

EFEITO DA RADIAÇÃO EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DAS MAPK DE CÉLULAS DA HIPÓFISE DE RATOS

Luiz Carlos de Caires Júnior*
Ernesto Goulart**
Renan Villanova Homem de Carvalho***
Jair Trapé Goulart****
Philipe Ribeiro Furtado de Mendonça*****
Ana Eliza Andreazzi*****
José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça*****
Raúl Marcel González García*****

RESUMO

Nos últimos anos, o sistema de telecomunicação móvel tem crescido significativamente, de modo que um sexto da população mundial utiliza telefones móveis. Tais aparelhos e estações de base emitem rádio-frequência ou micro-ondas. Sabe-se que a exposição a esses tipos de radiação pode afetar diretamente a saúde, modificando, por exemplo, a cascata de sinalização das MAPK's (proteínas quinases ativadas por mitógeno). Essa cascata atua no controle de vários processos celulares, incluindo diferenciação, proliferação, apoptose, síntese e secreção de hormônios. Neste trabalho, foram avaliados, por western blotting, os níveis de expressão das enzimas ERK 1 e ERK 2 (quinase regulada por sinais extracelulares) da hipófise de ratos wistar machos de 60 dias, expostos à radiação emitida por aparelhos celulares (1800MHz), e constatamos um aumento significativo da expressão destas enzimas. Estes resultados demonstram que este tipo de radiação é capaz de alterar a cascata de sinalização das MAPK's, o que pode afetar o funcionamento das células hipofisárias de ratos Wistar.

Palavras-chave: Telefones móveis. Radiação. ERK1 - ERK2. Hipófise.

- * Graduado e Mestrando em Ciências Biológicas na UFJF e Bolsista de Iniciação Científica (BIC/UFJF)
- ** Graduando em Farmácia – UFJF
- *** Graduando em Farmácia – UFJF
- **** Graduando em Ciências Biológicas – UFJF
- ***** Graduado em Ciências Biológicas na UFJF e Mestrando em Neurologia e Neurociências na UNIFESP
- ***** Professora do Departamento de Fisiologia – UFJF
- ***** Professor do Departamento de Engenharia de Biosistemas – UFSJ
- ***** Professor Orientador do Departamento de Biologia – UFJF - raul.garcia@ufjf.edu.br

1 Introdução

Nos últimos anos, o sistema de telecomunicação móvel tem crescido significativamente, de modo que um sexto da população mundial utiliza telefones móveis. No final de 2004, em cerca de 200 países, foi estimado mais de um bilhão de usuários de aparelhos celulares (National Radiological Protection Board, 2004; MAIER, 2006). No Brasil, os dados mais recentes mostram que há aproximadamente 190 milhões de linhas de celulares ativas (ANATEL, 2010).

Telefones móveis passaram a ser usados extensivamente e a tecnologia tem mudado, de forma progressiva, de sistema analógico para digital. Tais aparelhos e estações de base emitem rádio-frequência ou micro-ondas. A exposição a essas radiações pode afetar diretamente a saúde (Organização Mundial da Saúde, 2006).

Pesquisas sobre o efeito da radiação de rádio-frequência são muito heterogêneas. Esses estudos incluem culturas de células e tecidos (*in vitro*) (FRIENDMAN et al., 2007) e animais de laboratório (*in vivo*), além de seres humanos (voluntários) (Organização Mundial da Saúde, 2006). Por um lado, essas pesquisas têm como foco mudanças funcionais no cérebro e efeitos na cognição e bem-estar (Organização Mundial da Saúde, 2006), isto é, a interferência da radiação sobre o sistema nervoso central (BRONZINO, 1995). Por outro lado, esses estudos analisam a relação entre o uso desses aparelhos móveis e a carcinogênese, a reprodução e o desenvolvimento, o sistema cardiovascular e a longevidade. Porém, resultados quanto às alterações em nível molecular associadas com o desenvolvimento de câncer são inconsistentes e contraditórios (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

Em 2002, foi demonstrado que campos eletromagnéticos podem afetar tecidos vivos, mesmo possuindo energia muito menor do que aquelas que causam mudanças na temperatura desses tecidos (LESZCZYNSKI et al., 2002). Uma das respostas celulares mais frequentes quanto à curta exposição a campos eletromagnéticos e frequência de baixa energia é a indução de transcrição de proteínas específicas (GOODMAN; BLANK, 2002), como as proteínas *heat-shock* (HSPs) (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 (CHAUHAN et al., 2006), e HSPs (FRENCH et al., 2001). O aumento da expressão dessas proteínas, causado por telefones móveis, pode induzir diversos processos celulares, incluindo replicação (NYLUND; LESZCZYNSKI, 2004), progressão do ciclo celular (CAPRI et al. 2004) e apoptose (CARANGLIA et al., 2005).

A via de sinalização de MAPKs é o principal mecanismo de regulação da atividade transcricional gerada por estímulo extracelular, atuando na proliferação, diferenciação, metabolismo e resposta ao estresse (YOON; SEGER, 2006). Dentre as proteínas que participam de vias de sinalização de MAPKs estão ERK1 e 2, JNK (c-Jun N-terminal kinase), SAPK1 (proteína quinase ativada por estresse - 1), MAPK (SAPK2) e BMK1 (grande MAPK1; também conhecida como ERK5) que são ativadas por sequências de fosforilação, ativando proteínas regulatórias, incluindo fatores de crescimento, além de induzir a expressão de genes (CHAUHAN et al., 2006). Segundo Joseph Friedman e colaboradores (2007), células em cultura do tipo Rat1 e HeLa apresentaram aumento da expressão de ERK1 e 2 quando expostas à radiação de aparelhos celulares.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência da exposição a ondas eletromagnéticas emitidas por esses aparelhos sobre o sistema nervoso central avaliando a expressão de ERK 1 e ERK 2 na hipófise de ratos Wistar.

2 Material e Métodos

Obtenção, exposição e sacrifício dos animais

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

Os animais foram expostos a ondas eletromagnéticas emitidas por aparelho celular da marca LG a uma frequência de 1800MHz, sem a interferência do som do toque ou sistema de vibração, em intervalos de 2 minutos por 25 segundos, durante três dias. Para cada grupo experimental houve um grupo controle que não foi exposto à radiação emitida pelo aparelho.

Os animais foram sacrificados utilizando tiopental de sódio na dose de 60mg/kg, por via intraperitonal (MASSERANO; WEINER, 1979) e, posteriormente, foi retirada a hipófise. As glândulas foram armazenadas em 400 μL de solução tampão fosfato 0.1, pH 7.4, na presença de 2 mM de ortovanadato de sódio e congeladas em nitrogênio líquido logo após a retirada.

Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo comitê de ética da UFJF (protocolo n° 037/2008).

Construção do mecanismo acionador do aparelho celular

O mecanismo usado para acionar o aparelho celular foi construído no laboratório de física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora (ICE/UFJF).

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

Análise da expressão de ERK1 e ERK2

As hipófises tiveram suas células lisadas, por congelamento/descongelamento, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, na presença de 2 mM de ortovanadato de sódio e inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, USA). Os homogenatos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e a dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

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

Após a dosagem, as proteínas foram desnaturadas em tampão SDS (dodecil sulfato de sódio) na presença de β -mercaptoetanol e aquecimento a 95°C por 5 minutos. Posteriormente foi feita a separação das proteínas em géis de poliacrilamida 10%, junto com marcadores de massa molecular pré-corados (Amersham, UK) seguida por eletrotransferência para membranas de nitrocelulose.

Após a transferência as membranas foram lavadas com tampão Tris (TBS), pH 7,6, e incubadas em TBS com 5% de leite em pó caseiro, durante noventa minutos para bloqueio. A seguir as membranas foram incubadas, em TBS com 0,5% de leite, com anticorpos contra ERK1 e 2 (Cell Signaling Technology) na proporção de 1:1000 durante, aproximadamente, 12 horas. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com TBS e incubadas, por 1 hora, com segundo anticorpo conjugado a peroxidase na proporção de 1:3000.

Logo depois, as membranas foram lavadas três vezes com TBS e incubadas em solução de revelação com luminol (Kit ECL plus, Amersham Biosciences). As proteínas imunorreativas foram digitalizadas e a avaliação/quantificação foi feita com o auxílio do programa, já patentado, ABEleto v 1.0, desenvolvido por estudantes do laboratório de física – ICE e do laboratório de biologia celular – ICB da UFJF.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média: \pm erro padrão da média, e as comparações feitas usando o teste t de Student, considerando significativos os valores de $p < 0,05$, usando o programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

3 Resultados

Análise da expressão de ERK 1

Como é mostrado na Figura 1, as células hipofisárias dos animais expostos apresentam aumento significativo da expressão de ERK 1 ($p = 0,0128$). O grupo controle apresentou média de $46,22 \pm 0,8843$, $n = 6$, enquanto o grupo tratado apresentou média de $49,70 \pm 0,6158$, $n = 5$, quando este foi exposto por 3 dias à radiação do aparelho celular.

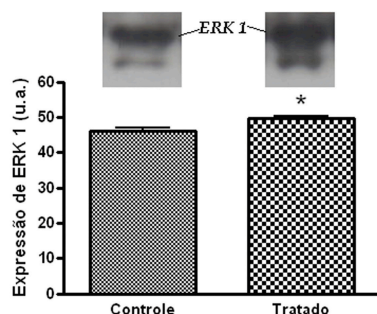


Figura 1: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias, em intervalos de 2 minutos por 25 segundos, sobre a expressão de ERK 1 em ratos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média ($*p < 0,05$, $n = 6-5$).

Análise da expressão de ERK 2

Após 3 dias de exposição, as células da hipófise dos animais expostos apresentaram aumento na expressão de ERK 2 ($p = 0,0463$). O grupo controle apresentou média de $22,10 \pm 2,132$, $n = 5$, enquanto o tratado apresentou média de $29,41 \pm 2,066$, $n = 4$ (Fig. 2).

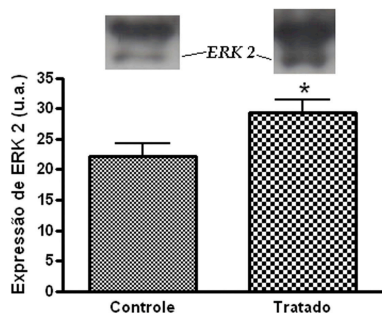


Figura 2: Efeito da exposição à radiação de aparelho celular por 3 dias, em intervalos de 2 minutos por 25 segundos, sobre a expressão de ERK 2 em ratos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média ($*p < 0,05$, $n = 5-4$).

4 Discussão e conclusão

Este estudo teve como objetivo contribuir para a compreensão do efeito da radiação eletromagnética emitida por aparelhos celulares, com a frequência padrão brasileira de 1800MHz, sobre o sistema nervoso central. Foi estudada a expressão de ERK1 e ERK2 (quinase regulada por sinais extracelulares) nas células hipofisárias de ratos Wistar. Neste tipo celular, a via de sinalização

da qual participam ERK 1 e 2 tem papel central na regulação da expressão gênica de diversos hormônios (KLAUSEN et al., 2005; DUAN et al., 2002).

No presente trabalho, o protocolo de exposição dos animais à radiação do aparelho celular provocou alterações na via de sinalização estudada.

A exposição dos animais à radiação emitida durante os 25 segundos de cada ligação efetuada em intervalos de 2 minutos, ao longo dos 3 dias de experimento, foi suficiente para aumentar a expressão de ERK 1 e ERK 2 em células da hipófise (Figura 1 e 2). Tal aumento diverge dos resultados de Joseph Friedman e colaboradores (2007), que constataram a inexistência de modificações na expressão dessas enzimas. Nós acreditamos que essa discordância de resultados ocorreu devido ao fato de que Friedman e colaboradores fizeram seus testes em cultura de células HeLa e Rat1 expostas à radiação com frequência de 875MHz por períodos que variaram de 5 a 30 minutos, o que é um período muito curto para que ocorra aumento na expressão de proteínas detectável pelo método de western blot.

Além disso, é importante considerar que os testes de Friedman e colaboradores foram realizados com um gerador de frequência acoplado a uma antena, como objeto emissor de radiação, enquanto nós usamos um aparelho celular padrão.

O aumento da expressão de ERK1 e 2 nas células da hipófise, resultado da exposição dos animais à radiação eletromagnética, pode gerar diversas alterações fisiológicas. ERK1 e ERK2 ativam diretamente fatores de transcrição gênica de hormônios hipofisários tais como GH, FSH e LH (KLAUSEN et al., 2005; DUAN et al. 2002). Isto nos permite supor que estes animais apresentam concentração plasmática de hormônios hipofisários maior, o que é reforçado pela demonstração de que o aumento da atividade de ERK1 e 2 aumenta a secreção de hormônios em culturas de gonadotropos (BLISS et al., 2010). Além disso, já está bem estabelecida a correlação que há entre a secreção e a síntese de hormônios. A secreção do hormônio promove o aumento da sua síntese como mecanismo de recomposição dos estoques intracelulares (TREVENZOLI et al., 2007). Assim, o aumento da expressão de ERK1 e 2 pode também ser pensado como consequência do aumento da secreção de hormônios da hipófise.

Os hormônios hipofisários regulam a secreção de outros hormônios (BLISS et al., 2010), assim a radiação emitida por telefones celulares pode ter efeitos mais amplos sobre o sistema endócrino, hipótese que deve ser testada.

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

Assim, concluímos que a radiação emitida por telefones móveis modifica os processos de sinalização intracelular nas células hipofisárias, o que deve afetar o processo de síntese e secreção dos seus hormônios e, por consequência, causar alterações nos órgãos e glândulas que são controlados pela hipófise.

São necessários estudos adicionais para determinar se o aumento da expressão de ERK1 e ERK2 é acompanhado pelo aumento da atividade dessas enzimas e o seu efeito sobre outras moléculas desta via de sinalização. Também são necessários estudos para avaliar o efeito das modificações observadas sobre o processo de síntese e secreção de hormônios.

THE EFFECT OF MOBILE PHONE RADIATION IN THE MAPK PATHWAY OF RAT HYPOPHYSIS

ABSTRACT

During the last years, the mobile phone system has increased significantly, in a way that every one of six people in the whole world is making use of mobile phones. These devices and its base stations emit radio-frequency and microwaves. Nowadays it is known that these kinds of radiations can directly affect people's health, modifying, for example, the MAPK's (mitogen-activated protein kinases) cascade. This pathway acts in the control of several cellular process including differentiation, proliferation, apoptosis, synthesis and secretion of hormones. At this work, the levels of ERK1 and ERK2 (extracellular-regulated kinases) enzymes of Wistar male rat's hypophysis, 60 days old, exposed to radiation emitted by mobile phones, were evaluated by western blotting, and we found a significantly increase in the expression of these enzymes. These results show that this type of radiation is capable of modifying the MAPK's signaling pathway, which can affect the normal operation of hypophysis cells of Wistar rats.

Keywords: Mobile telephones. Radiation. ERK1 - ERK2. Hypophysis.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES. Acessos móveis ultrapassam 189 milhões assinantes em agosto. Disponível em: <http://www.anatel.gov.br/Portal/exibirPortalNoticias.do?acao=carregaNoticia&codigo=21237>. Acesso em: 27 set 2010.

BLISS, S.T. et al. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31 p. 322–340, 2010.

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

BRONZINO, J.D. **The Biomedical Engineering Handbook**. 1. ed. New York: CRC Press & IEEE Press, 1995.

CAPRI, M. et al. In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. **Radiation Research**, v. 162, p. 211-218, 2004.

CARANGLIA, M. et al. Electromagnetic fields at mobile phone frequency induces apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. **Journal of cellular Physiology**, v. 204, p.539-548, 2005.

CHAUHAN, V. et al. Gene expression analysis of a human lymphoblastoma cell line exposed in vitro to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. **Radiation Research**, v. 165, p.424-429, 2006.

DUAN, W.R. et al. GnRH regulates early growth response protein 1 transcription through multiple promoter elements. **Molecular Endocrinology**, v.16, p.221–233, 2002.

FRENCH, P.W. et. al. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. **Differentiation**, v. 67, p.93-97, 2001.

FRIENDMAN, J. et al. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. **Biochemical Journal**, v. 405, p.559-568, 2007.

GOODMAN, R.; BLANK, M. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. **Journal of cellular Physiology**, v. 192, p.16-22, 2002.

KLAUSEN, C. et al. PKC and ERK are differentially involved in gonadotropin-releasing hormone-induced growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. **Journal Physiology Regulation Integr. Comp. Physiology**, v. 289, p.1625–1633, 2005.

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

MAIER, M. Brain and mobile phones. **British Journal of Medicine**, v. 332, p.864-865, 2006.

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

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

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

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

TREVENZOLI, I.H; VALLE, M.M.R.; MACHADO, F.B.; GARCIA, R.M.G.; PASSOS, M.C.F.; LISBOA, P.C.; Moura, E.G. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. **Journal of Physiology**, v. 580, p. 629-637, 2007.

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