear gerada por leitura de uma curva padrão de adrenalina.

Os resultados foram expressos como porcentagem de catecolaminas secretadas em relação ao conteúdo total de cada glândula (valor total de catecolaminas dos 4 poços mais conteúdo não secretado), em outras palavras, foram consideradas variações de tamanho de cada glândula. Além disso, os resultados dos grupos expostos foram normalizados com os grupos controle correspondentes (CARICATI-NETO et al., 2013).

3.9 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA

Outros grupos de animais foram formados para avaliação dos níveis séricos de glicose. Anteriormente à eutanásia, cada grupo experimental foi submetido a um período de jejum. Os grupos expostos por 1 hora, 3 horas, 3 noites e 10 noites permaneceram em jejum por 5 horas (7 pm - 12 am), 7 horas (7 pm - 2 am), 12 horas (7 pm - 7 am) e 12 horas (7 pm - 7 am), respectivamente. Períodos de jejum diferentes poderiam ser utilizados já que cada grupo exposto foi apenas comparado com seu grupo controle correspondente, que também foi submetido ao mesmo período de jejum. O horário e tempo de jejum foram estabelecidos de acordo com estudos prévios sobre comportamento alimentar realizados pelo nosso grupo (PINHEIRO et al., 2011).

Além disso, todos os períodos de jejum usados estão de acordo com períodos encontrados na literatura, o qual considera como estudo metabólico típico, jejum de até 18 horas, contudo, 5 horas é um período suficiente para algumas avaliações, dentro de um contexto fisiológico (AYALA et al., 2010).

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e centrifugadas (6000 rpm; 5 minutos) para obtenção do soro (n = 6 por grupo). Os níveis de glicose foram analisados por espectrofotometria, usando um Kit de ensaio colorimétrico de glicose (Bioclin / Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.10 TESTE DE CRUZ ELEVADA

O teste de cruz elevada (EPM) consistiu em um aparato em forma de cruz, com dois braços abertos (50 cm de comprimento a 10 cm de largura) (OA) e dois braços fechados (50 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes com 40 cm de altura) (EA), todos sem teto, e, elevados a 50 cm do chão. Cada rato foi colocado no centro do aparato, com a cabeça voltada para um dos braços abertos. Dois observadores foram responsáveis por medir, por 5 minutos (período do teste), o tempo ao qual cada animal permaneceu nos OA e EA. Em caso de estado de ansiedade, os roedores tendem a permanecer nos EA, evitando os OA, os quais seriam locais inseguros. Tal situação é apresentada pela diminuição na proporção do tempo gasto e do número de entradas nos OA (HOGG, 1996). Assim, o teste foi utilizado como indicador de ansiedade. A porcentagem do tempo gasto nos braços abertos (% tOA) foi determinado como: $\text{tempo nos OA} / (\text{tempo nos OA} + \text{tempo nos EA}) \times 100$. O uso de %OA, ao invés de considerar apenas as medidas de tempo gasto nos braços abertos é vantajoso considerando as possíveis variações de atividade locomotora de cada indivíduo. Os resultados dos grupos experimentais foram normalizados com seus grupos controle correspondentes (grupo controle n = 9, grupo exposto n = 9).

3.11 TESTE DE ESQUIVA INIBITÓRIA

O teste de esQUIVA inibitória foi utilizado como ferramenta para avaliar a memória de longo prazo dos animais. O aparato tinha 30 cm de comprimento, 30 cm de largura e 50 cm de altura, com uma plataforma isolante de 5 cm de altura em relação ao chão e 7 cm de largura. Tal plataforma funcionava como abrigo contra o choque elétrico da grade do chão do aparato, que era constituído de barras paralelas de aço de 2 mm de diâmetro, com 0.5 cm de distância entre si. O protocolo para o teste de esQUIVA inibitória foi constituído de dois passos: recebimento do

estímulo (choque elétrico), e medida do tempo de retenção (tempo que o animal gastava para deixar a plataforma do aparato), 24 horas mais tarde. O passo de recebimento de estímulo de choque consistiu do posicionamento do animal na plataforma de segurança; no momento em que o animal posicionava as 4 patas na grade do aparato, um breve e suave choque elétrico era disparado (0.5 mA - 2 segundos). Após 24 horas, cada roedor foi, mais uma vez, posicionado na plataforma e o tempo gasto para posicionamento das 4 patas na grade do aparato era medido - (período de latência) valor foi dado como medida de memória de longo prazo; nenhum choque elétrico foi disparado nesse segundo passo. O tempo máximo de latência era de 3 minutos, valor dado como memória de retenção; grupo controle $n = 9$ e grupo exposto $n = 9$. Os resultados dos grupos expostos foram normalizados com os respectivos grupos controles.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de Western Blot foram apresentadas como mediana e intervalo interquartilico, e comparados usando teste de Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$. Os ajustes dos resultados de secreção de catecolaminas e de teste de cruz elevada foram usadas para permitir uma análise comparativa mais clara entre os grupos expostos e os respectivos grupos controles, reduzindo a influência de variações individuais. Elas foram obtidas pela divisão de cada valor dos dados individuais do grupo exposto pelo valor correspondente grupo controle. Os resultados foram analisados usando one-way ANOVA, seguido de Tukey post-Hoc e apresentadas como média \pm erro padrão da média (EPM), assim como os resultados de glicemia. Todos os testes avaliados com nível de significância de 5% ($p < 0.05$) e as análises foram realizadas usando o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 ABSORÇÃO DA RADIAÇÃO PELA CALOTA CRANIANA DOS RATOS

Foram realizadas medidas da intensidade do campo elétrico dentro da câmara blindada na presença e na ausência da calota craniana ($n = 25$). Medidas também foram feitas em função da intensidade da radiação e polarização da antena. Os resultados obtidos não foram relevantes quando a sonda estava na posição horizontal e os valores da força do campo elétrico foram de aproximadamente $0,5 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$; esses valores correspondem ao resíduo de radiação, já que não variaram quando o aparelho celular foi desligado. Por isso, nós só descrevemos os resultados dos experimentos realizados quando a antena da sonda EMR 300 estava posicionada verticalmente.

4.1.1 INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA

Utilizando a configuração do experimento descrito acima e representado na figura 9, foi medida a intensidade do campo elétrico no interior da câmara blindada com o orifício aberto (sem obstrução de papel laminado ou tecido biológico).

A figura 10 mostra um gráfico de intensidade de campo elétrico com polarização vertical. O telefone celular foi ligado a 3 cm do orifício da parede da câmara e, nota-se que houve uma considerável variação da amplitude do campo elétrico em relação aos valores de leitura observados quando o aparelho celular não efetuava ligação. Para a distância de 20 cm, a intensidade do campo variou entre $0,9$ e $0,4 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$.

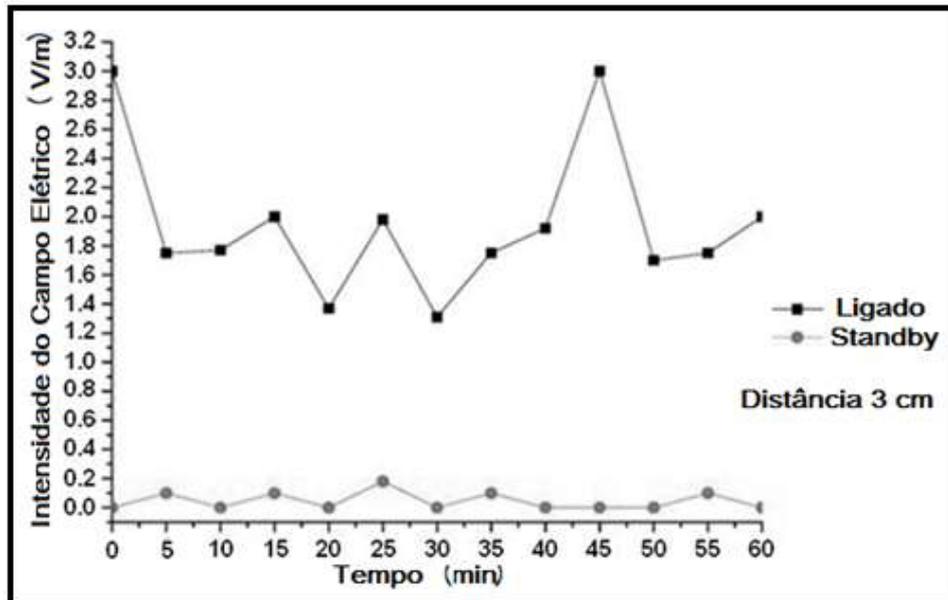


Figura 10. Intensidade do campo elétrico em função do tempo. Os valores foram medidos pela sonda que estava dentro da câmara com a antena próxima a abertura, e quando o telefone celular efetuava ligação ou não, sem tecidos biológicos. A intensidade do campo elétrico foi medida durante uma ligação de 60 minutos. O aparelho celular foi posicionado a 3 cm do orifício da câmara. A ligação efetuada pelo aparelho celular foi iniciada no $t = 0$.

4.1.2 INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA COM O CRÂNIO

A figura 11 mostra a intensidade do campo elétrico em função do tempo. Nesta situação, tanto o cérebro quanto os ossos do crânio mais a pele (ossos mais pele) do animal foram colocados no orifício (veja a figura 9). É importante enfatizar que as medidas foram feitas separadamente, ou seja, num determinado momento foi medida a força do campo somente com o cérebro e, posteriormente, ossos mais a pele.

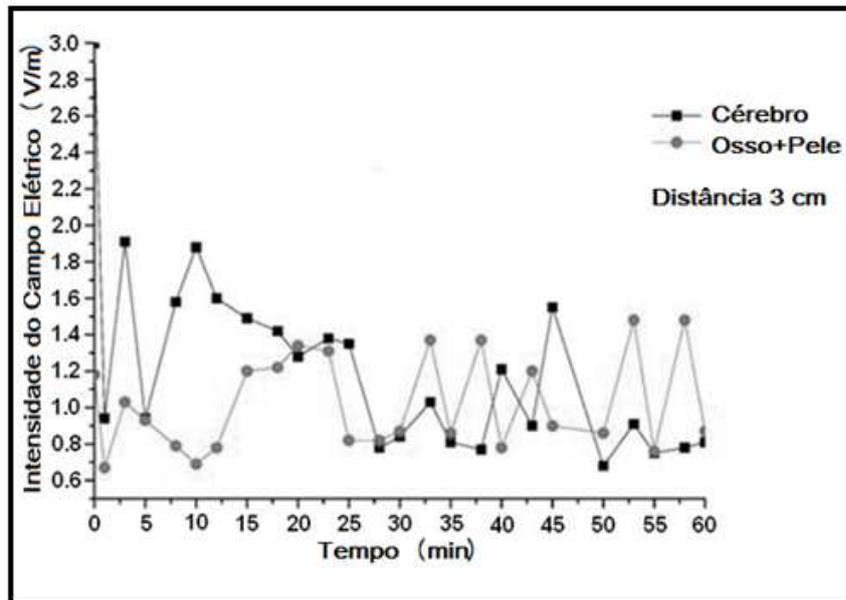


Figura 11. Intensidade do campo elétrico dentro da câmara blindada em função do tempo. As medidas da intensidade do campo elétrico foram realizadas com o cérebro do animal ou com os ossos do crânio mais a pele (ossos mais pele) posicionados no orifício da câmara blindada durante 60 minutos. Estas medidas foram realizadas em momentos diferentes, primeiramente, o cérebro foi colocado no orifício e, em seguida, os ossos mais a pele. O telefone celular foi posicionado a 3 cm de distância do orifício na parede da câmara. O aparelho celular iniciou uma ligação em $t = 0$.

Os valores das forças do campo elétrico a uma distância de 20 cm foram da ordem de $0,5 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$, o que corresponde à radiação residual. Assim, somente descrevemos os resultados para 3 cm de distância.

4.2 TEMPERATURA DOS TECIDOS SOB EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO

Utilizando a mesma câmara, foram feitas medidas de temperatura de tecidos da cabeça de um rato pra verificar se ocorreria variação de temperatura após a exposição por 1 hora, com o aparelho celular posicionada a 3 centímetros.

A figura 13 representa os valores de temperatura em função do tempo para diferentes tecidos biológicos. Estes resultados foram obtidos por medidas realizadas quando o telefone celular (ligado) estava a 3 cm de distância da parede da câmara.

No gráfico, o termo "Osso + Pele" se refere às medidas de temperatura com o sensor posicionado entre o osso e a pele da cabeça do animal; "Cérebro" se refere à temperatura no interior do cérebro e, "Ambiente", temperatura da sala usada durante o teste. Os valores foram registrados durante o período de 60 minutos.

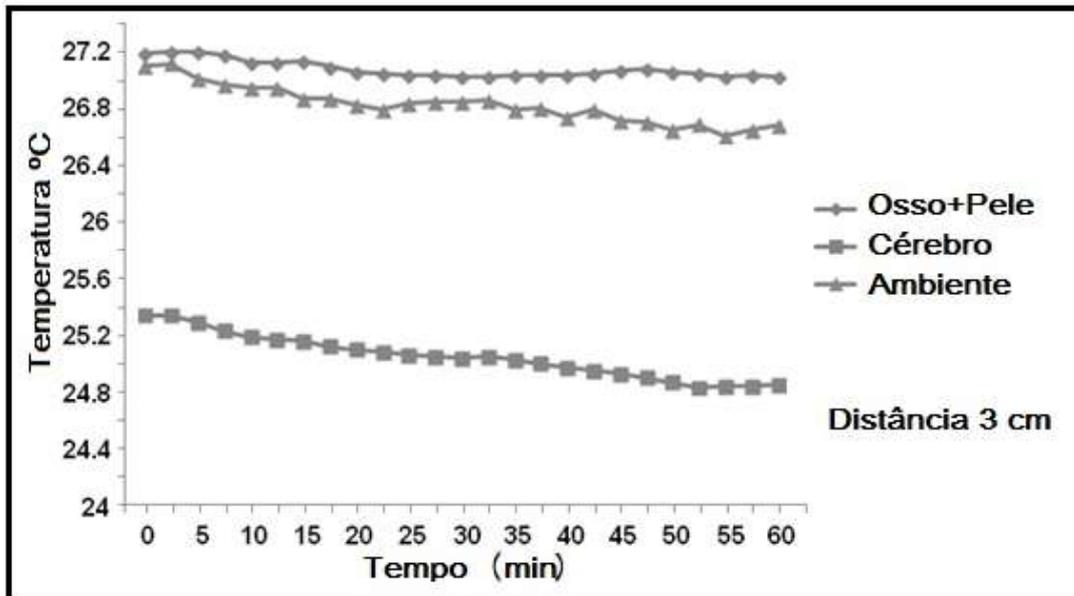


Figura 12. Valores de temperatura medidos em função do tempo para os diferentes tecidos biológicos. A temperatura foi medida no exterior (ambiente externo), no interior do cérebro e entre os ossos do crânio e a pele durante 60 minutos. Estas medidas foram realizadas em momentos diferentes, enquanto o cérebro ou osso e a pele estavam posicionado no orifício da câmara blindada. O telefone celular foi posicionado a 3 cm do orifício da câmara. O aparelho celular iniciou uma ligação em $t = 0$.

4.3 NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DE MEK 1, MEK 2, ERK 1 E ERK 2 EM CÉLULAS DO HIPOTÁLAMO E HIPÓFISE APÓS EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO

4.3.1 NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DE MEK 1 / 2 E ERK 1 / 2 APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO

As enzimas MEK 1 e MEK 2 possuem a mesma massa molecular (45 KDa); além disso, neste trabalho foi utilizado um anticorpo específico para as duas. Dessa maneira, as bandas correspondentes a MEK 1 e MEK 2 se sobrepõem.

A figura 13A demonstra que as células hipotalâmicas dos animais submetidos à radiação por 1 hora, apresentaram aumento nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2. O grupo controle apresentou mediana de 0,007 e intervalo interquartílico 0,001 (n = 5), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 0,011 e intervalo interquartílico 0,005 (n = 5); U = 0; p= 0,008.

Os níveis de fosforilação de ERK 1 e ERK 2 (Figura 13B-C) também se encontraram aumentados nas células do hipotálamo dos animais expostos. Quanto ao nível de fosforilação de ERK 1, o grupo controle apresentou mediana igual a 0,032 e intervalo interquartílico 0,004 (n = 5), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 0,035 e intervalo interquartílico 0,003 (n = 5); U = 1; p = 0,016. A análise do nível de fosforilação de ERK 2 revelou mediana de 0,036 e intervalo interquartílico 0,004 (n = 5) para o grupo controle, enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 0,044 e intervalo interquartílico 0,004 (n = 5); U = 2; p = 0,032.

Não houve diferença significativa nos níveis de fosforilação das enzimas MEK1 / 2 e ERK1 / 2, nas células hipofisárias dos animais expostos comparados aos animais controles, como representado na figura 13D-F. Quanto ao nível de fosforilação de MEK 1 / 2, encontramos mediana de 0,003 e intervalo interquartílico 0,001 (n = 5) para o grupo controle, enquanto o grupo exposto por 1 hora, apresentou mediana de 0,002 e intervalo interquartílico 0,002 (n = 5); U = 5; p = 0,151. O grupo controle apresentou mediana igual a 0,068 e intervalo interquartílico 0,013 (n = 5) e o grupo exposto, mediana de 0,055 e intervalo interquartílico 0,010 (n = 5) correspondente ao nível de fosforilação de ERK 1; U = 5; p = 0,151; enquanto que para ERK 2, o grupo controle revelou mediana de 0,069 e intervalo interquartílico 0,027 (n = 5) e o grupo exposto apresentou mediana de 0,071 e intervalo interquartílico 0,017 (n = 5); U = 12; p= 0,944.

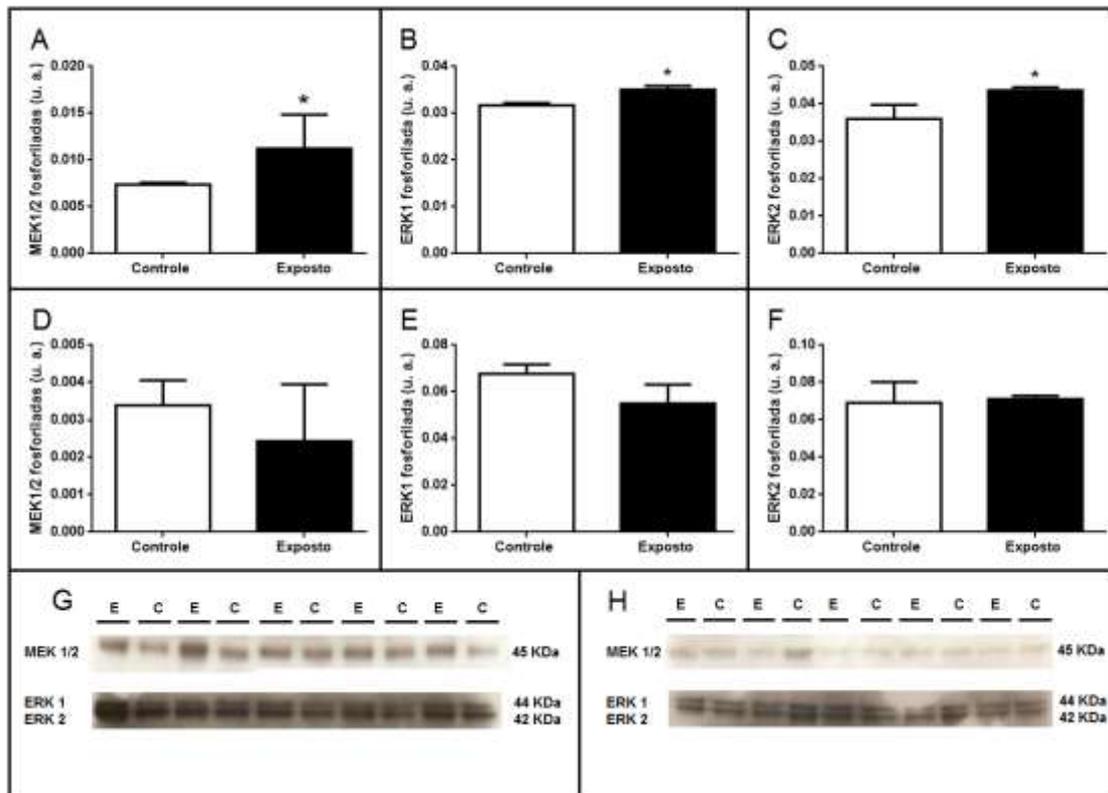


Figura 13. Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 1 hora, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar. A, avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipotalâmicas. **B,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipotalâmicas. **C,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 2 em células hipotalâmicas. **D,** avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipofisárias. **E,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipofisárias. **F,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 2 em células hipofisárias. **G e H,** bandas representativas dos resultados obtidos por Western Blot, em células hipotalâmicas e hipofisárias, respectivamente. Cada grupo era composto por 5 animais. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados usando teste de Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4.3.2 NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DE MEK 1 / 2 E ERK 1 / 2 APÓS 3 HORAS DE EXPOSIÇÃO

Como demonstrado na figura 14A, as células hipotalâmicas dos animais submetidos à radiação eletromagnética por 3 horas apresentaram níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2 aumentados em relação aos controles. O grupo controle apresentou mediana de 0,012 e intervalo interquartilico 0,003 ($n = 5$),

enquanto o exposto apresentou mediana de 0,013 e intervalo interquartilico 0,002 (n = 5); U = 1; p = 0,016.

Os níveis de fosforilação de ERK 1 e ERK 2 (Figura 14B-C) não sofreram alteração nas células hipotalâmicas dos animais expostos à radiofrequência. Quanto ao nível de fosforilação de ERK 1, encontramos mediana igual a 0,018 e intervalo interquartilico 0,004 (n = 4) para o grupo controle, enquanto o grupo exposto por 3 horas apresentou mediana de 0,019 e intervalo interquartilico 0,004 (n = 5); U = 8; p = 0,683. Já na análise de ERK 2, o grupo controle revelou mediana de 0,024 e intervalo interquartilico 0,009 (n = 4) e o grupo exposto apresentou mediana de 0,024 e intervalo interquartilico 0,008 (n = 5); U = 9; p = 0,873.

Não houve diferença significativa nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2, ERK 1 / 2 nas células hipofisárias dos animais expostos por 3 horas, como representado na figura 14D-F. Quanto ao nível de fosforilação de MEK 1 / 2, encontramos mediana igual a 0,010 e intervalo interquartilico 0,001 (n = 4) para o grupo controle, enquanto o exposto apresentou mediana de 0,009 e intervalo interquartilico 0,003 (n = 4); U = 8; p = 0,999. O grupo controle revelou mediana de 0,062 e intervalo interquartilico 0,016 (n = 4) e o grupo exposto, mediana de 0,063 e intervalo interquartilico 0,011 (n = 5) correspondente ao nível de fosforilação de ERK 1; U = 8; p = 0,714; enquanto que para ERK 2, o grupo controle apresentou mediana igual a 0,073 e intervalo interquartilico 0,017 (n = 4) e o grupo exposto apresentou mediana de 0,070 e intervalo interquartilico 0,026, n=5; U = 9; p = 0,825.

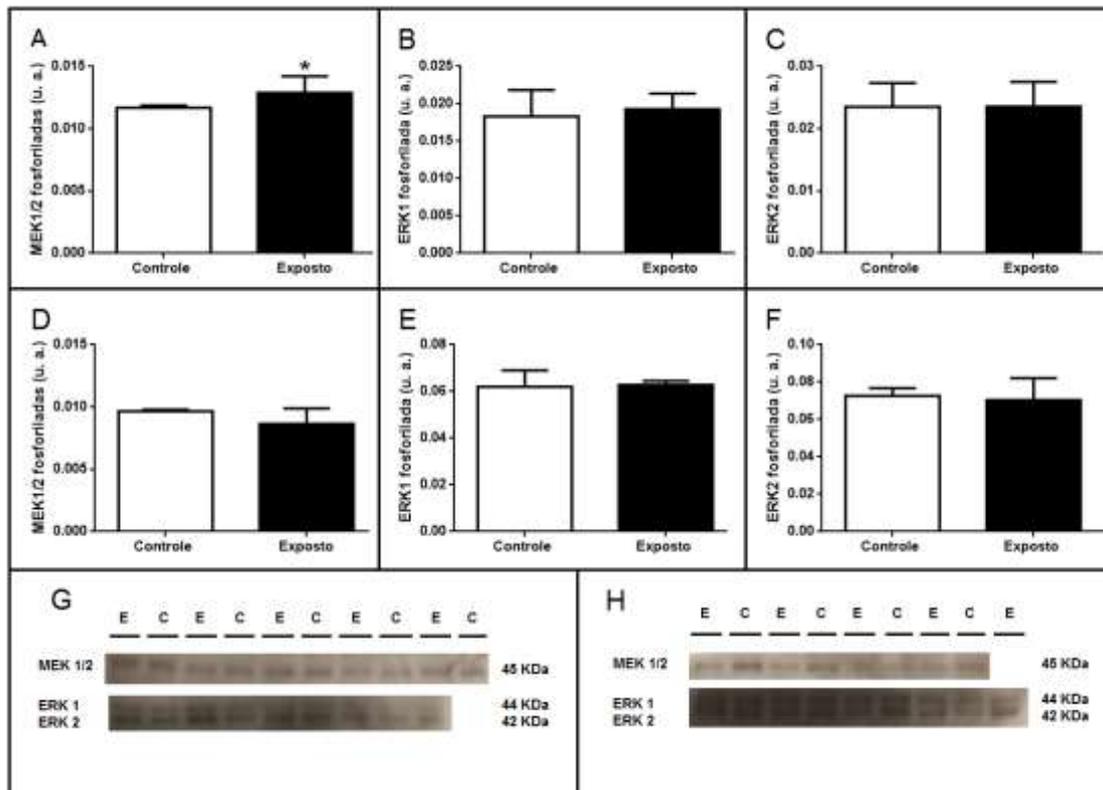


Figura 14. Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 3 horas, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar. A, avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipotalâmicas. **B,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipotalâmicas. **C,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 2 em células hipotalâmicas. **D,** avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipofisárias. **E,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipofisárias. **F,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 2 em células hipofisárias. **G e H,** bandas representativas dos resultados obtidos por Western Blot, em células hipotalâmicas e hipofisárias, respectivamente. Cada grupo era composto por 4 a 5 animais. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartilico e comparados usando teste de Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4.3.3 NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DE MEK 1 / 2 E ERK 1 / 2 APÓS 3 NOITES DE EXPOSIÇÃO

A figura 15A demonstra um aumento nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2 nas células hipotalâmicas dos animais submetidos a 3 noites de radiação. O grupo controle apresentou mediana de 0,007 e intervalo interquartilico 0,004 ($n =$

5), enquanto o exposto apresentou mediana de 0,009 e intervalo interquartílico 0,003 (n = 5); U = 0; p = 0,008.

Os níveis de fosforilação de ERK 1 e ERK 2 (Figura 15B-C), nas células do hipotálamo, não sofreram alteração nos animais expostos por 3 noites. Quanto ao nível de fosforilação de ERK 1, encontramos para o grupo controle, mediana de 0,037 e intervalo interquartílico 0,019 (n = 4), enquanto que para o exposto, mediana de 0,036 e intervalo interquartílico 0,016 (n = 5); U = 10; p = 0,999. Já na análise de ERK 2, encontramos mediana igual a 0,044 e intervalo interquartílico 0,010 (n = 4) para o grupo controle e mediana igual a 0,044 e intervalo interquartílico 0,017 (n = 5) para o grupo exposto; U = 9; p = 0,825.

As células hipofisárias não apresentaram os níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2, ERK 1 / 2 alterados, após exposição à radiofrequência por 3 noites, como representado na figura 15D-F. A análise de MEK1 / 2 revelou mediana igual a 0,009 e intervalo interquartílico 0,004 (n = 5) para o grupo controle e mediana igual a 0,007 e intervalo interquartílico 0,001 (n = 5) para o grupo exposto; U = 6; p = 0,222. Quanto ao nível de fosforilação de ERK 1, o grupo controle apresentou mediana de 0,042 e intervalo interquartílico 0,006 (n = 5), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 0,041 e intervalo interquartílico 0,009 (n = 4); U = 8; p = 0,683. O grupo controle apresentou mediana de 0,041 e intervalo interquartílico 0,007 (n = 5) e o grupo exposto, mediana de 0,044 e intervalo interquartílico 0,008 (n = 4) correspondentes ao nível de fosforilação de ERK 2 ; U = 5; p = 0,286.

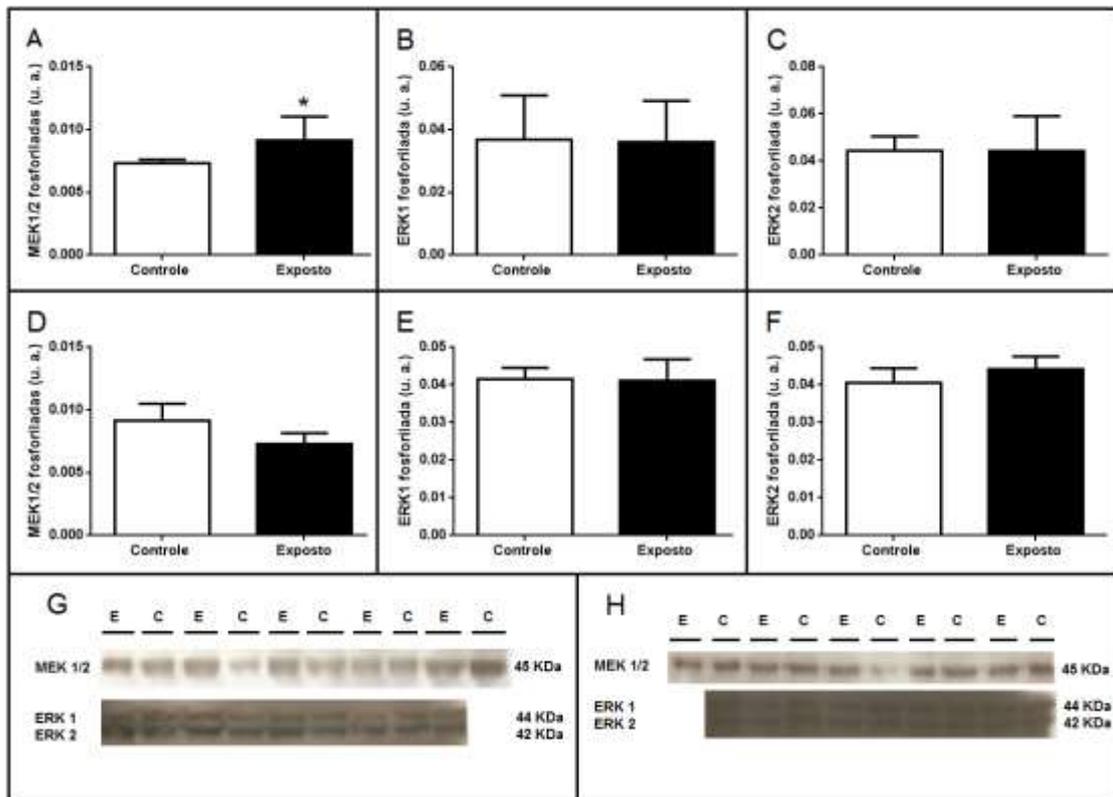


Figura 15. Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 3 noites, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar. A, avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipotalâmicas. B, avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipotalâmicas. C, avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipotalâmicas. D, avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipofisárias. E, avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipofisárias. F, avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipofisárias. G e H, bandas representativas dos resultados obtidos por Western Blot, em células hipotalâmicas e hipofisárias, respectivamente. Cada grupo era composto por 5 animais. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e comparados usando teste de Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4.3.4 NÍVEL DE FOSFORILAÇÃO DE MEK 1 / 2 E ERK 1 / 2 APÓS 10 NOITES DE EXPOSIÇÃO

Como representado na figura 16A, as células hipotalâmicas dos animais submetidos a 10 noites de radiação apresentaram aumento nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2. O grupo controle apresentou mediana de 0,008

e intervalo interquartilico 0,002 ($n = 5$), enquanto o exposto apresentou mediana de 0,011 e intervalo interquartilico 0,004 ($n = 5$); $U = 2$; $p = 0,032$.

Os níveis de fosforilação de ERK 1 e ERK 2 (Figura 16B-C), das células do hipotálamo, não sofreram alteração após 10 noites de exposição à radiofrequência. Quanto ao nível de fosforilação de ERK 1, encontramos mediana igual a 0,028 e intervalo interquartilico 0,011 ($n = 4$) para o grupo controle, enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 0,036 e intervalo interquartilico 0,032 ($n = 5$); $U = 7$; $p = 0,524$. A análise de ERK 2 revelou mediana igual a 0,045 e intervalo interquartilico 0,003 ($n = 4$) para o grupo controle, e mediana igual a 0,056 e intervalo interquartilico 0,032 ($n = 5$) para o grupo exposto; $U = 7$; $p = 0,524$.

Não foram encontradas alterações significativas nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2, ERK 1 e ERK 2 nas células hipofisárias dos animais expostos (Figura 16D-F). Quanto ao nível de fosforilação de MEK 1 e MEK 2, o grupo controle apresentou mediana de 0,011 e intervalo interquartilico 0,007 ($n = 5$), enquanto o exposto apresentou mediana de 0,009 e intervalo interquartilico 0,005 ($n = 5$); $U = 9$; $p = 0,532$. O grupo controle apresentou mediana igual a 0,025 e intervalo interquartilico 0,013 ($n = 4$) e o grupo exposto apresentou mediana de 0,025 e intervalo interquartilico 0,011 ($n = 5$) para ERK 1; $U = 10$; $p = 0,999$. A análise de ERK 2 revelou mediana igual a 0,027 e intervalo interquartilico 0,015 ($n = 4$) para o grupo controle e mediana igual a 0,026 e intervalo interquartilico 0,005 ($n = 5$) para o grupo exposto por 10 noites; $U = 9$; $p = 0,873$.

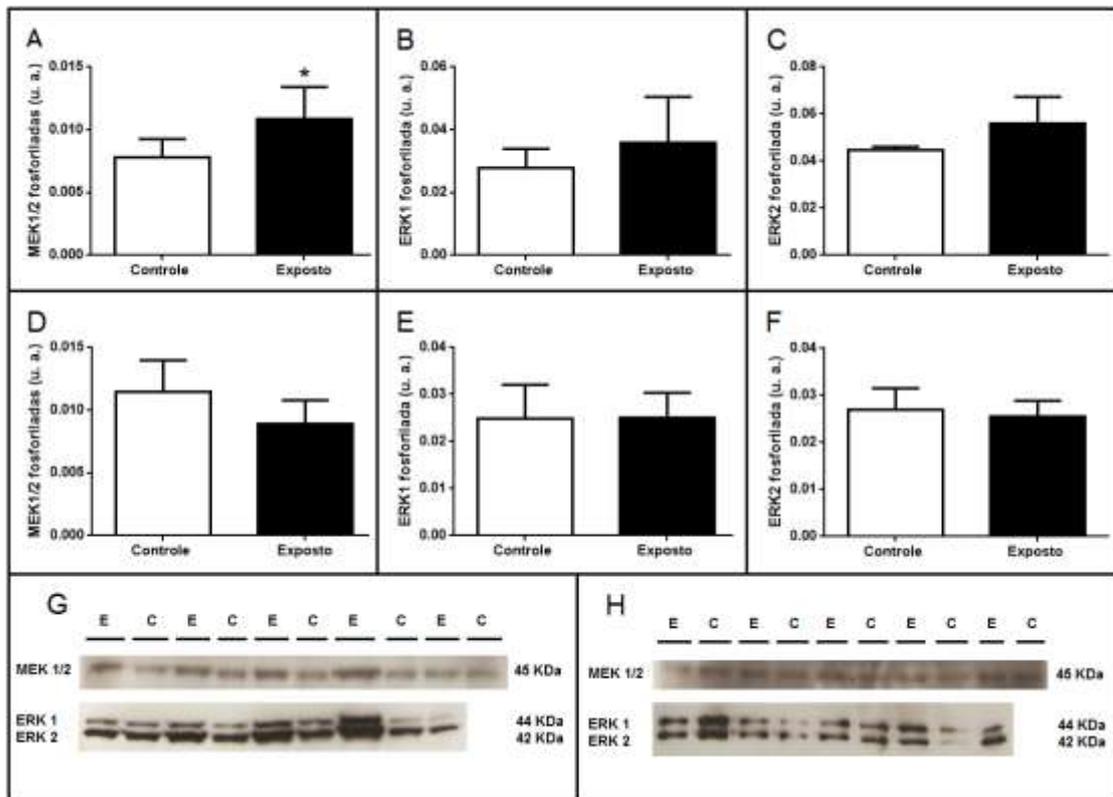


Figura 16. Efeito da exposição à radiação emitida por aparelho celular, por 10 noites, sobre os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2, em células do hipotálamo e hipófise de ratos Wistar. A, avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipotalâmicas. **B,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipotalâmicas. **C,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipotalâmicas. **D,** avaliação do nível de fosforilação de MEK 1 / 2 em células hipofisárias. **E,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipofisárias. **F,** avaliação do nível de fosforilação de ERK 1 em células hipofisárias. **G e H,** bandas representativas dos resultados obtidos por Western Blot, em células hipotalâmicas e hipofisárias, respectivamente. Cada grupo era composto por 5 animais. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e comparados usando teste de Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4.4 SECREÇÃO DE CATECOLAMINAS

Os animais do grupo exposto por 1 hora apresentaram secreção basal de catecolaminas 77,9% maior do que o grupo controle ($p = 0,023$). Após 3 horas de exposição, a secreção basal foi 93,3% maior ($p = 0,007$) (Figura 17A). Não houve diferença entre os valores de secreção dos grupos expostos por 1 e 3 horas ($p = 0,827$). Além disso, os animais expostos por 3 e 10 noites não apresentaram valores

de secreção basal alterados quando comparados com os respectivos grupos controles ($p = 0,236$; $p = 0,133$ respectivamente), como mostrado na figura 17B. Também não houve diferença quando comparados os valores apresentados pelos grupos expostos por 3 e 10 noites ($p = 0,935$).

A secreção de catecolaminas, estimulada por cafeína, não foi alterada nos animais do grupo irradiado por 1 hora ($p = 0,75$). Porém, após 3 horas de exposição, ocorreu aumento de 77,3% na secreção estimulada ($p = 0,037$); e nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos expostos à radiação por 1 e 3 horas ($p = 0,094$) (Figura 17C). Após 3 e 10 noites, as médias da secreção estimulada foi 78,5% e 61,3% maior do que os animais controles correspondentes ($p = 0,0003$ e $p = 0,001$ respectivamente) (Figura 17D); além disso, não houve diferença entre os dois grupos expostos ($p = 0,197$).

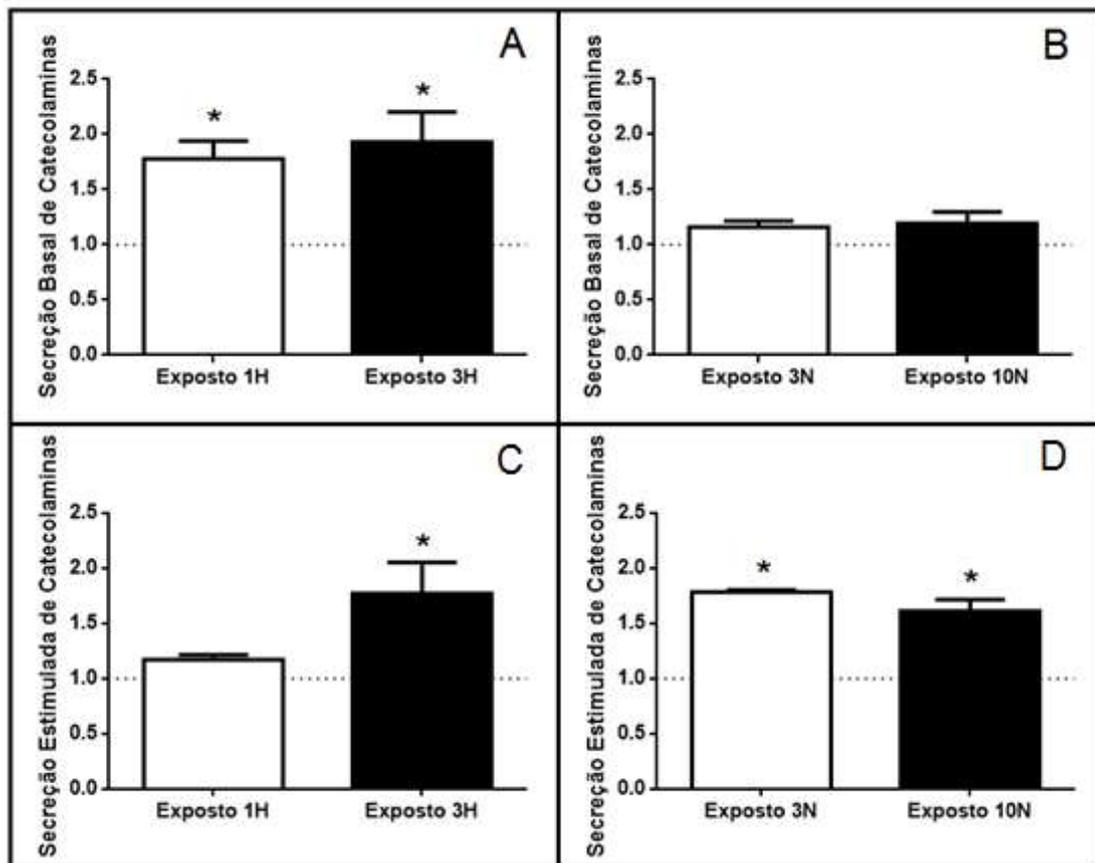


Figura 17. Efeito da exposição à RF-EMR sobre a secreção basal e estimulada de catecolaminas em ratos Wistar. **A**, Secreção basal de catecolaminas dos grupos expostos por 1 e 3 horas. **B**, Secreção basal de catecolaminas após 3 e 10 noites de exposição. **C**, Secreção de catecolaminas estimulada por cafeína dos animais expostos por 1 e 3 horas. **D**, Secreção de catecolaminas estimulada por cafeína dos animais expostos por 3 e 10 noites. Todas as análises foram realizadas comparando animais de um grupo exposto com o grupo controle correspondente. Cada grupo utilizado para avaliar a secreção basal de catecolaminas era constituído por 18 animais, enquanto que os cada grupo utilizado para avaliar a secreção estimulada por cafeínas era constituído por 6. Dados expressos como média \pm SEM. (*), (**) e (***) representam diferenças significativas com, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente.

4.5 NÍVEL DE GLICOSE SÉRICA

Após uma 1 hora de exposição, os animais apresentaram glicemia 25,6% aumentada ($n = 6$; $p = 0,018$); os animais expostos por 3 horas não apresentaram alteração de glicemia ($n = 6$; $p = 0,598$) e tais animais apresentam redução significativa em relação aos animais expostos por 1 hora ($n = 6$; $p = 0,009$) (Figura

18A). Após a exposição de animais por 3 noites, não foram encontradas modificações nos níveis de glicose ($n = 6$; $p = 0,999$), porém, os animais expostos por 10 noites apresentaram níveis de 10,8% menor que os animais do grupo controle ($n = 6$; $p = 0,012$) (Figura 18B). Não houve diferença estatística entre grupos expostos por 3 e 10 noites ($n = 6$; $p = 0,156$).

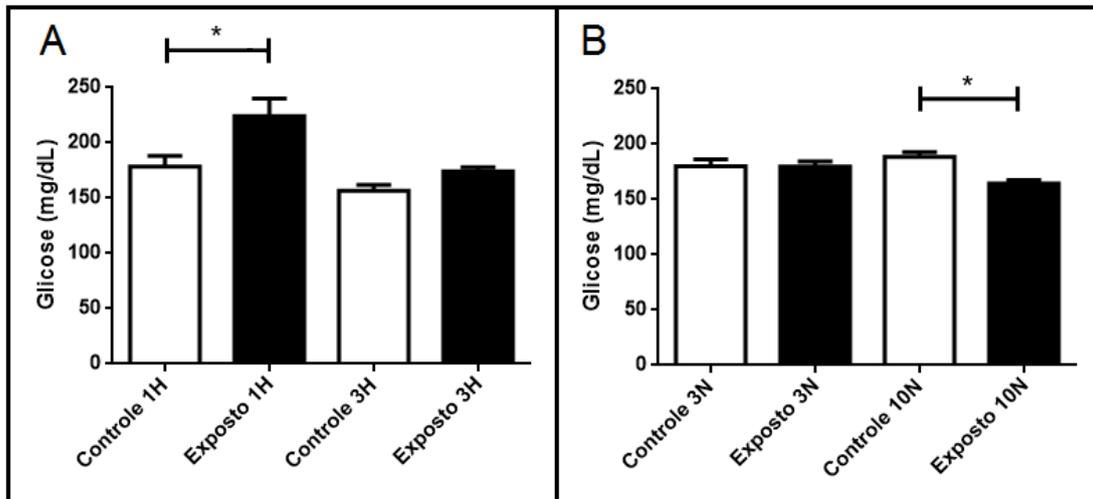


Figura 18. Efeito da exposição à RF-EMR sobre o nível sérico de glicose em ratos Wistar. **A**, Níveis séricos de glicose em animais expostos por 1 e 3 horas. **B**, Níveis séricos de glicose em animais expostos por 3 e 10 noites. Cada grupo era composto por 6 animais. Dados expressos como média \pm SEM. (*) e (**) representam diferenças significativas com, $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente.

4.6 TESTE DE CRUZ ELEVADA

Após 1 hora de exposição, o tempo gasto pelos animais nos braços abertos (% tOA) não foi significativamente diferente do tempo gasto pelos animais controle mas foi observada uma tendência à diminuição de 19,2 % ($p = 0,309$). Um resultado bastante similar foi obtido após a avaliação dos animais expostos por 3 horas; uma tendência de diminuição de 18,47% na exploração dos braços abertos ($p = 0,518$), como mostrado na figura 19A. Não houve diferença significativa entre os grupos expostos por 1 e 3 horas ($p = 0,890$). Além disso, não foram encontradas alterações

nas médias entre os grupos de animais exposto por 3 e 10 noites e seus respectivos controles ($p = 0,693$ e $p = 0,704$ respectivamente). Não existiu diferença entre os grupos expostos por 3 e 10 noites ($p = 0,999$) (Figura 19B).

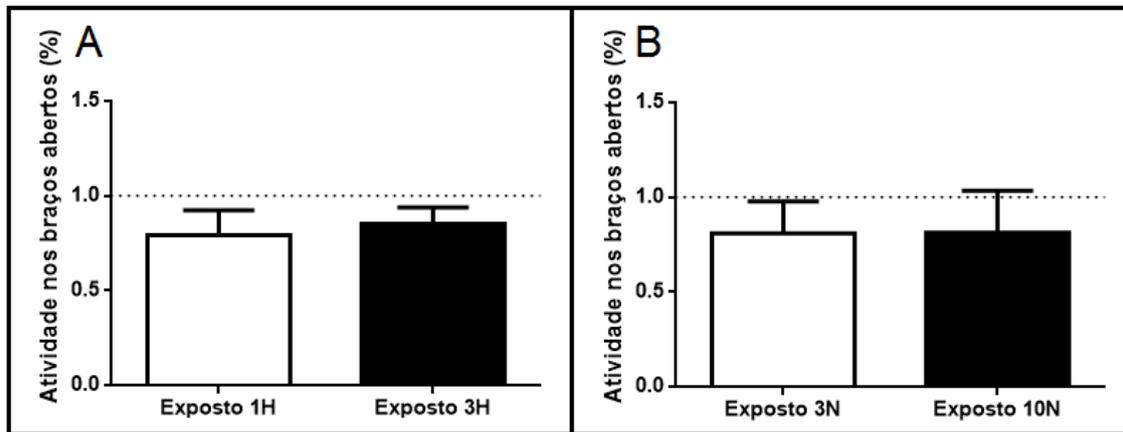


Figura 19. Efeito da exposição à RF-EMF sobre o estabelecimento de estado de ansiedade em ratos Wistar. **A**, atividade dos animais expostos por 1 hora, 3 horas nos braços abertos do aparato de Teste de Cruz Elevada. **B**, atividade dos animais expostos por 3 noites e 10 noites nos braços abertos do aparato de Teste de Cruz Elevada. Dados expressos como média \pm EPM para os valores referentes à atividade nos braços abertos do aparato de Cruz Elevada. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

4.7 ESQUIVA INIBITÓRIA

Os animais expostos por 1 hora apresentaram tendência a aumentar o tempo gasto na plataforma de segurança do aparato de esquiva inibitória - tempo de latência, que em outras palavras, pode significar uma tendência ao aumento da consolidação de memória de longo prazo. O grupo controle apresentou mediana de 8,350 e intervalo interquartil 8,525 ($n = 9$), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 180 e intervalo interquartil 171,675 ($n = 9$); $U = 23,50$; $p = 0.133$. Após 3 horas exposição, não foi observada alteração no tempo de permanência dos animais na plataforma. O grupo controle apresentou mediana de 40,35 e intervalo interquartil 165,72 ($n = 9$), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 14,70 e intervalo interquartil 127,37 ($n = 9$); $U = 31,50$; $p = 0,447$ (Figura 20A). Os animais expostos por 3 noites não apresentaram alteração no tempo de latência. O grupo controle apresentou mediana de 42,10 e intervalo interquartil 107,42 ($n =$

9), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 17,10 e intervalo interquartílico 56,18 ($n = 9$); $U = 27$; $p = 0,249$. Porém, após 10 noites, o grupo exposto apresentou diminuição do tempo gasto na plataforma. O grupo controle apresentou mediana de 52,45 e intervalo interquartílico 160,99 ($n = 9$), enquanto o grupo exposto apresentou mediana de 10,20 e intervalo interquartílico 12,95 ($n = 9$); $U = 9$; $p = 0.007$ (Figura 20B).

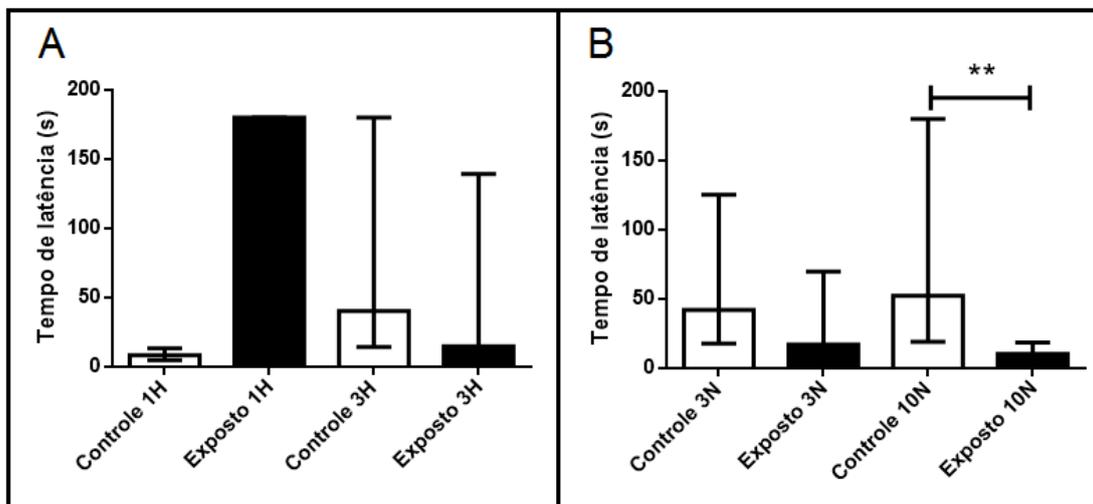


Figura 20. Efeito da exposição de ratos Wistar a RF-EMF sobre o estabelecimento memória de longo prazo. **A**, tempo gasto pelos animais expostos por 1 hora, 3 horas sobre a plataforma de segurança do aparato de Teste de Esquiva Inibitória (tempo de latência). **B**, tempo gasto pelos animais expostos por 3 noites e 10 noites sobre a plataforma de segurança dos aparato de Teste de Esquiva Inibitória (tempo de latência). Dados expressos como mediana e intervalo interquartílico. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivos, avaliar os efeitos da radiação eletromagnética de radiofrequência, emitida por telefones móveis, sobre o funcionamento do hipotálamo, hipófise e glândulas supra-renais, sobre a consolidação da memória de longo prazo e indução do estado de ansiedade em ratos Wistar machos. Para isso, foram avaliados os níveis de fosforilação das enzimas MEK 1, MEK 2, ERK 1 e ERK 2 em células hipotalâmicas e hipofisárias, os níveis de secreção de catecolaminas, basal e estimulada, os níveis de glicose sérica, além do comportamento dos animais nos testes de cruz elevada e esquiva inibitória.

Nas células do hipotálamo e hipófise, a via de sinalização celular da qual participam as enzimas MEK1 / 2 e ERK 1 / 2, tem papel central na regulação da expressão gênica e secreção de diversos hormônios (DUAN et al., 2002; KLAUSEN et al., 2005a; BLISS et al., 2010). A regulação da secreção de catecolaminas e o controle da glicemia são importantes para coordenar processos metabólicos (SALA et al., 2008; SILVA e BIANCO et al., 2008) e estão relacionados à consolidação de memória (GOLD et al., 2005); e alterações no perfil de secreção de catecolaminas podem estar associadas ao estado de ansiedade (SOETER e KINDT, 2011a, 2011b; KINDT e SOETER, 2013). Com base nessas informações, nós realizamos um estudo avaliando os efeitos da radiação, emitida por aparelhos celulares, sobre o funcionamento do sistema endócrino em ratos Wistar.

Nesse trabalho, nós avaliamos os efeitos da exposição à radiação eletromagnética em duas condições distintas, aguda e sub-crônica; para isso adotamos dois protocolos de exposição: ligação única com duração de 1 ou 3 horas ou múltiplas ligações (25 segundos) por período de 3 ou 10 noites. A exposição foi realizada durante o período noturno, pois este é o período de maior atividade dos roedores (PINHEIRO et al., 2011), com a intenção de simular a forma pela qual os seres humanos estão expostos a tal tipo de radiação, durante o seu período de maior atividade, o dia.

As medidas da intensidade do campo elétrico, gerado pelo aparelho celular no interior das gaiolas (Figura 7), comprovaram a eficiência da blindagem, pois a radiação emitida durante a exposição dos animais do grupo tratado não era capaz de atingir os animais do grupo controle, os quais estavam localizados a uma distância de 3 metros. Além disso, a intensidade do campo elétrico no interior da gaiola dos animais expostos foi similar em todos os três pontos aferidos, apresentando uma média de $4.1 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$; assim, podemos afirmar que os animais foram expostos a radiação, independentemente da posição dentro da gaiola.

Como demonstrado, a RF-EMR é capaz de atravessar tecidos como pele e ossos do crânio de ratos, podendo, assim alcançar os tecidos aqui estudados (Figura 11). A radiação emitida pelos telefones móveis chega até os órgãos no interior da caixa craniana, porém não é capaz de provocar aumento de temperatura desses tecidos, como representado na figura 12. Assim, é possível que os efeitos observados nesse estudo, como as modificações na via das MAPKs, estão relacionados aos efeitos não térmicos da radiação eletromagnética de radiofrequência, e não ao calor (efeitos térmicos). A ideia de efeito não térmico da radiação é reforçada pelos estudos de fosforilação de MEKs e ERKs, proteínas que foram afetadas no hipotálamo, mas não apresentaram variação na hipófise. Considerando que esses dois tecidos são anatomicamente muito próximos, se o efeito observado fosse térmico, era de se esperar algum efeito também nesta glândula.

Também é importante considerar que o mecanismo ativador do aparelho celular, que consiste em um microcontrolador que coordena o funcionamento dos telefones por sinal eletrônico, não emite som ou luz visível para os ratos, assim como os aparelhos celulares, os quais tiveram seus sistema de som desligados e todas as fontes de luz foram devidamente bloqueadas.

A exposição dos animais à radiação, por 1 hora, promoveu aumento nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1, MEK 2, ERK 1 e ERK 2, em células hipotalâmicas (Figura 13A-C), mas não alterou significativamente os níveis de fosforilação dessas enzimas em células hipofisárias (Figuras 13D-F). Um estudo realizado em 2007, por Friedman e colaboradores, demonstrou um aumento na

atividade das proteínas p38 e ERKs em células Rat-1 e HeLa, 2 minutos após a exposição à radiação emitida por uma antena (FRIEDMAN et al., 2007). O aumento dos níveis de fosforilação dessas enzimas está relacionado ao aumento de sua atividade, porém, a adição de apenas um grupamento fosfato não é suficiente para a ativação, mas sim a adição de dois; e a retirada de apenas um desses dois grupamentos é suficiente para sua completa inativação (ARMSTRONG et al., 2009; WORTZEL e SEGER, 2011).

Sabendo que a via de ERK exerce controle sobre a expressão de genes de hormônios hipotalâmicos, tais como GnRH e GHRH, e hipofisários, LH, FSH e GH, pela ativação de fatores de transcrição (KLAUSEN et al., 2005a; DUAN et al., 2002; BLISS et al., 2010), modificações nessa via, como o aumento da fosforilação dessas proteínas aqui observado, poderiam estar ligadas a alterações dos níveis plasmáticos dos hormônios hipotalâmicos. Porém, como não foi detectada alteração no funcionamento da via estudada em células da hipófise dos mesmos animais, nós propomos que o processo de ativação dos genes dos hormônios hipotalâmicos controlados por ERK provavelmente não teria sido completado, e que não tenha havido tempo suficiente para maior secreção hormonal, ou ainda, que podem estar ocorrendo alterações nos mecanismos de controle pós-traducionais referentes aos RNAm de GnRH e / ou de GHRH, e com isso, não alterando significativamente a via de ERK na hipófise. Outros estudos são necessários para avaliação dos níveis plasmáticos desses hormônios, além da avaliação da expressão dos genes a eles relacionados.

Diante disso, nós consideramos possível que os níveis plasmáticos dos hormônios hipofisários não estejam alterados, porém, uma diminuição não significativa nos níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 foi encontrada em células hipofisárias, e por isso é importante deixar claro que alterações não significativas não conferem, necessariamente, a ausência de respostas biológicas.

O aumento dos níveis de fosforilação de ERK 1 e ERK 2 nas células do hipotálamo após 1 hora de exposição, aqui demonstrados, corroboram os dados do grupo de Friedman, que também apresentaram aumento significativo nos níveis de fosforilação de ERK 1 / 2 após a exposição de células em cultura. Porém, devemos

ressaltar que os resultados publicados por Friedman e colaboradores (2007) foram obtidos após a exposição de células em cultura, por períodos de 2 a 30 minutos, à radiação eletromagnética em uma frequência de 875 MHz. Em nossos estudos realizados *in vivo*, ratos foram expostos à radiação utilizando frequência de 1800 MHz, por períodos de 1 hora, 3 horas, 3 noites ou 10 noites. Assim, as células avaliadas estavam sujeitas à comunicação com células do mesmo ou de diferentes tecidos. Além disso, diferentes tipos de células podem apresentar distintos mecanismos de regulação de MEK1 / 2 e ERK 1 / 2.

Por outro lado, os resultados referentes às células hipofisárias, divergem de outros dados de nosso laboratório, que demonstraram diminuição significativa dos níveis de fosforilação de ERK 1 / 2 em células da hipófise de ratos Wistar, após 1 hora de exposição durante o dia (CAIRES, 2011). No presente estudo, os animais foram expostos durante o período de maior atividade inata, o período noturno (PINHEIRO et al., 2011), o que nos permite especular a possibilidade de haver diferenças no funcionamento nos processos de sinalização intra e / ou extracelular de determinados tipos de células, se comparados como os dados obtidos após exposição à radiação no período diurno.

Após 3 horas de exposição, as células hipotalâmicas apresentaram um aumento significativo apenas nos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 e MEK 2 (Figuras 14A), e não foram observadas modificações em células hipofisárias (Figuras 14D-F). É possível que após tal período de exposição, as células do hipotálamo e hipófise estejam passando por um processo de adaptação, de forma que o aumento no nível de fosforilação de MEK 1 / 2, nas células hipotalâmicas, não seja suficiente para fosforilar quantidades consideravelmente maiores de proteínas ERK 1 e ERK 2, de maneira que possa ser detectada pelo método usado. Nas células hipofisárias, a tendência a diminuição do nível de fosforilação da enzima ERK 1 observada após 1 hora de exposição (Figura 13B), desapareceu após 3 horas (Figura 14B). Além disso, os valores das medidas de ERK 1 e ERK 2 fosforiladas dos grupos controle e tratado, no hipotálamo, são muito próximas e, por isso, não esperamos que existam variações nos níveis plasmáticos hormonais (GnRH e GHRH). Consideramos possível a existência de níveis plasmáticos normais dos hormônios hipofisários, LH, FHS e GH, mas também não podemos descartar a

existência de alguma resposta biológica à diminuição não significativa da fosforilação de MEK 1 / 2 na hipófise, tendo com consequência alterações no funcionamento das células. Em 2005, um estudo realizado por Caraglia e colaboradores demonstrou que a exposição de células KB à radiação com 1,95 GHz de frequência levou à redução na atividade de ERK 1 / 2, o que foi relacionado à indução de apoptose, porém, tais resultados foram obtidos *in vitro* o que é importante a ser considerado, uma vez que a realização de experimentos com células em cultura podem gerar resultados diferentes devido a ausência de comunicação com diferentes células e sinais de outros tecidos.

Os animais expostos por 3 ou 10 noites, apresentaram alterações apenas nas enzimas MEK 1 e MEK 2 das células hipotalâmicas (Figuras 15A e 16A) e não foram detectadas modificações significativas em células hipofisárias (Figuras 15D-F e 16D-F). Assim como nos resultados obtidos com os animais expostos por 3 horas, os valores dos níveis de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2 encontradas nos animais dos grupos controle e expostos por 3 ou 10 noites são próximos, não sendo constatadas significâncias (Figura 15A e 16A). Dessa maneira, é possível que os animais expostos em cada um desses dois tratamentos apresentem semelhantes perfis de níveis plasmáticos dos hormônios hipotalâmicos e hipofisários esperados para os animais expostos por 3 horas.

O estudo prévio realizado em nosso laboratório, além da diminuição dos níveis de fosforilação de ERK 1 / 2 após 1 hora de exposição à radiação (1800 MHz) durante o período diurno, citada anteriormente, também revelou diminuição desses níveis após 3 horas de exposição. Somente após 3 dias, foi observado diminuição dos efeitos da RF-EMR sobre a fosforilação de ERK 1 / 2, e ausência de modificações após 10 dias (CAIRES, 2011). Assim, comparando esses dados prévios com os atuais, é possível perceber que a mudança no protocolo de exposição, do período diurno para o período noturno, conferiu maior velocidade às células, para que se adaptassem ao estresse gerado pela radiação. No presente estudo, a diminuição dos efeitos sobre os níveis de fosforilação das proteínas ERK 1 e ERK 2 já é percebido após 3 horas de exposição.

Outros estudos são necessários para maior entendimento dos efeitos da radiação emitida por aparelhos celulares sobre os processos de sinalização intra e extracelular. Além disso, estudos mais detalhados sobre a expressão gênica das enzimas MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 e dos hormônios hipotalâmicos e hipofisários aqui tratados podem gerar maior entendimento sobre os processos de adaptação (plasticidade) na regulação da via das MAPKs.

De acordo com a figura 17A, os animais expostos, por 1 e 3 horas à radiação, apresentaram um aumento significativo na secreção basal de catecolaminas. Esse aumento está relacionado a condições de estresse (EISENHOFER et al., 2004; CORTEZ et al., 2012), uma vez que a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) pela medula adrenal, é um indicador de resposta ao estresse (KNOWLES et al., 2011). As células cromafins são colinergicamente inervadas pelo nervo esplênico (sistema nervoso simpático) e a acetilcolina secretada, sob estimulação desse nervo, ativa receptores nicotínicos de acetilcolina nas células cromafins, promovendo a indução da despolarização de membrana que promove a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem, e assim, permitem a entrada desse íon, induzindo a liberação de catecolaminas (DOUGLAS e RUBIN, 1961; FENWICK et al., 1982). Além disso, a acetilcolina também estimula receptores muscarínicos, que leva a ativação de fosfolipase C (PLC), acarretando na produção de IP₃, que é capaz de induzir a liberação de íons Ca²⁺ mobilizados em estoques intracelulares (GARCIA, 1998). Portanto, a secreção basal de catecolaminas pode ser um indicativo de hiperativação do sistema nervoso simpático e existem estudos que mostram que situações de estresse são capazes de estimular tal sistema e, conseqüentemente aumentar a secreção de catecolaminas pelas adrenais (AXELROD et al., 1984, ADAMEOVA et al., 2009).

Após 3 e 10 noites de exposição à RF-EMR, o perfil de secreção basal de catecolaminas dos animais não foi afetado (Figura 17B), o que poderia ser explicado como um processo de adaptação que pode ocorrer, entre outras formas, pela redução de resposta da medula adrenal, por processos de *downregulation* de receptores colinérgicos das células cromafins, devido ao estresse crônico (KONARSKA et al., 1989).

A estimulação de secreção de catecolaminas por cafeína ocorre através de mobilização de cálcio proveniente de estoque citoplasmático (ROUSSEAU, 1988). A cafeína é capaz de elevar a frequência de abertura de canais de íons cálcio presentes no retículo endoplasmático, gerando aumento da concentração desse íon no citoplasma e conseqüentemente, induzindo a secreção de catecolaminas (GARCIA et al., 1995). Como mostrado na figura 17C, nenhuma alteração na secreção de catecolaminas, foi detectada após 1 hora de exposição; no entanto os animais expostos por 3 horas, 3 noites e 10 noites à radiação eletromagnética, apresentaram aumento da secreção de catecolaminas estimulada por cafeína (Figura 17C e 17D). Esses dados sugerem que as células cromafins destes animais estavam mais sensíveis aos estímulos desencadeados pelo efluxo de cálcio. Mesmo sem alterações na secreção basal nos animais expostos por 3 e 10 noites, foi observado aumento da sensibilidade ao efluxo de cálcio e tal fato pode ser um indicativo de adaptação do sistema fisiológico. É importante ressaltar que os *pools* intracelulares de cálcio regulam a secreção de catecolaminas estimulada pela entrada de cálcio do meio extracelular (LARA et al., 1997; GARCIA, 1998) Já a ausência de modificação no perfil de secreção estimulada após a exposição por 1 hora, poderia ser explicada pelo fato de que esse curto período, 1 hora, não seja suficiente para afetar processos de controle e estoque de cálcio no retículo ou processos de sinalização *upstream*.

Como esperado, após 1 hora de exposição, o nível de glicose seguiu a mesma tendência do perfil de secreção basal de catecolaminas encontrado, veja a figura 18A. Os animais expostos por 1 hora apresentaram aumento no nível de glicose, o que está relacionado com o aumento da secreção basal de catecolaminas. O nível de glicose sérica é rapidamente e diretamente afetado pela secreção de catecolaminas na circulação sanguínea (WANG et al., 2013), pois as catecolaminas são responsáveis por promover glicogenólise nos músculos e fígado (DUFOR, 2009, YOUNG, 1985). Após a exposição por 3 horas, não foi encontrada alteração na glicemia dos animais (Figura 18A), apesar do aumento da secreção basal de catecolaminas (Figura 17A), o que poderia ser explicado pela ocorrência de processo de contrarregulação ao excesso de catecolaminas secretadas. Quanto aos animais expostos por 3 noites, nenhuma alteração de glicemia (Figura 18B) e secreção basal de catecolaminas (Figura 17B). Porém, os animais expostos à RF-

EMR por 10 noites apresentaram diminuição no nível glicêmico (Figura 18B), enquanto que a secreção de catecolaminas não foi alterada (Figura 17B). Tais resultados indicam a complexidade da relação entre a secreção de catecolaminas e glicemia.

O teste de cruz elevada nos permitiu avaliar o perfil comportamental dos animais após exposição à radiação. Como representado na figura 19A, os animais expostos por 1 e 3 horas apresentaram diminuição não significativa da atividade nos braços abertos da cruz elevada, porém, as diferenças entre as médias dos grupos expostos com seus respectivos controles foram, em ambos os casos, de aproximadamente 20%, o que poderia ser relevante na indicação de resposta biológica, mesmo sem significância estatística. A atividade nos braços abertos da cruz elevada avalia a atividade inata de exploração de ambientes desconhecidos, paralelamente à preferência pela busca de áreas consideradas seguras (braços fechados) (WALF e FRYE, 2007). Quando em estado de ansiedade, os roedores tendem a explorar os braços fechados da cruz, evitando os braços abertos, que os sujeitariam à condição de insegurança (HOGG et al., 1996). Dessa maneira, tais dados nos permitem sugerir que os animais expostos à radiofrequência, por 1 e 3 horas, apresentaram uma tendência ao estado de ansiedade, o que estaria de acordo com o aumento do perfil de secreção basal de catecolaminas após tais períodos de exposição. Os resultados obtidos pelo teste de cruz elevada são similares aos encontrados por Narayanan et al., em 2013, porém, em seu estudo foram utilizados diferentes protocolos de exposição. Após a exposição por 3 e 10 noites, não foram observadas diferenças na exploração dos braços abertos, e, considerando o perfil de secreção basal de catecolaminas, o qual também não foi alterado, sugerimos que tais animais não apresentaram estado de ansiedade (Figura 19B), o que indica que se houve alguma indução de estresse pela exposição à radiação por 1 ou 3 horas, esse efeito desaparece com exposições mais longas, reafirmando um processo de adaptação ocorrente em mamíferos.

O teste de esQUIVA inibitória, utilizado para avaliar a consolidação de memória de longo prazo (24 horas), revelou que após 1 hora de exposição, os animais apresentaram tendência à melhora da memória, uma vez que uma grande parte dos animais levou mais tempo para explorar a grade estimuladora (Figura 20A). Não foi

encontrada alteração da consolidação da memória nos animais expostos à radiação eletromagnética por 3 horas e 3 noites, porém, foi observada diminuição no estabelecimento de memória nos ratos expostos por 10 noites, como representado na figura 20. Diversos estudos tem mostrado que o aumento dos níveis de secreção de catecolaminas pelas adrenais pode aumentar a consolidação de memória em humanos e roedores (CAHILL e ALKIRE, 2003; GOLD, 2005; KOROL e GOLD, 2007), o que poderia explicar uma possível melhora da memória dos animais expostos à radiação por 1 hora. Mesmo não atravessando a barreira hematoencefálica, as catecolaminas exercem controle de mecanismos periféricos capazes de modificar o funcionamento cerebral, incluindo a já mencionada glicogenólise no fígado e músculos, permitindo a melhora da memória (GOLD, 2005; KOROL e GOLD, 2007). Tal processo é possível devido a habilidade que as moléculas de glicose em chegar aos neurônios (STERNBERG et al., 1986, GOLD et al., 1986, TALLEY et al., 2000), e afetar o estabelecimento de memória em várias regiões do cérebro, tais como ventrículos laterais, septo medial, hipocampo e amígdalas (RAGOZZINO et al., 1996, 1998, SCHROEDER e PACKARD, 2003; KREBS e PARENT, 2005; PSYCH et al., 2006; CANAL et al., 2005). Alguns estudos tem também relatado, que a diminuição, aumento em excesso ou constante alto nível de secreção de glicose também podem prejudicar a formação de memória (KREBS e PARENT, 2005; PSYCH et al., 2006; CANAL et al., 2005); e assim, consideramos que o aumento do nível de glicose no grupo exposto por 1 hora e a diminuição nos animais expostos por 10 noites, estão relacionados a melhora e prejuízo no estabelecimento de memória de longo prazo, respectivamente.

Diante dos dados aqui apresentados, podemos sugerir que a radiação emitida por aparelhos celulares que operam nas mesmas condições dos aparelhos utilizados neste trabalho podem afetar o funcionamento de tecidos do sistema nervoso e endócrino; porém, estudos mais detalhados ainda são necessários para o melhor entendimento dos efeitos da RF-EMR sobre a o processo de sinalização intracelular em células do hipotálamo e hipófise, secreção de catecolaminas, controle da glicemia, indução de ansiedade e formação de memória de animais expostos e sobre os efeitos da modificação do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sobre as alterações da secreção de catecolaminas aqui apresentadas.

Também vale ressaltar que, em alguns casos, em que pessoas que exercem profissões as quais exigem a utilização constante de aparelhos celulares, ou pessoas, que apresentam situações especiais de saúde, como, por exemplo, mulheres grávidas, podem ser mais afetadas por esse tipo de radiação, o que deve ser considerado como indicativo de alerta.

6 CONCLUSÕES

Os resultados que obtivemos neste modelo experimental nos permite afirmar que:

- A radiação é capaz de atravessar tecidos como cérebro, osso e pele do crânio de ratos;
- Não houve aumento da temperatura dos tecidos, cérebro, osso e pele, após a exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência;
- A via de sinalização das MAPKs é alterada em células hipotalâmicas, mas não há modificação em tal via, em células hipofisárias, após a exposição;
- Os níveis de fosforilação de MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 são alterados em células hipotalâmicas de animais expostos por 1 hora;
- Após 3 horas, 3 noites e 10 noites, é observada alteração somente no nível de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2, em células hipotalâmicas;
- Nenhuma alteração no nível de fosforilação das enzimas MEK 1 / 2 e ERK 1 / 2 é observada em células hipofisárias;
- A radiação eletromagnética promove aumento da secreção basal de catecolaminas em animais expostos por 1 e 3 horas;

- A radiação promove aumento na secreção de catecolaminas, estimulada por cafeína, em animais expostos por 3 horas, 3 noites e 10 noites;
- Após a exposição dos animais por 1 hora, é observado aumento de glicemia, porém, após 10 noites, ocorre diminuição;
- A radiação não promove comportamento de ansiedade nos animais expostos de quaisquer grupos;
- A radiação não afeta a consolidação de memória de longo prazo nos animais expostos por 1 hora, 3 horas ou 3 noites, porém, é observada diminuição na memória dos animais do grupo exposto por 10 noites;
- A radiação emitida por telefones móveis pode modificar a fisiologia de ratos Wistar.

7 REFERÊNCIAS

- ABOUL EZZ, H.S.; KHADRAWY, Y.A.; AHMED, N.A.; RADWAN, N.M.; EL BAKRY, M.M. 2013. The effect of pulsed electromagnetic radiation from mobile phone on the levels of monoamine neurotransmitters in four different areas of rat brain. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, **17**:1782-1788.
- ADAMEOVA, A.; ABDELLATIF, Y.; DHALLA, N.S. 2009. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, **87(7)**:493-514.
- AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES (ANATEL). 2012. Espaço do Cidadão. Equipamentos 4G. Disponível em: <<http://www.anatel.gov.br/Portal/exibirPortalInternet.do>> Acesso em: 20 set 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES (ANATEL). 2014. Anatel dados. Disponível em: <<http://www.anatel.gov.br/Portal/exibirPortalInternet.do>> Acesso em: 19 jan 2014.
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição, Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
- ANDREAZZI, A.E.; GRASSIOLLI, S.; MARANGON, P.B.; MARTINS, A.G.; OLIVEIRA, J.C.; TORREZAN, R.; GRAVENA, C.; GARCIA, R.M.G.; MATHIAS, P.C.F. 2011. Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. **Experimental Diabetes Research**, **2011**:1-11.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L.L.; VALENÇA, M.M.; McCANN, S.N. 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiology Review**, **84**:169-173.
- ARMSTRONG, S.P.; CAUNT, C.J.; MCARDLE, C.A. 2009. Gonadotropin-releasing hormone and protein kinase C signaling to ERK: spatiotemporal regulation of ERK by docking domains and dual-specificity phosphatases. **Molecular Endocrinology**, **23(4)**:510-519.
- ARTALEJO, A.R. **Electrical properties of adrenal chromaffin cells. The electrophysiology of neuroendocrine cells**. USA: CRC Press, 1995.
- AUNIS, D.; LANGLEY, K. 1999. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. **Acta Physiologica Scandinavica**, **167(2)**:89-97.
- AXELROD, J.; REISINE, T.D. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, **224(4648)**:452-459.

AYALA, J.E.; SAMUEL, V.T.; MORTON, G.J.; OBICI, S.; CRONIGER, C.M.; SHULMAN, G.I.; WASSERMAN, D.H.; MCGUINNESS, O.P. 2010. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Disease Models Mechanisms**, **3(9-10)**:535-539.

BADINO, P.; ODORE, R.; RE, G. 2005. Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective. **The Veterinary Journal**, **170**:163-174.

BAR-GILL, A.B.; EFERGAN, A.; SEGER, R.; FUKUDA, M.; SAGI-EISENBERG, R. 2013. The extra-cellular signal regulated kinases ERK1 and ERK2 segregate displaying distinct spatiotemporal characteristics in activated mast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1833**:2070-2082.

BARROS, D.M.; IZQUIERDO, L.A.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. 1998. Interaction between midazolam-induced anterograde amnesia and memory enhancement by treatments given hours later in hippocampus, entorhinal cortex or posterior parietal cortex. **Behavioural Pharmacology**, **9(2)**:163-167.

BENAVIDES, M.; LAORDEN, M.L.; MARÍN, M.T.; MILANÉS, M.V. 2005. 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**, **95**:1249-1258.

BERNARDI, P.; CAVAGNARO, M.; PISA, S.; PIUZZI, E. 2001. 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**, **49**:2539-2546.

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

BLACK, D.R.; HEYNICK, L.N. 2003. Radiofrequency (RF) effects on blood cells, cardiac, endocrine, and immunological functions. **Bioelectromagnetics**, **6**:187-195.

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

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

BRIGGS, G.D.; BULLEY, J.; DICKSON, P.W. 2014. Catalytic domain surface residues mediating catecholamine inhibition in tyrosine hydroxylase. **The Journal of Biochemistry**, **155(3)**:183-193.

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.; MARSHALL, J.C. 2008. Regulation of Intracellular Signaling Cascades by GNRH Pulse Frequency in the Rat Pituitary: Roles for CaMK II, ERK, and JNK Activation. **Biology of Reproduction**, **79**:947-953.

BURGOYNE, R.D. 1991. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1071(2)**:174-202.

CAHILL, L.; ALKIRE, M.T. 2003. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. **Neurobiology of Learning and Memory**, **79**:194-198.

CAIRES, L.C.J. 2011. **Efeito da radiação emitida por telefones móveis sobre os processos de sinalização intracelular das células hipofisárias**. Dissertação Acadêmica (Mestrado em Ciências Biológicas) – Doenças Infecto-Parasitárias / Genética e Biotecnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

CAIRES, L.C.J.; GOULART, E.; MUSSO, C.M.; STABLER, C.T.; GARCIA, R.M.G.; MOURÃO-JÚNIOR, C.A.; ANDREAZZI, A.E. 2014. Behavior and memory evaluation of Wistar rats exposed to 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic radiation. **Neurological Research**, **36(9)**: 800-803.

CANAL, C.; STUTZ, S.J.; GOLD, P.E. 2005. Glucose injections into the hippocampus or striatum of rats prior to T- maze training: modulation of learning rates and strategy selection. **Learning & Memory**, **12**:367-374.

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

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

CARICATI-NETO, A.; PADÍN, J.F.; SILVA-JUNIOR, E.D.; FERNÁNDEZ-MORALES, J.C.; DE DIEGO, A.M.G.; JURKIEWICZ, A.; GARCÍA, A.G. 2013. Novel features on the regulation by mitochondria of calcium and secretion transients in chromaffin cells challenged with acetylcholine at 37°C. **Physiological Reports**, **1 (7)**:e00182.

CÉZAR E CÉZAR. **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.; McNAMEE, J.P. 2006a. Gene expression analysis of a human lymphoblastoma cell line exposed *in vitro* to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. **Radiation Research**, **165**:424-429.

CHAUHAN, V.; MARIAMPILLAI, A.; GAJDA, G.B.; THANSANDOTE, A.; McNAMEE, J.P. 2006b. Analysis of proto-oncogenese and heat-shock protein gene expression in human derived cell-lines exposed *in vitro* to an intermittent 1.9 GHz pulse- modulated radiofrequency field. **International Journal of Radiation Biology**, **82**:347-354.

CHRIST, A.; GOSSELIN, M.C.; CHRISTOPOULOU, M.; KÜHN, S.; KUSTER, N. 2010. Age-dependent tissue-specific exposure of cell phone users. **Physics in Medicine and Biology**, **55**:1767-1783.

CONSTANZO, L.S. **Fisiologia**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011.

COOK, S.A.; CLERK, A.; SUGDEN, P.H. 2009. Are transgenic mice the 'alkahest' to understanding myocardial hypertrophy and failure? **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, **46**:118-129.

CORTEZ, V.; SANTANA, M.; MARQUES, A.P.; MOTA, A.; ROSMANINHO-SALGADO, J.; CAVADAS, C. 2012. Regulation of catecholamine release in human adrenal chromaffin cells by b-adrenoceptors. **Neurochemistry International**, **60**:387-393.

DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicado á ciência da saúde**. 4ª edição. São Paulo: Editora Robe, 2000.

DOUGLAS, W.W.; RUBIN, R.P. 1961. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. **The Journal of Physiology**, **159**:40-57.

DUAN, W.R.; ITO, M.; PARK, Y.; MAIZELS, E.T.; HUNZICKER-DUNN, M.; JAMESON, J.L. 2002. GnRH regulates early growth response protein 1 transcription through multiple promoter elements. **Molecular Endocrinology**, **16**:221-233.

DUFOUR, S.; LEBON, V.; SHULMAN, G.I.; PETERSEN, K.F. 2009. Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis by epinephrine in humans. **American Journal of Physiology. Endocrinol Metabolism**, **297(1)**:E231-235.

DUNKLEY, P.R.; BOBROVSKAYA, L.; GRAHAM, M.E.; NAGY-FELSOBUKI, E.I.V.; DICKSON, P.W. 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry**, **91(5)**:1025-1043.

EBERHARD, D.A.; HOLZ, R.W. 1988. Intracellular Ca²⁺ activates phospholipase C. **Trends in Neurosciences**, **11(12)**:517-520.

EDWARDS, S.L.; ANDERSON, C.R.; SOUTHWELL, B.R.; McALLEN, R.M. 1996. Distinct preganglionic neurons innervate noradrenaline and adrenaline cells in the cat adrenal medulla. **Neuroscience**, **70(2)**:825-832.

EISENHOFER, G.; KOPIN, I.J.; GOLDSTEIN, D.S. 2004. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. **Pharmacological Reviews**, **56**:331-349.

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

ESKANDER, E.F.; ESTEFAN, S.F.; ABD-RABOU, A.A. 2012. How does long term exposure to base stations and mobile phones affect human hormone profiles? **Clinical Biochemistry**, **45**:157-161.

FENWICK, E.M.; MARTY, A.; NEHER, E. 1982. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. **The Journal of Physiology**, **331**:577-597.

FHANER, M.J.; GALLIGAN, J.J.; SWAIN, G.M. 2013. Increased catecholamine secretion from single adrenal chromaffin cells in DOCA-salt hypertension is associated with potassium channel dysfunction. **ACS Chemical Neuroscience**, **4(10)**:1404-1413.

FIELDS, A.P.; GUSTAFSON, W.C. 2003. Protein kinase C in disease: cancer. **Methods in Molecular Biology**, **233**:519-537.

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

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

GARCIA, R.M.G. **A regulação da secreção de catecolaminas em células cromafins**. Rio de Janeiro, Curso de Mestrado e Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, 1998. 110p. (Tese de Doutorado em Ciências - Biologia Celular).

GARCIA, A.G.; GARCIA-DE-DIEGO, A.M.; GANDIA, L.; BORGES, R.; GARCIA-SANCHO, J. 2006. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. **Physiological Reviews**, **86(4)**:1093-1131.

GARCÍA, A.G.; PADÍNA, F.; FERNÁNDEZ-MORALES, J.C.; MAROTOA, M.; GARCÍA-SANCHOD, J. 2012. Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. **Cell Calcium**, **51**:309-320.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

GOLD, P.E. 2005. Glucose and age-related changes in memory. **Neurobiology of Aging**, **26(Suppl1)**:60-64.

GOLD, P.E.; VOGT, J.; HALL, J.L. 1986. Glucose effects on memory: behavioral and pharmacological characteristics. **Behavioral and Neural Biology**, **46**:145-155.

- GOMIDE-JÚNIOR, M.R. 2008. **Radiações eletromagnéticas não ionizantes em unidades de conservação da natureza: diagnóstico, proposta para mapeamento, monitoramento, avaliação de riscos e licenciamento ambiental.** Dissertação Acadêmica (Mestrado em Ciências Biológicas) – Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.
- GOODMAN, R.; BLANK, M. 2002. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, **192**:16-22.
- GUO, X.; PRZYWARA, D.A.; WAKADE, T.D.; WAKADE, A.R. 1996. Exocytosis coupled to mobilization of intracellular calcium by muscarine and caffeine in rat chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **67(1)**:155-162.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11^a edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.
- HAISENLEDER, D.J.; YASIN, M.; MARSHALL, J.C. 1993. The regulation of prolactin, thyrotropin and gonadotropin subunit gene expression by pulsatile or continuous calcium signals. **Endocrinology**, **133**:2055-2061.
- HAQUE, Z.; AKBAR, N.; YASMIN, F.; HALEEM, M.A.; HALEEM, D.J. 2013. Inhibition of immobilization stress-induced anorexia, behavioral deficits, and plasma corticosterone secretion by injected leptin in rats. **Stress**, **16(3)**:353-362.
- HEALTH PROTECTION AGENCY. **Health Effects from Radiofrequency Electromagnetic Fields.** Report of the independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, 2012.
- HOGG S.A. 1996. Review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, **54(1)**:21-30.
- HOOKE, G.J.; ZHANG, P.; LAGROYE, I.; LI, L.; HIGASHIKUBO, R.; MOROS, E.G.; STRAUBE, W.L.; PICHARD, W.F.; BATY, J.D.; ROTI, J.L. 2004. Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after *in vitro* exposure to radiofrequency radiation. **Radiation Research**, **161**:193-200.
- INOUE, S.; MOTODA, H.; KOIKE, Y.; KAWAMURA, K.; HIRAGAMI, F.; KANO, Y. 2008. Microwave irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Neuroscience Letters**, **432**:35-39.
- INSTITUTE OF ELECTRICAL AND ELECTRONICS ENGINEERS (IEEE). 2005. Standard C95.1-2005, "IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 kHz to 300 GHz". **IEEE Std, C95.1**.

INTERNATIONAL COMMISSION ON NON IONIZING RADIATION PROTECTION (ICNIRP). 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). **Health Physics**, **74**:494.

INTERNATIONAL TELECOMMUNICATION UNION (ITU). 2013. ITU World Telecommunication / ICT Indicators Database. Disponível em: <<http://www.itu.int/ITU-D/ict/statistics>> Acesso em: 20 jan 2014.

ISKANDER, M.F.; YUN, Z.; QUINTERO-LLERA, R. 2000. 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**, **48**:1979-1987.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre :ArtMed, 2002.

JAKEN, S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. **Current Opinion in Cell Biology**, **8(2)**:168-173.

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

KELNER, K.L.; LEVINE, R.A.; MORITA, K.; POLLARD, H.B. 1985. A comparison of trihydroxyindole and HPLC/electrochemical methods for catecholamine measurement in adrenal chromaffin cells. **Neurochemistry International**, **7(2)**:373-378.

KESARI, K.K.; KUMAR, S.; BEHARI, J. 2010. Mobile phone usage and male infertility in Wistar rats. **Indian J Exp Biol** **48(10)**: 987-992.

KHOLODENKO, B.N. 2002. MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? **TRENDS in Cell Biology**, **12(4)**:173-177.

KINDT, M.; SOETER, M. 2013. Reconsolidation in a human fear conditioning study: a test of extinction as updating mechanism. **Biological Psychology**, **92(1)**:43-50.

KLAUSEN, C., TSUCHIYA, T., CHANG, J.P.; HABIBI, H.R. 2005a. PKC and ERK are differentially involved in gonadotropin-releasing hormone-induced growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, **289**:R1625-R1633.

KLAUSEN, C.; SEVERSON, D.L.; CHANG, J.P.; HABIBI, H.R. 2005b. Role of PKC in the regulation of gonadotropin subunit mRNA levels: interaction with two native forms of gonadotropin-releasing hormone. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, **289**:R1634-R1643.

KNOWLES, P.J.; DOUGLAS, S.A.; BUNN, S.J. 2011. Nicotinic Stimulation of Catecholamine Synthesis and Tyrosine Hydroxylase Phosphorylation in Cervine Adrenal Medullary Chromaffin Cells. **Journal of Neuroendocrinology**, **23**:224-231.

- KONARSKA, M.; STEWART, R.E.; MCCARTY, R. 1989. Sensitization of sympathetic-adrenal medullary responses to a novel stressor in chronically stressed laboratory rats. **Physiology & Behavior**, **46**:129-135.
- KONDO, Y.; TO, M.; SARUTA, J.; HAYASHI, T.; SUGIYAMA, H.; TSUKINOKI, K. 2013. Role of TrkB expression in rat adrenal gland during acute immobilization stress. **Journal of Neurochemistry**, **124(2)**:224-232.
- KOROL, D.L.; GOLD, P.E. 2007. Modulation of learning and memory by adrenal and ovarian hormones. In: Kesner RP Martinez JL, editors. *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier Science; New York 2007; 243-68.
- KREBS, D.L.; PARENT, M.B. 2005. Hippocampal infusions of pyruvate reverse the memory-impairing effects of septal muscimol injections. **European Journal of Pharmacology**, **520**:91-99.
- LAI H. 1997. Neurological effects of radiofrequency electromagnetic radiation relating to wireless communication technology. Paper presented at the IBC-UK conference: "Mobile Phones - Is there a Health Risk?" September 16-17. Brussels, Belgium.
- LANGLEY, K.; AUNIS, D. 1984. Ultrastructural immunocytochemical demonstration of D2-protein in adrenal medulla. **Cell and Tissue Research**, **238(3)**:497-502.
- LARA, B.; LÓPEZ, M.G.; VILLARROYA, M.; GANDÍA, L.; CLEEMAN, L.; MORAD, M.; GARCÍA, A.G. 1997. A caffeine-sensitive Ca^{2+} store modulates K^{+} -evoked secretion in chromaffin cells. **American Journal of Physiology** **272 (41)**:C1211-C1221.
- LEE, J.S.; HUANG, T.Q.; KIM, T.H.; KIM, J.Y.; KIM, H.J.; PACK, J.K.; SEO, J.S. 2006. Radiofrequency radiation does not induce stress response in human T-lymphocytes and rat primary astrocytes. **Bioelectromagnetics**, **27**:578-588.
- LEE, K.S.; CHOI, J.S.; HONG, S.Y.; SON, T.H.; YU, K. 2008. Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in *Drosophila*. **Bioelectromagnetics**, **29**:371-379.
- LEON, C.; GRANT, N.J.; AUNIS, D.; LANGLEY, K. 1992. Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland. **Developmental Brain Research**, **70(1)**:109-121.
- LESZCZYNSKI, D.; JOENVAARA, S.; REIVINEN, J.; KUOKKA, R. 2002. 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**, **70**:120-129.
- LEVIN, D.E. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, **189**:1145-1175.

- LIN, H.; OPLER, M.; HEAD, M.; BLANK, M.; GOODMAN, R. 1997. Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, **66**:482-488.
- LOHMEIER, T.E. 2003. Neurohypophysial hormones. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, **285**:715-720.
- LONGO, V.D.; FINCH, C.E. 2003. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? **Science**, **299**:1342-1349.
- LUKEWICH, M.K.; LOMAX, A.E. 2014. Endotoxemia enhances catecholamine secretion from male mouse adrenal chromaffin cells through an increase in Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. **Endocrinology**, **155(1)**:180-192.
- LV, W.M.; ZHAO, Y.; YANG, G.; DONG, S.Y.; ZHANG, G.H.; ZHANG, Y.; LI, G.Z.; CHENG, Y. 2014. Role of Ras, ERK, and Akt in glucocorticoid-induced differentiation of embryonic rat somatotropes in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **391**:67-75.
- MALHOTRA, K.R.; WAKADE, T.D.; WAKADE, A.R. 1989. Cross-communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol triphosphate, protein kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. **The Journal of Neuroscience**, **9(12)**:4150-4157.
- MOCHIZUKI-ODA N.; MORI K.; NEGISHI, M.; ITO, S. 1991. Prostaglandin E2 activates Ca²⁺ channels in bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **56(2)**:541-547.
- MORRIS, K.A.; CHANG, Q.; MOHLER, E.G.; GOLD, P.E. 2010. Age-related memory impairments due to reduced blood glucose responses to epinephrine. **Neurobiology of Aging**, **31(12)**:2136-2145.
- NARAYANAN, S.N.; KUMAR, R.S.; PAVAL, J.; KEDAGE, V.; BHAT, M.S.; NAYAK, S.; BHAT, P.G. 2013. Analysis of emotionality and locomotion in radio-frequency electromagnetic radiation exposed rats. **Neurological Sciences**, **34**:1117-24.
- NATIONAL RADIOLOGICAL PROTECTION BOARD. 2004. Mobile phones and health: report by the board of NRPB. Chilton, Didcot, Oxfordshire, National Radiological Protection Board (Documents of the NRPB, volume 15, no. 5) Disponível em: <<http://www.hpa.org.uk/radiation/publications/documents>> Acesso em: 15 out 2007.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), and National Academies Press (U.S.), Guide for the care and use of laboratory animals. 8ª edição. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.
- NEWTON, A.C. 1997. Regulation of protein kinase C. **Current Opinion in Cell Biology**, **9(2)**:161-167.

NISHIZUKA, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **The FASEB Journal: Official Publications of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, **9(7)**:484-496.

NOONEY, J.M.; PETERS, J.A.; LAMBERT, J.J. 1992. A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. **Journal of Physiology**, **455**:503-527.

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

NYLUND, R.; LESZCZYNSKI, D. 2006. 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**, **6**:4769-4780.

O`SULLIVAN, A.J.; CHEEK, T.R.; MORETON, R.B.; BERRIDGE, M.J.; BURGOYNE, R.D. 1989. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. **EMBO Journal**, **8(2)**:401-411.

PERRY, M.L.; IZQUIERDO, I. 1989. Effect of posttraining and pretest β -endorphin and ACTH administration in normal and protein malnourished rats. **Peptides**, **10**:1117-1120.

PINHEIRO, L.S.; MELO, A.D.; ANDREAZZI, A.E.; CAIRES, L.C.J.; COSTA, M.B.; GARCIA, R.M.G. 2011. Protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, **38**:117-127.

PYCH, J.C.; KIM, M.; GOLD, P.E. 2006. Effects of injections of glucose into the dorsal striatum on learning of place and response mazes. **Behavioural Brain Research**, **167**:373-378.

RAGOZZINO, M.E.; PAL, S.N.; UNICK, K.; STEFANI, M.R.; GOLD, P.E. 1998. Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intrahippocampal glucose injections. **The Journal of Neuroscience**, **18**:1595-1601.

RAGOZZINO, M.E.; UNICK, K.E.; GOLD, P.E. 1996. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **93**:4693-4698.

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

ROUSSEAU, E.; LADINE, J.; LIU, Q.Y.; MEISSNER, G. 1988. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **267(1)**:75-86.

RUBINFELD, H.; SEGER, R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. **Molecular Biotechnology**, **31**:151-174.

SALA, F.; NISTRÌ, A.; CRIADO, M. 2008. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. **Acta Physiologica**, **192(2)**:203-212.

SALAMA, N.; KISHIMOTO, T.; KANAYAMA, H.O. 2010. Effects of exposure to a mobile phone on testicular function and structure in adult rabbit. **Int J Androl** **33(1)**: 88-94.

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

SCHROEDER, J.P.; PACKARD, M.G. 2003. Systemic or intra-amygdala injections of glucose facilitate memory consolidation for extinction of drug-induced conditioned reward. **European Journal of Neuroscience**, **17**:1482-1488.

SEGER, R.; KREBS, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. **FASEB Journal**, **9**:726-735, 1995.

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

SILVA, J.E.; BIANCO, S.D.C. 2008. Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. **Thyroid**, **18(2)**:157-165.

SOETER, M.; KINDT, M. 2011a. Noradrenergic enhancement of associative fear memory in humans. **Neurobiology of Learning and Memory**, **96(2)**:263-271.

SOETER, M.; KINDT, M. 2011b. Disrupting reconsolidation: pharmacological and behavioral manipulations. **Learning & Memory**, **18(6)**:357-366.

SORIANO-CAROT, M.; QUILIS, I.; BAÑO, M.C.; IGUAL, J.C. 2014. Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. **Nucleic Acids Research**, **42**:7084-7095.

STAGG, R.B.; III, L.H.; PASTORIAN, K.; CAIN, C.; ADEY, W.R.; BYUS, C.V. 2001. 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. **Radiation Research**, **155**:584-592.

STAUDERMAN, K.A.; MCKINNEY, R.A.; MURAWSKY, M.M. 1991. The role of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in agonist- and inositol 1,4,5- trisphosphate-induced Ca^{2+} release from bovine adrenal chromaffin cells. **Biochemical Journal**, **278(13)**:643-650.

- STERNBERG, D.B.; KOROL, D.; NOVACK, G.D.; McGAUGH, J.L. 1986. Epinephrine-induced memory facilitation: attenuation by adrenoceptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, **129(1-2)**:189-193.
- TAKEBAYASHI, T.; VARSIER, N.; KIKUCHI, Y.; WAKE, K.; TAKI, M.; WATANABE, S.; AKIBA, S.; YAMAGUCHI, N. 2008. Mobile phone use, exposure to radiofrequency electromagnetic field, and brain tumour: a case-control study. **British Journal of Cancer**, **98**:652-659.
- TALLEY, C.E.P.; KAHN, S.; ALEXANDER, L.; GOLD, P.E. 2000. Epinephrine fails to enhance performance of food-deprived rats on a delayed spontaneous alternation task. **Neurobiology of Learning and Memory**, **73**:79-86.
- TERAOKA, H.; NAKAZATO, Y.; OHGA, A. 1991. Ryanodine inhibits caffeine-evoked Ca^{2+} mobilization and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, **57(6)**:1884-1890.
- UHLIROVA, M.; JASPER, H.; BOHMANN, D. 2005. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a *Drosophila* tumor model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **102**:13123-13128.
- VALBONESI, P.; FRANZELLITTI, S.; BERSANI, F.; CONTIN, A.; FABBRI, E. 2014. Effects of the exposure to intermittent 1.8 GHz radio frequency electromagnetic fields on HSP70 expression and MAPK signaling pathways in PC12 cells. **International Journal of Radiation Biology**, **90(5)**:382-391.
- WALF, A.A.; FRYE, C.A. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, **2(2)**:322-328.
- WANG, Q.; WANG, M.; WHIM, M.D. 2013. Neuropeptide Y gates a stress-induced, long-lasting plasticity in the sympathetic nervous system. **The Journal of Neuroscience**, **33(31)**:12705-12717.
- WEINBERGER, Z.; RICHTER, E.D. 2002. Cellular telephones and effects on the brain: the head as an antenna and tissue a radio receiver. **Medical Hypotheses**, **59**:703-705.
- WEISBROT, D.; LIN, H.; YE, L.; BLANK, M.; GOODMAN, R. 2003. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Cellular Biochemistry**, **89**:48-55.
- WIHOLM, C.; LOWDEN, A.; KUSTER, N.; HILLERT, L.; ARNETZ, B.B.; AKERSTEDT, T.; MOFFAT, S.D. 2009. Mobile phone exposure and spatial memory. **Bioelectromagnetics**, **30**:59-65.
- WILKINSON, S.E.; HALLAM T.J. 1994. Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? **Trends in Pharmacological Sciences**, **15(2)**:53-57.

WORTZEL, I.; SEGER, R. 2011. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. **Genes & Cancer**, **2(3)**:195-209.

WOUTERS, E., HUDSON, C.A., MCARDLE, C.A.; BERNAL, A.L. 2014. Central role for protein kinase C in oxytocin and epidermal growth factor stimulated cyclooxygenase 2 expression in human myometrial cells. **BMC Research Notes**, **7**:357.

WUA, Q.; MCLEISH, M.J. 2013. Kinetic and pH studies on human phenylethanolamine N-methyltransferase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **539**:1-8.

YAMAGUCHI, N. 1992. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose-mechanism involved in the liver, pâncreas and gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, **70(2)**:167-206.

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

YOUNG, D.A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; CRANSHAW, J.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J.O. 1985. Effect of catecholamines on glucose uptake and glycogenolysis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, **248(5Pt1)**:C406-409.

ZAICA, O.L.; POCHYNYUK, O.M.; KOSTYUK, P.G.; YAVORSKAYA, E.N.; LUKYANETZ, E.A. 2004. Acetylcholine-induced calcium signaling in adrenalin- and noradrenalin containing adrenal cromaffin cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **424**:23-32.

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