

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camila Manso Musso

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM RATOS
WISTAR APÓS EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE
RADIOFREQUÊNCIA EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS**

Juiz de Fora
2014

2014

PGCBIO

Camila Manso Musso

ICB/UFJF

CAMILA MANSO MUSSO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM RATOS
WISTAR APÓS EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE
RADIOFREQUÊNCIA EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia

Juiz de Fora
2014

CAMILA MANSO MUSSO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM RATOS
WISTAR APÓS EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE
RADIOFREQUÊNCIA EMITIDA POR TELEFONES MÓVEIS**

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

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
Embrapa – Gado de Leite

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho, pelas bênçãos, e a Nossa Senhora pela intercessão. Agradeço a mamãe, Maurília, pelo colo, cuidado e exemplo de fé e ao papai, Eder, pelo carinho e incentivo. A eles, muito obrigada pelo amor, doçura e dedicação. Agradeço a vovó Landa por todas as delícias, aconchego e orações e aos meus irmãos, Mariane e Murilo, pelos abraços apertados e risadas contagiantes nos almoços de domingo. Agradeço aos amigos do laboratório pela companhia nas madrugadas de trabalho intercaladas de muita diversão. Aos meus amigos, agradeço pelas brincadeiras, os momentos de alegria e por poder compartilhar essa vitória. Agradeço ao meu orientador, Dr. Raúl Garcia, pelo apoio. E ao meu noivo Luiz, agradeço por toda paciência como meu segundo orientador, por deixar meus dias mais coloridos e completos, pelos sorrisos, sonhos e amor.

RESUMO

É crescente o número de usuários de telefonia móvel. Em 2013, o número total de telefones móveis habilitados no mundo atingiu 6,8 bilhões. Uma queda nas taxas de fertilidade tem sido notada em todo o mundo; embora existam muitas razões para o declínio dessas taxas, um dos principais motivos é a infertilidade masculina. Existe uma preocupação crescente no meio científico com os efeitos da exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência (RF-EMR) emitida por telefones celulares em relação à fertilidade em homens. Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade dos espermatozoides de ratos Wistar, após exposição do animal à RF-EMR. Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com 90 dias de idade e 280 ± 20 g de massa corporal, foram expostos à radiofrequência emitida por telefones celulares (1,8 GHz) por períodos de 3 e 10 noites. As amostras de secreção epididimária foram extraídas da cauda do epidídimo dos animais. Foi realizado o ensaio TUNEL para a marcação dos espermatozoides com DNA fragmentado e estes foram quantificados por citometria de fluxo e a concentração de espermatozoides, morfologia e mortalidade foram também avaliadas. As amostras dos animais de ambos os grupos expostos, 3 e 10 noites, apresentaram um aumento da mortalidade e uma diminuição da concentração de espermatozoides, além de um aumento da incidência de fragmentação do DNA, o que é um indicativo de apoptose. Não houve diferença significativa entre os grupos na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e anormais. Diante dos resultados do presente estudo, especulamos que a RF-EMR emitida por telefones móveis afeta negativamente a qualidade do sêmen e pode prejudicar a fertilidade masculina.

Palavras-chave: Telefone celular. Radiação eletromagnética. Espermatozoides. Ratos Wistar.

ABSTRACT

The mobile communication system has grown over the years. The total number of mobile phone subscriptions reached 6.8 billion in 2013. Decreasing fecundity and fertility in men have led to growing concern about the hazardous effects of exposure to radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMR) on reproductive organs. This study aimed to analyze the sperm quality of rats after whole-body RF-EMR exposure. Male Wistar rats, 90 days old, were exposed to radiofrequency emitted by mobile phones (1.8 GHz) for periods of 3 and 10 nights. Apoptosis was tested using TUNEL assay, sperm morphology and mortality were assessed by Shorr and Eosin stain methods respectively, and the cell count was performed. Both exposed groups showed significantly increased mortality and reduced sperm concentration along with significant increase in the apoptosis incidence compared to the respective control groups. Given the results, we speculate that RF-EMR exposure negatively affects semen quality and may impair male fertility.

Keywords: Mobile phone. RF-EMR. Spermatozoa. Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Relação entre população mundial e número de aparelhos celulares habilitados entre os anos de 2005 e 2013	16
Figura 2	Espectro eletromagnético	18
Figura 3	Representação das bandas de frequências usadas para diferentes aplicações. As bandas utilizadas estão representadas de acordo com a frequência: FB - frequência baixa; FM - frequência média; FA - frequência alta; FMA - frequência muito alta; FUA - frequência ultra alta; FSA - frequência super alta; FEA: frequência extremamente alta	20
Figura 4	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	21
Figura 5	Taxa de fecundidade em diferentes países nos anos de 1970 e 2002	25
Figura 6	Principais efeitos da exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência sobre o potencial de fecundidade masculino	27
Figura 7	A , gaiola usada para acomodar os animais durante os experimentos; B , tampa com tubo PVC acoplado, dentro do qual o aparelho celular permanece alojado durante o período de exposição	31
Figura 8	Representação esquemática da gaiola utilizada para acomodar os animais durante os experimentos	32
Figura 9	Representação esquemática dos quatro pontos, A , B , C e D , onde foram feitas as medições da intensidade do campo elétrico gerado pela radiação emitida pelo telefone celular no interior das gaiolas	33
Figura 10	A , dispositivo eletrônico micro-controlado; B , conexão com os telefones celulares; C , conexão com o no-break	35
Figura 11	Representação dos nove quadrantes de uma das câmaras de contagem da câmara de Neubauer, delineados em amarelo;	39

	os quadrantes laterais utilizados para contagem dos espermatozoides estão representados pelos números de 1 a 4	
Figura 12	A , representa o quadrante delimitado; B , representa o “L” formado pelas linhas limites sobre as quais os espermatozoides, circulos em branco, são contados e em C , estão representados os espermatozoides que não são contados nesse quadrante, circulos em preto	41
Figura 13	Diagrama das temperaturas, ambiente e dentro das gaiolas dos grupos controle e exposto. Em t = 5 minutos o telefone celular foi acionado para realizar uma ligação, a qual teve duração de 55 minutos; os valores de temperatura foram registrados a cada 5 minutos	43
Figura 14	A e B , Número de espermatozoides nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites e grupos controles correspondentes. C e D , percentual de espermatozoides mortos nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites e grupos controles correspondentes. * Diferença estatisticamente significativa (p < 0.05)	45
Figura 15	A , percentual de espermatozoides mortos nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites. B , número de espermatozoides nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites. * Diferença estatisticamente significativa (p < 0.05)	46
Figura 16	Espermatozóide de rato Wistar com morfologia normal	47
Figura 17	Espermatozóide de rato Wistar com anormalidade na cauda; * cauda quebrada	48
Figura 18	Espermatozoides de ratos Wistar com anormalidades na cabeça. A , espermatozoide com cabeça quebrada; B, C e D , espermatozoides com duas cabeças; E , espermatozóide com cabeça sem curvatura	48
Figura 19	Espermatozoides considerados defeitos da técnica. A , cauda sem cabeça; B , cabeça decapitada	49

Figura 20 Percentual de espermatozoides com DNA fragmentado nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência, por 3 e 10 noites, e grupos controles correspondentes. O quadrante superior esquerdo representa as células marcadas somente com Iodeto de Propídio; o quadrante superior direito representa as células marcadas com Alexa Fluor 488 e Iodeto de Propídio, representando as células com fragmentações no DNA; a porcentagem indicada neste quadrante representa o percentual de espermatozoides com DNA fragmentado. Os quadrantes inferiores, que representam as células não marcadas ou fragmentos de células, não foram considerados. **A**, Grupo controle (C) correspondente ao grupo exposto por 3 noites (n=4); **B**, Grupo exposto (E) à RF-EMR por 3 noites (n=5); **C**, Grupo controle positivo (CP), amostras tratadas com DNase I (n=3); **D**, Grupo controle (C) correspondente ao grupo exposto por 10 noites (n=4); **E**, Grupo exposto (E) à RF-EMR por 10 noites (n=5); **F**, Grupo controle positivo (CP), amostras tratadas com DNase I (n=3). **G** e **H**, Comparação estatística entre os grupos por ANOVA e teste de Dunnett. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aceitabilidade das contagens das duplicatas	40
Tabela 2	Massa dos animais antes (inicial) e após (final) exposição à radiação emitida por telefone celular; e massa relativa dos órgãos (testículos, epidídimos e vesícula seminal) após exposição	44
Tabela 3	Percentual de espermatozoides morfologicamente normais e anormais nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência, por 3 e 10 noites, e grupos controles correspondentes. Valores expressos como média \pm EPM	47

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
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
ANATEL	Agência Nacional de Telecomunicações
CDMA	Acesso Múltiplo por Divisão de Código
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EMF	Campo Eletromagnético
EMR	Radiação Eletromagnética
EPM	Erro Padrão da Média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
et al	Colaboradores
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio do Crescimento
GHz	Giga Hertz
GSM	Sistema Global de Telecomunicações
HSP	Proteína heat-shock
Hz	Hertz
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICE	Instituto de Ciências Exatas
ICNIRP	International Commission on Non Ionizing Radiation Protection
IEEE	Institute of Electrical and Electronics Engineers
IPs	Identificação de Dispositivos
ITU	International Telecommunication Union
LH	Hormônio Luteinizante
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MHz	Mega Hertz
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA's	Assistentes Pessoais Digitais

PVC	Cloreto de Polivinila
RF	Radiofrequência
RF-EMR	Radiação Eletromagnética de Radiofrequência
SAR	Taxa de Absorção Específica
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TDMA	Acesso Múltiplo por Divisão de Tempo
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
WHS	World Health Organization
Wi-Fi	Wireless Fidelity

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	Mais ou Menos
B_y	Campo Magnético
E	Intensidade do Campo Elétrico
E_x	Campo Elétrico
f	Frequência
H	Intensidade do Campo Magnético
S	Densidade de potência ou Intensidade
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O Sistema de Telecomunicação Móvel	16
1.2 Radiação Eletromagnética de Radiofrequência	20
1.3 Exposição à Radiação e Saúde	22
1.4 Exposição à Radiação e Infertilidade Masculina	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Declaração de Ética	30
3.2 Animais	30
3.3 Preparação das Gaiolas para Manutenção dos Animais	30
3.4 Mecanismo Acionador do Telefone Celular	34
3.5 Exposição à Radiação	35
3.6 Taxa de Absorção Específica (SAR)	35
3.7 Avaliação da Temperatura	36
3.8 Pesagem dos Animais e Órgãos	37
3.9 Avaliação das Características dos Espermatozoides	37
3.9.1 Obtenção das Amostras	37
3.9.2 Mortalidade	38
3.9.3 Morfologia	38
3.9.4 Concentração	39
3.9.5 Ensaio TUNEL	41
3.10 Análises Estatísticas	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Avaliação da Temperatura	43
4.2 Massa dos Animais e Órgãos	44
4.3 Características dos Espermatozoides	44
4.4 Ensaio TUNEL	50
5 DISCUSSÃO	51

6 CONCLUSÃO	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA DE TELECOMUNICAÇÃO MÓVEL

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.

O sistema de telecomunicação móvel vem crescendo significativamente, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, e o telefone celular se tornou 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 penetração 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.

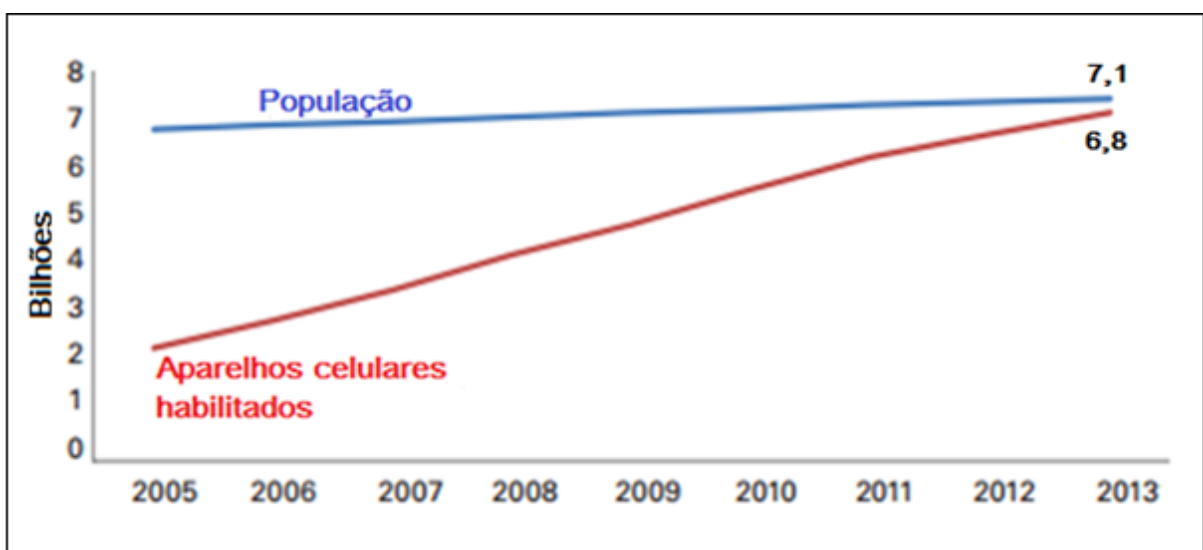


Figura 1. Relação entre população mundial e número de aparelhos celulares habilitados entre os anos de 2005 e 2013.

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. Esse aumento significa que os seres humanos estão, cada vez mais, expostos a maiores níveis de radiação.

Os sinais transmitidos e recebidos pelos aparelhos celulares estão na forma de microondas, um tipo de radiação eletromagnética. 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.

A radiação eletromagnética emitida pelos telefones móveis quando interage com a matéria, que pode ser um tecido vivo, não possui energia suficiente para arrancar elétrons de átomos que a constituem, sendo caracterizada como radiação não ionizante, com frequências que variam de 300 MHz a 300 GHz (GOMIDE-JÚNIOR, 2008). Do espectro eletromagnético (Figura 2), apenas os raios X e gama são considerados ionizantes.

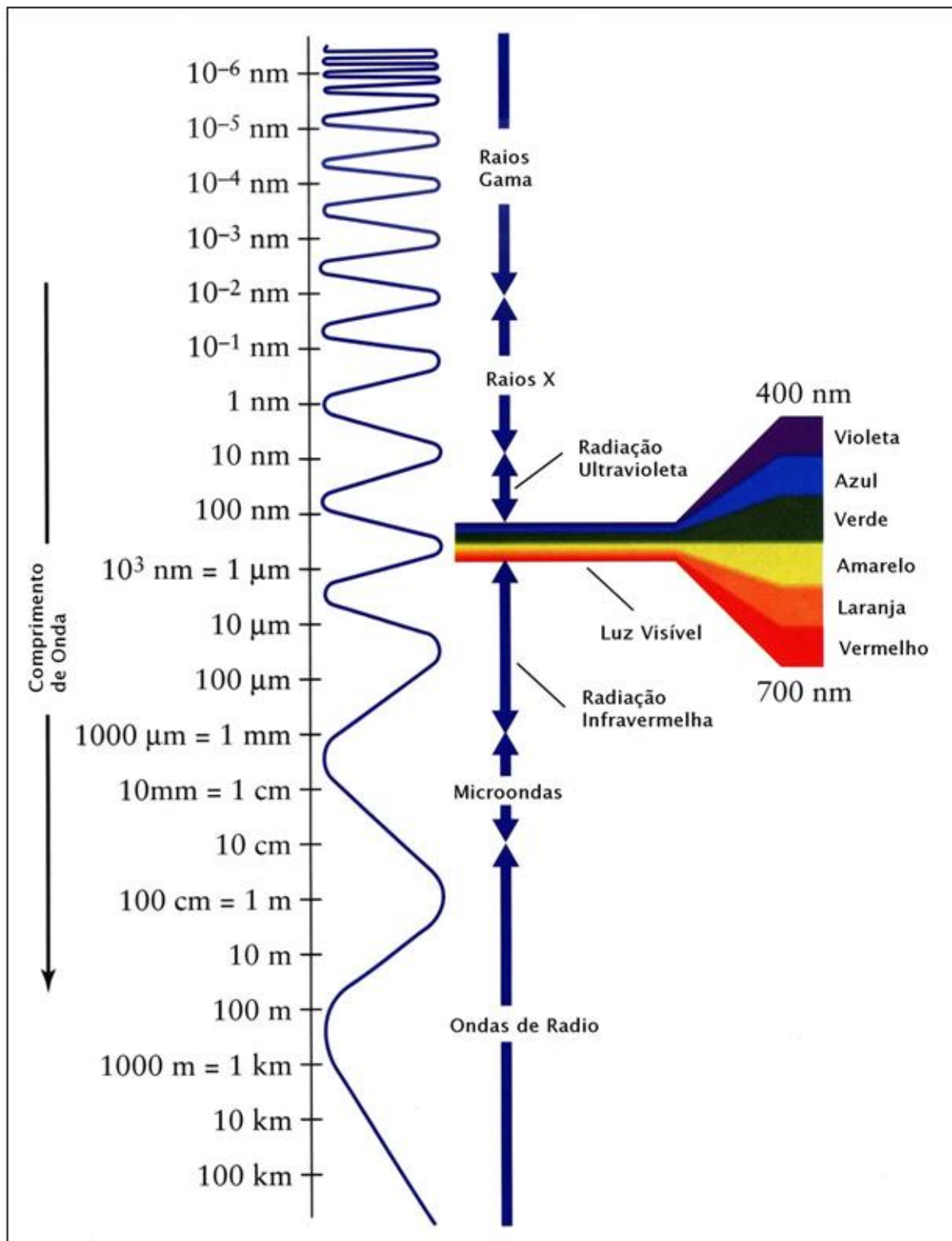


Figura 2. Espectro Eletromagnético.
 Fonte: <http://www.brasilecola.com>

Existem certos 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).

O crescimento exponencial na utilização de telefones móveis veio acompanhado do desenvolvimento de novas tecnologias. Atualmente existem quatro gerações de telefones móveis. A primeira geração (1G) foi desenvolvida na década de 1970, operando com a tecnologia analógica a uma frequência que variava de 450 a 800 MHz. Em 1990, surgiu a segunda geração da telefonia móvel (2G), que operava utilizando os padrões de transmissão digital, TDMA (Acesso Múltiplo por Divisão de Tempo), CDMA (Acesso Múltiplo por divisão de Código) e GSM (Sistema Global de Telecomunicações).

O padrão TDMA funciona de forma que vários usuários fazem uso de um mesmo canal ao mesmo tempo, com a transmissão descontínua dos dados. O padrão CDMA funciona de forma que o aparelho celular do usuário utiliza um canal codificado que é reconhecido pelo aparelho do receptor sem cruzamento de linhas e assim como o padrão TDMA atua a frequências entre 800 e 900 MHz. Já o padrão GSM é a versão mais moderna do TDMA e funciona através de um cartão Sim (*Sim-Card*), operando a uma frequência que pode variar de 900 a 1900 MHz (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2012).

A terceira geração (3G) foi implantada em 2005, acompanhada de grandes avanços tecnológicos; a tecnologia 3G garante alta velocidade e qualidade na transmissão de dados, imagens, músicas, mensagens e voz e opera utilizando frequências acima de 2.1 GHz. A tecnologia 4G (quarta geração) foi desenvolvida recentemente e vai além da telefonia móvel, sendo baseada na identificação dos dispositivos (IPs). O aumento da frequência de operação está relacionado a maior eficiência na transmissão de dados (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2012).

1.2 RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE RADIOFREQUÊNCIA

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. Assim, a radiação emitida pelos aparelhos celulares é denominada Radiação Eletromagnética de Radiofrequência. A figura 3 representa as bandas de frequências distintas usadas para várias aplicações, incluindo telecomunicação, medicina e indústria.

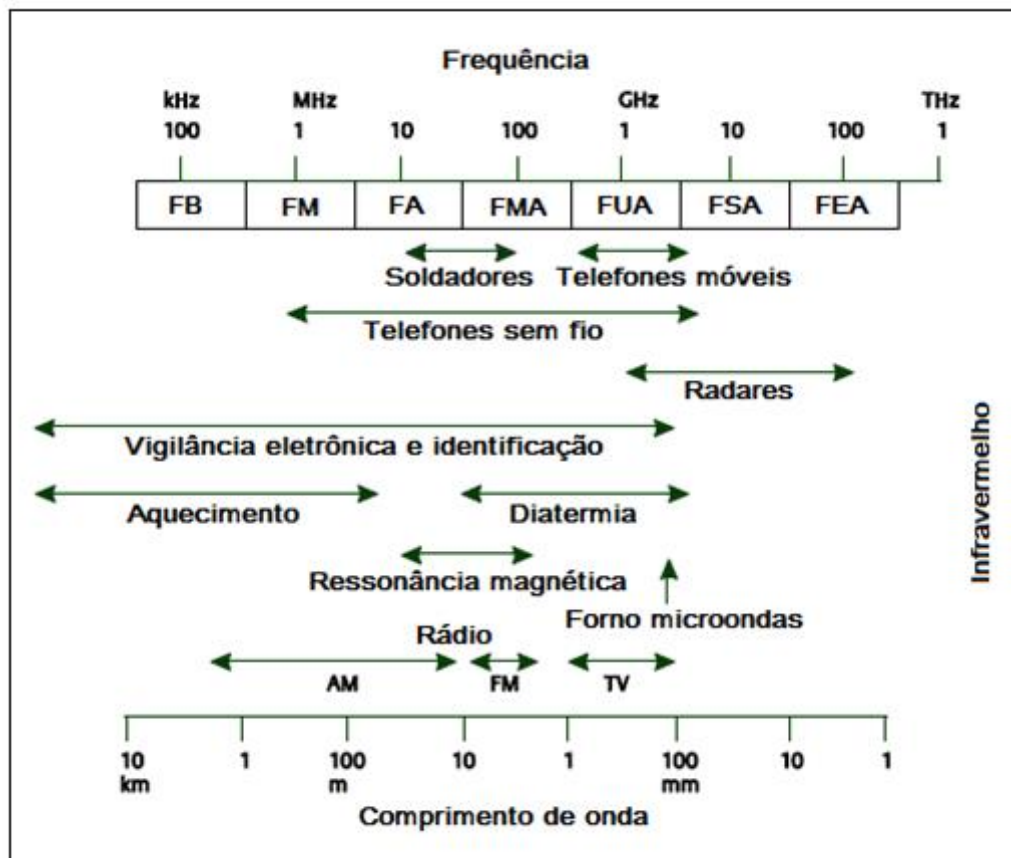


Figura 3. Representação das bandas de frequências usadas para diferentes aplicações. As bandas utilizadas estão representadas de acordo com a frequência: FB - frequência baixa; FM - frequência média; FA - frequência alta; FMA - frequência muito alta; FUA - frequência ultra alta; FSA - frequência super alta; FEA: frequência extremamente alta.

Fonte: Health Protection Agency / Health Effects from Radiofrequency Electromagnetic Fields, 2012.

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, como representado na figura 4.

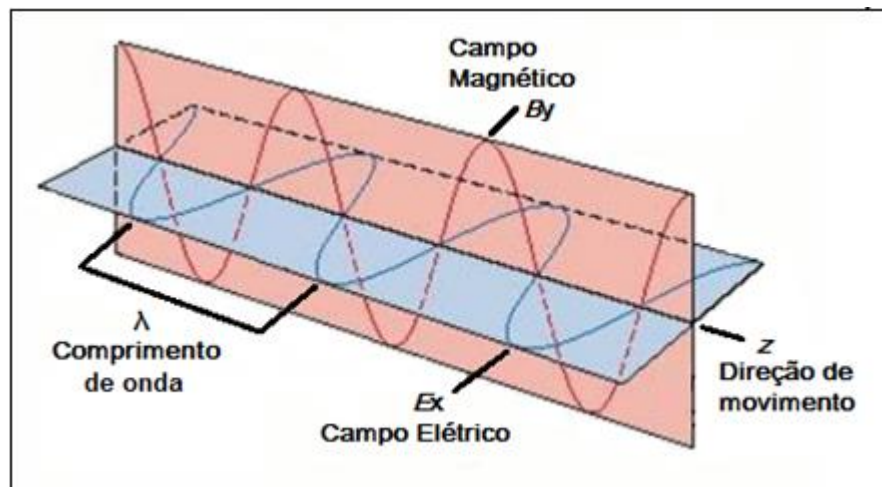


Figura 4. Representação esquemática de uma onda eletromagnética se propagando na direção z. E_x representa o campo elétrico e B_y , o campo magnético; λ representa o comprimento de onda.
Fonte: <http://www.astro.iag.usp.br>

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 a 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 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO E SAÚDE

As potenciais consequências fisiológicas e comportamentais da exposição a campos eletromagnéticos têm recebido atenção e é crescente a preocupação com os possíveis riscos à saúde gerados pelo uso de aparelhos móveis. A Organização Mundial da Saúde alerta que a exposição a essa radiação afeta diretamente a saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos para avaliar potenciais riscos relacionados à exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência. Esses estudos incluem culturas de células (DE IULLIS et al., 2009; MORETTI et al., 2013), animais de laboratório (SALAMA et al., 2010; KIM et al., 2013; BEHARI, 2010), além de pesquisas com seres humanos (FALZONE et al., 2011; NAKATANI-ENOMOTO et al., 2013); porém os resultados ainda são inconclusivos.

Pesquisadores têm focado nas consequências da exposição à radiação emitida por telefones móveis especialmente no funcionamento do cérebro, o qual é o tecido mais afetado durante uma ligação devido à proximidade. Hardell et al. (2007; 2009), baseado em estudos epidemiológicos, associaram o uso de telefones celulares por mais de 10 anos a um aumento no risco de gliomas e neuromas.

Alguns estudos têm reportado após exposição à radiação eletromagnética (2.45 and 16.5 GHz), danos ao DNA das células cerebrais (PAULRAJ et al., 2006a); outros têm demonstrado alterações nas enzimas antioxidantes no cérebro (MAUSSET- BONNEFONT et al., 2004; KESARI et al., 2012); alterações nos níveis de cálcio (PAULRAJ et al., 1999); além de um aumento do número de células gliais (PAULRAJ et al., 2006b).

Os efeitos da RF-EMR sobre o hipotálamo, hipófise, tireoide e glândula pineal também têm sido investigados, bem como alterações no funcionamento do sistema endócrino (BLACK et al., 2003). Eşmekaya et al. (2010) demonstraram a ocorrência

de hipertrofia da glândula tireoide de ratos expostos à radiofrequência (900 MHz). Além disso, Koyu et al. (2005) relataram uma diminuição dos níveis do hormônio estimulante da tireoide (TSH), triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) no soro de ratos expostos à radiação eletromagnética. Mann et al. (1998) demonstraram que humanos expostos (900 MHz) têm perfil normal de secreção noturna de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e melatonina, no entanto, apresentam secreção de cortisol aumentada. Em um estudo realizado por De Seze et al. (1999), o padrão de secreção de melatonina nos seres humanos também mostrou-se normal após a exposição a mesma frequência da radiação. Em 2008, Djeridane et al. demonstrou nenhuma alteração na secreção de TSH, adrenocorticotropina (ACTH) e testosterona, hormônio do crescimento (GH) e cortisol em humanos.

Alguns efeitos da exposição à radiação emitida por telefones móveis têm sido associados a estresse oxidativo, o qual está relacionado ao aumento na taxa de danos celulares que resultam em genotoxicidade (KESARI et al., 2013). O estresse oxidativo é uma condição induzida pelos radicais livres derivados do oxigênio comumente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). Normalmente, um nível adequado de antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e redutase controlam os níveis de radicais livres em uma célula; porém uma diminuição em SOD, GPx e um aumento na atividade de CAT têm sido demonstrados após exposição a RF-EMR (KESARI et al., 2011a).

Vários pesquisadores apontam a radiação eletromagnética de radiofrequência como responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio, e devido a elas, diversas mudanças podem ocorrer, tais como injúria das células endoteliais (KOPPENOL et al., 1992; ROSSELL et al., 1992), o que pode por sua vez resultar em alteração na barreira sangue-cérebro, danos ao DNA, alteração na integridade celular e aumento da susceptibilidade da célula a tóxicos (KESARI et al. 2013).

Existem estudos também relatando evidências de que campos eletromagnéticos de alta frequência podem afetar funções do sistema nervoso

(ARENDAASH et al., 2012), Alguns desses estudos usam camundongos transgênicos de Alzheimer (ARENDAASH et al., 2010; DRAGICEVIC et al., 2011). Um estudo realizado por Aldad et al. (2012), demonstra que a exposição pré-natal a radiação pode causar perturbações que afetam o comportamento dos adultos, relacionadas a transmissão sináptica glutamatérgica em células piramidais no córtex pré-frontal.

Um estudo realizado no laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), por CAIRES et al. (2014), demonstrou que a exposição de ratos Wistar à RF-EMR (1800 MHz) emitida por telefones celulares, durante 3 dias, não altera a memória de trabalho mas pode induzir comportamentos relacionados ao estresse.

Uma das respostas celulares à exposição a campos eletromagnéticos, bem descrita na literatura, é a indução de transcrição de proteínas específicas (GOODMAN et al., 2002), como as proteínas *heat-shock* (HSPs) (LESZCZYNSKI et al., 2002; CARAGLIA et al., 2005). Similarmente, ondas irradiadas por aparelhos celulares também podem afetar a expressão de proteínas, tais como as proteínas c-Jun e c-Fos (CHAUHAN et al., 2006), e ERK 1 e ERK 2 (FRIENDMAN et al., 2007).

A via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) é o principal mecanismo de regulação da atividade transcricional gerada por estímulo extracelular, atuando na proliferação, diferenciação, metabolismo, resposta ao estresse e no processo de secreção de hormônios (SEGER et al., 1995; RUBINFELD et al., 2005; YOON et al., 2006; WORTZEL et al., 2011). Um trabalho de mestrado desenvolvido no laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFJF demonstrou que a radiação emitida por aparelhos celulares afeta a expressão e fosforilação das proteínas da família das MAPKs, proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 e ERK2), em células hipofisárias (CAIRES, 2011).

1.4 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO E INFERTILIDADE MASCULINA

A diminuição das taxas de fecundidade e fertilidade em todo o mundo (SKAKKEBAEK et al., 2006) tem levado a uma crescente preocupação (Figura 5). Embora suponhamos que essa tendência a taxas de fertilidade mais baixas está relacionada a mudanças sociais e econômicas, como a melhor contracepção e a carreira de trabalho e educação das mulheres modernas; devemos considerar a possibilidade de que fatores biológicos contribuem com tal declínio. Um dos principais fatores envolvidos é a infertilidade masculina, que afeta aproximadamente 1 em cada 20 homens da população (McLACHLAN e DE KRETSER, 2001).

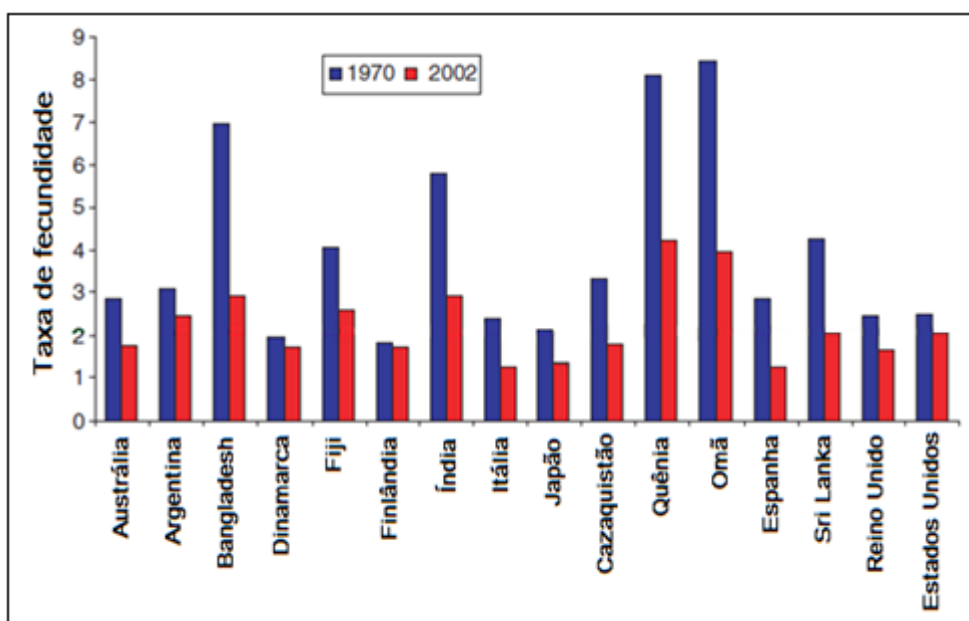


Figura 5. Taxa de fecundidade em diferentes países nos anos de 1970 e 2002.

Na maioria dos casos, a condição de infertilidade está relacionada a defeitos funcionais nos espermatozoides. Um dos fatores ambientais potencialmente envolvidos na etiologia dos danos aos espermatozoides é a crescente exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência emitida por telefones móveis (DE

IULLIS et al., 2009). Um estudo epidemiológico realizado em 2005 por Fejes et al. sugeriu uma correlação negativa entre o uso de aparelhos celulares e qualidade do sêmen, particularmente motilidade. Essa associação tem levado a preocupação com os efeitos danosos da exposição à radiação emitida por aparelhos celulares aos órgãos reprodutores e à qualidade dos espermatozoides.

Diversos estudos sugerem uma possível ligação entre o uso de telefone celular e potencial de fertilização reduzido (EROGUL et al., 2006; DEEPINDER et al., 2007; AGARWAL et al., 2008). Kesari et al. (2010) demonstraram uma diminuição significativa na contagem de espermatozoides e na atividade da proteína quinase C (PKC), uma enzima chave no mecanismo de transdução de sinal para a ativação de diversas funções celulares e controle da proliferação celular, em espermatozoides de ratos expostos a RF-EMR por 2 horas / dia durante 35 dias. Yan et al. (2007) reportaram um significativo aumento na incidência de células mortas e a presença de agrupamento anormal dos espermatozoides devido a 3 horas diárias de exposição à radiação emitida por aparelho celular por 18 semanas. Em contraste, nenhum efeito adverso das microondas emitidas por telefones celulares foi observado nos experimentos realizados por Dasdag et al. (2003) no qual ratos Sprague-Dawley foram expostos por 20 minutos ao dia (7 dias / semana) por 1 mês à RF-EMR e nenhum efeito foi observado na composição lipídica, concentração de malondialdeído, número de espermatozoides e estrutura histológica dos testículos; e por Dasdag et al. (2008) no qual a exposição de ratos albinos Wistar por 2 horas / dia (7 dias / semana) por 10 meses não afetou os níveis de caspase-3 ativa nos testículos, uma característica bem conhecida em apoptose típica.

Os efeitos da exposição à radiação emitida por telefone celular na qualidade dos espermatozoides são principalmente ligados a diminuição no número de espermatozoides, motilidade, vitalidade e morfologia normal (YAN et al., 2007; WADOWIAK et al., 2007; MAILANKOT et al., 2009; KESARI et al., 2010). Entretanto, alguns estudos também reportam diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos e peso dos testículos e destruição de células Leydig (KHILLARE e BEHARI, 1998; BEHARI e KESARI, 2006).

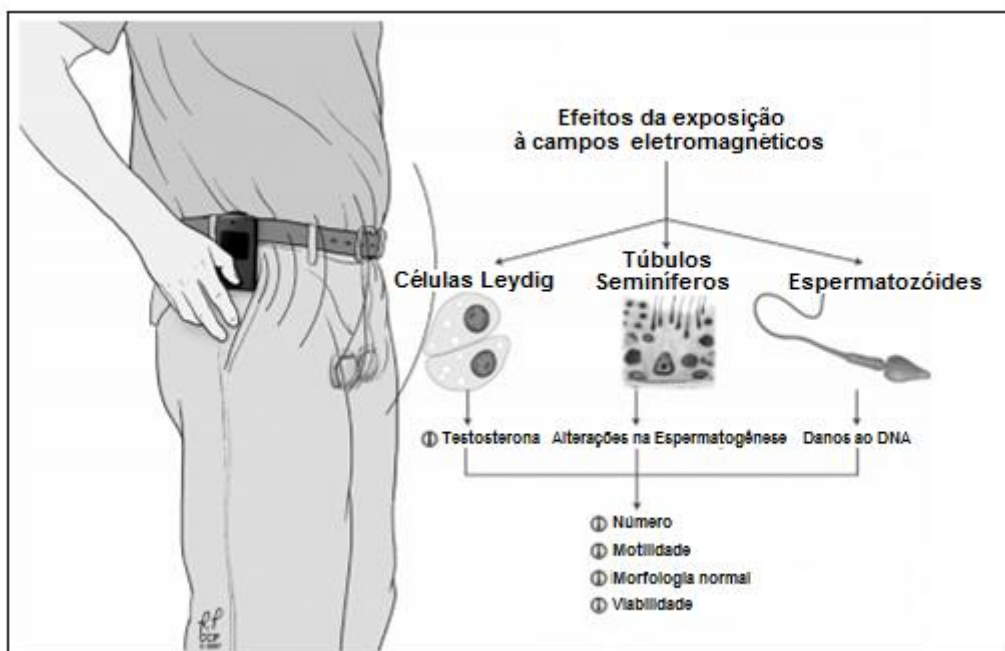


Figura 6. Principais efeitos da exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência sobre o potencial de fertilidade masculino.
Fonte: Deepinder et al., 2007

Recentes estudos têm ressaltado que homens inférteis são frequentemente caracterizados por altos níveis de DNA fragmentado nos espermatozoides (LEWIS et al., 2005; AITKEN et al., 2008). Pesquisadores sugerem que a presença de danos ao DNA no núcleo espermático envolve uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual leva ao estresse oxidativo (AITKEN et al., 2005; DE IULIIS et al., 2009). ROS podem danificar muitas biomoléculas, incluindo DNA, lipídios e proteínas (KESARI et al., 2011b). O aumento da exposição à RF-EMR emitida por fontes como telefones celulares pode estar envolvido na produção de ROS (DE IULIIS et al., 2009).

Espermatozoides são especialmente sensíveis ao estresse oxidativo (OGER et al., 2003; AITKEN et al., 2003; AITKEN et al., 2004; KOPPERS et al., 2008). Além disso, telefones móveis são comumente carregados em bolsas ou nos bolsos das calças próximos a cintura durante a maior parte do dia; e essa proximidade aos órgãos reprodutores pode afetar negativamente a fecundidade e saúde masculina. Um estudo clínico realizado por Kilgallon e Simons em 2005 demonstrou que homens que carregam aparelho celular em seus bolsos ou preso aos cintos têm um

menor número de espermatozoides que homens que não carregam celulares.

Considerando essa proximidade, a magnitude da contaminação com radiação e a falta de informações consistentes sobre seus efeitos fisiológicos, nós conduzimos o presente estudo para analisar as consequências da exposição de ratos Wistar a campos eletromagnéticos de radiofrequência (1,8 GHz) à qualidade dos espermatozoides.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência (1,8 GHz) emitida por telefones móveis sobre os parâmetros reprodutivos em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência emitida por telefones móveis sobre os seguintes parâmetros:

1. Morfologia dos espermatozoides;
2. Taxa de mortalidade dos espermatozoides;
3. Concentração de espermatozoides;
4. Percentual de espermatozoides com DNA fragmentado;
5. Massa dos órgãos, testículos, epidídimos e vesícula seminal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

O protocolo para uso de animais neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brasil (Número de permissão: 060 / 2012). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL U.S., 2011).

3.2 ANIMAIS

Quarenta ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, 1769), com 90 dias de idade e 280 ± 20 g de massa corporal, provenientes do Centro da Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, foram usados para esse estudo. Todos os animais foram acomodados em grupos em gaiolas no biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e foram manuseados pela mesma pessoa todos os dias. As gaiolas dos animais foram mantidas em ambiente controlado, temperatura de 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (07h00min às 19h00min - claro e 19h00min às 07h00min - escuro), e todos os animais receberam água e ração comercial (Nuvital, Colombo, PR, BR) *ad libitum*.

3.3 PREPARAÇÃO DAS GAIOLAS PARA MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Considerando a imobilização dos animais, durante processos experimentais, 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 7) 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 7. A, gaiola usada para acomodar os animais durante os experimentos; B, tampa com tubo PVC acoplado, dentro do qual o aparelho celular permanece alojado durante o período de exposição.

As gaiolas utilizadas mediam 40 cm de altura, 60 cm de comprimento, 35 cm de largura e foram externamente revestidas com papel alumínio. As gaiolas dos animais controles foram posicionadas a 3 m da gaiola dos animais expostos e o papel alumínio foi utilizado com o objetivo de evitar que a dispersão da radiação emitida pelo aparelho celular no interior da gaiola dos animais expostos atingisse os animais controles; bem como bloquear outros campos de radiação externos, atuando como uma gaiola Faraday. As tampas das gaiolas possuíam vários furos com 0,5 cm de diâmetro para facilitar a ventilação dentro das gaiolas, e um largo furo no centro, no qual foi colocado um tubo de cloreto de polivinila (PVC) com um diâmetro de 17 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 8. Como o aparelho celular estava posicionado dentro da

gaiola, a radiação emitida sofreu múltiplas reflexões e, devido a isso, é possível que a intensidade do campo elétrico produzido pelo aparelho dentro da gaiola seja maior que a intensidade do campo elétrico produzido pelo mesmo aparelho fora da gaiola. Os estudos desenvolvidos por Hondou (2002) demonstram esse efeito em vagões de trem onde os passageiros estavam usando telefones celulares.

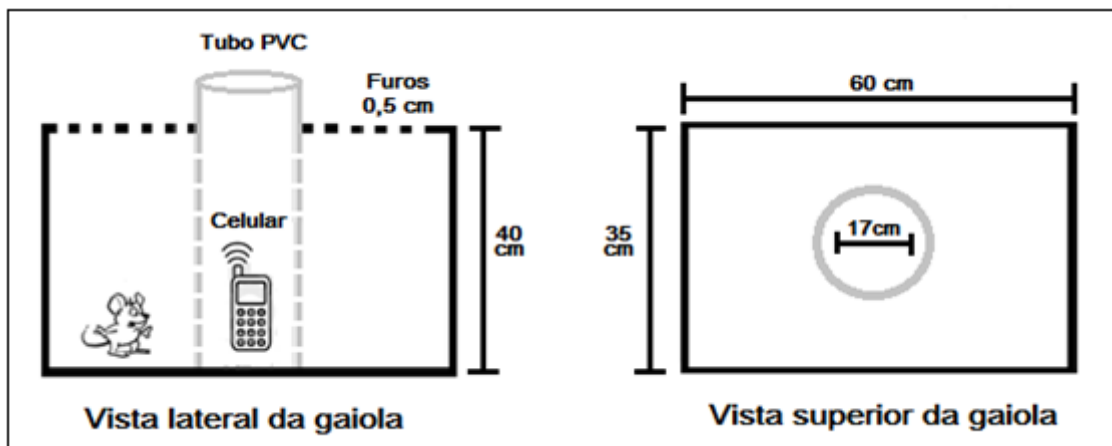


Figura 8. Representação esquemática da gaiola utilizada para acomodar os animais durante os experimentos.

Todos os animais foram colocados nas gaiolas especiais três dias antes da exposição para adaptação, e mantidos durante todo o período experimental. As gaiolas dos animais expostos e controles usadas nesse estudo eram idênticas e grupos de 5 ratos Wistar foram mantidos por gaiola.

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. Mensurações da intensidade do campo elétrico foram também feitas dentro das gaiolas dos grupos controles enquanto o aparelho celular estava funcionando dentro da gaiola dos animais expostos com o objetivo de verificar se a radiação poderia afetar os animais controle.

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) durante 3 minutos. 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 estava em funcionamento dentro da caixa dos animais expostos (Figura 9).

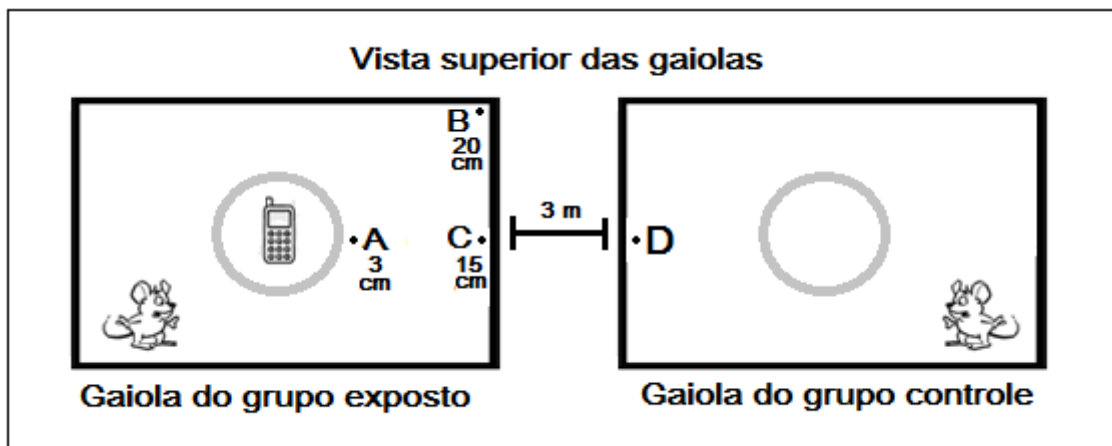


Figura 9. Representação esquemática dos quatro pontos, A, B, C e D, onde foram feitas as medições da intensidade do campo elétrico gerado pela radiação emitida pelo telefone celular no interior das gaiolas.

Uma sonda EMR-300 foi usada para aferir as intensidades de campo elétrico. A *EMR 300 broadband RF Survey Meter* é um dispositivo da companhia NARDA capaz de medir a intensidade do campo elétrico de uma onda eletromagnética na faixa entre 100 kHz e 3 GHz. No entanto, as dimensões da gaiola estão muito perto da dimensão do comprimento da onda emitida pelo telefone celular (16,7 cm); o que significa que estamos na região de Fresnel. Nesta região, a precisão da medição dos campos é pobre; assim, a intensidade do campo elétrico, aqui apresentada, é apenas um valor médio.

A média dos valores da intensidade do campo elétrico no interior da gaiola do grupo exposto foi $4,7 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$ 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 $4,1 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$. A intensidade média do campo elétrico no interior da gaiola do grupo controle foi $0,45 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$ no ponto D (CAIRES et al., resultados não

publicados), tal valor corresponde basicamente a radiação *background*, uma vez que permanece o mesmo após desligar o aparelho celular.

O pedido de depósito da patente “Caixa blindada para manter e expor pequenos mamíferos de laboratório à radiação eletromagnética” foi realizado em 2013, o qual segue em anexo (Anexo A).

3.4 MECANISMO ACIONADOR DO TELEFONE CELULAR

O Laboratório de Ótica Aplicada, chefiado pelo professor Dr. José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça, do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF, em colaboração com o laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), desenvolveram o mecanismo acionador do telefone celular.

O pedido de depósito da patente “Dispositivo eletrônico ativador de aparelhos emissores de radiação eletromagnética” foi realizado em 2013 e segue em anexo (Anexo B).

Esse mecanismo consiste em um dispositivo eletrônico micro-controlado que funciona como um timer. O dispositivo pode ser conectado a até 12 telefones celulares ao mesmo tempo e é alimentado através de energia elétrica, permanecendo conectado a uma tomada, fonte de energia primária, e a um sistema de alimentação secundário (no-break), o qual garante que o mecanismo funcione mesmo quando há interrupção no fornecimento de energia primária (Figura 10).

O mecanismo acionador do telefone celular foi programado para ativar o celular para realizar ligações com duração de 25 segundos a cada 2 minutos durante 3 e 10 noites. Tanto o mecanismo acionador quanto o aparelho celular operam sem som, luz ou vibração.

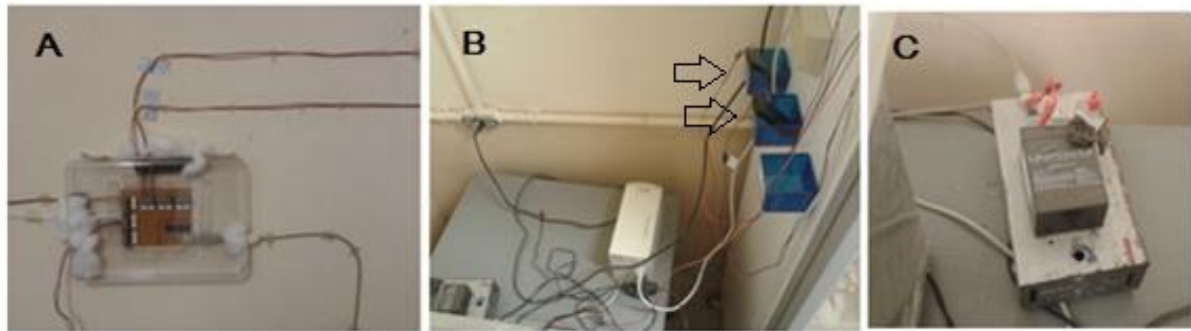


Figura 10. **A**, dispositivo eletrônico micro-controlado; **B**, conexão com os telefones celulares; **C**, conexão com o no-break.

3.5 EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais: 2 grupos expostos e 2 grupos controles (não expostos); cada grupo contendo 10 animais. Os animais dos grupos expostos foram submetidos à radiação emitida durante chamadas de 25 segundos a cada 2 minutos, 12 horas ao dia (19h00min às 7h00min), um grupo por 3 dias e o outro por 10 dias. A exposição foi realizada durante o período noturno, pois este é o período de atividade dos roedores (PINHEIRO et al., 2010). Durante os intervalos de 2 minutos e durante 12 horas ao dia (7h00min às 19h00min), o telefone permaneceu dentro das gaiolas, porém no modo *standby*. O tempo total de exposição diária à RF-EMR foi aproximadamente 2,2 horas no modo de chamada e 21,8 horas no modo *standby*.

O telefone celular utilizado opera no sistema GSM (*Global System for Mobile Communications*) a uma frequência de 1,8 GHz e foi mantido conectado à tomada e ao mecanismo acionador durante todo o período de exposição.

3.6 TAXA DE ABSORÇÃO ESPECÍFICA (SAR)

A taxa de absorção específica (SAR) é uma medida definida pela energia

absorvida por unidade de tempo por unidade de massa de tecido (W / kg). Em princípio, é possível obter o valor de SAR através de análise numérica e medição experimental. A média é dada por:

$$\langle SAR \rangle = \frac{1}{2} \frac{\sigma}{\rho} |\vec{E}|^2$$

onde σ é a condutividade elétrica (S / m) de um tecido biológico, ρ é a densidade do tecido (kg / m³) e E representa a intensidade do campo elétrico (V / m) emitido pelo telefone celular (POLK et al., 1996).

A intensidade média do campo elétrico medido dentro da gaiola dos animais foi de 4,1 V / m. Neste caso, a condutividade elétrica do epidídimo é cerca de 1,39 S / m (NISBET et al., 2012), o volume do epidídimo de ratos é aproximadamente 0,39 cm³ (WEN et al., 2000) e a massa média mensurada foi de 0,45 g. Assim, neste estudo, o valor de SAR foi de 20 mW / kg.

3.7 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

Para avaliar se existia variação da temperatura dentro das gaiolas devido à radiação emitida pelo telefone celular, foram usados sensores de temperatura LM35 de precisão (Texas Instruments) para medir a temperatura ambiental (biotério) e a temperatura dentro das gaiolas dos animais controles e expostos. As medidas foram realizadas antes e durante a exposição à RF-EMR. Os valores foram registrados durante 60 minutos.

A temperatura retal dos animais, após período de exposição à radiação, foi também mensurada no grupo exposto bem como no grupo controle; usando um termômetro digital (TS-101 PM Tech Line ®).

3.8 PESAGEM DOS ANIMAIS E ÓRGÃOS

Os animais foram pesados antes e após exposição à radiação em todos os grupos; e após o período de exposição e obtenção das amostras para avaliação das características dos espermatozoides, os testículos e os epidídimos, direito e esquerdo, e a vesícula seminal dos animais foram removidos e também pesados. A massa relativa dos órgãos foi calculada, em relação à massa corporal do animal: massa relativa (%) = massa do órgão (g) x 100 / massa do animal (g).

3.9 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS ESPERMATOZOIDES

3.9.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Ao final do período de exposição, os animais foram eutanasiados utilizando xilazina (10 mg / kg) e cetamina (90 mg / kg). Um pequeno corte foi feito na bolsa escrotal expondo o epidídimo do animal e com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, vários pequenos cortes foram feitos na cauda epididimal liberando o seu conteúdo. A quantidade referente a uma ponta de tesoura do conteúdo extravasado (~5 µL) foi coletada do epidídimo esquerdo e referente a três pontas de tesoura (~15) do epidídimo direito. Cada amostra de secreção coletada foi então transferida para 50 µL de salina isotônica (0,9 %, v / v, NaCl) em uma placa de Petri a 37 °C para dispersão dos espermatozoides. Tanto os animais quanto todos os utensílios usados durante esse procedimento foram mantidos em uma placa aquecida a 37° C.

Ambos os epidídimos foram usados; a amostra de espermatozoides coletada do epidídimo direito foi usada para avaliar a fragmentação do DNA espermático e a amostra coletada do epidídimo esquerdo foi usada para avaliar a vitalidade, morfologia e a concentração dos espermatozoides. Todas as análises foram realizadas às cegas.

3.9.2 MORTALIDADE

A avaliação do percentual de mortalidade foi feita imediatamente após coletar as amostras em todos os grupos; assim, as mensurações de mortalidade nos animais controles e tratados foram submetidas ao mesmo tempo e manuseio.

A mortalidade foi estimada pela avaliação da integridade da membrana das células. Cinco μL de cada amostra foram transferidos para uma lâmina de microscopia seguida pela adição de 5 μL de eosina 0,5 % (m / v) (DE IULIIS et al., 2009). Os espermatozoides vivos, com membranas intactas (impermeáveis), não permitem a entrada do corante e apresentam a cabeça transparente ou rosa claro e os espermatozoides mortos, com membrana danificada, apresentam coloração vermelha ou rosa escuro. As lâminas foram preparadas e imediatamente analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX41) em um aumento de 400 x de acordo com o *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010); a base do microscópio onde a lâmina fica apoiada durante análise foi também aquecida previamente utilizando uma bolsa de gel a 37° C. Ao menos 200 células foram avaliadas em cada lâmina e os resultados expressos como porcentagem.

3.9.3 MORFOLOGIA

Vinte μL de cada amostra foram usados para avaliação da morfologia dos espermatozoides; dois esfregaços (duplicata) foram preparados por amostra, sendo 10 μL para cada. Os esfregaços foram secos ao ar, corados pelo método de coloração de Shorr de acordo com o *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010) e armazenados para análise posterior. Todas as análises foram feitas sob um microscópio de luz em um aumento de 400 x (Olympus BX41) pela mesma pessoa, 5 - 7 dias após a preparação de esfregaço. Ao menos 200 células foram avaliadas

por lâmina para anormalidades morfológicas.

3.9.4 CONCENTRAÇÃO

Uma diluição foi preparada transferindo 20 μL de cada amostra para 6 mL de água deionizada (1:300, v / v) para a determinação da concentração (número de espermatozoides por unidade de volume). As diluições foram feitas em duplicata e 10 μL de cada diluição foram transferidos para uma das câmaras de contagem em uma câmara de Neubauer (Improved Neubauer – 0,1 mm de profundidade). A contagem de espermatozoides foi realizada sob microscopia de luz (Olympus BX41) em um aumento de 400 x. As células foram contadas nos quatro quadrantes laterais em cada duplicata; os quadrantes estão representados na figura 11 pelos números de 1 a 4 (MARQUES et al., 2009).

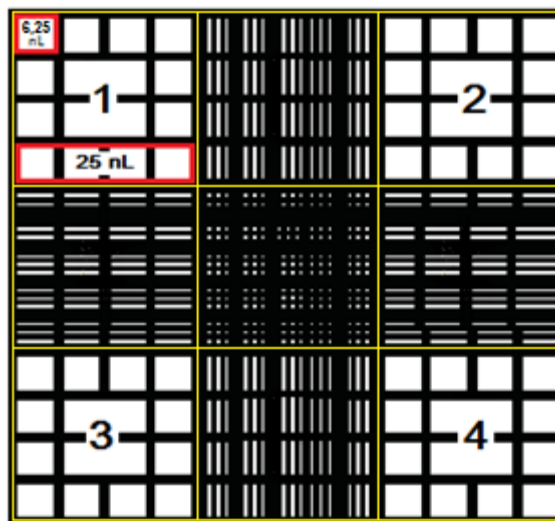


Figura 11. Representação dos nove quadrantes de uma das câmaras de contagem da câmara de Neubauer, delineados em amarelo; os quadrantes laterais utilizados para contagem dos espermatozoides estão representados pelos números de 1 a 4.

A aceitabilidade das contagens foi avaliada de acordo com a tabela 1. A diferença aceitável é estabelecida de acordo com a soma das contagens das duplicatas.

Tabela 1. Aceitabilidade das contagens das duplicatas.

Soma	Diferença aceitável	Soma	Diferença aceitável
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

Fonte: WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Organização Mundial da Saúde, 2010.

A concentração de espermatozoides foi calculada segundo o *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* da seguinte forma:

$$\text{Concentração de espermatozoides / mL} = (N/n) \times (1/25) \times \text{FD} \times 10^6$$

na qual N representa o número total de espermatozoides (soma das contagens das duas replicatas), n representa o número total de linhas contadas e FD o fator de diluição. Para este estudo $n = 16$, pois os quatro quadrantes laterais, com 4 linhas cada (25 μL), foram contados (Figura 11) e $\text{FD} = 300$.

Para evitar a contagem do mesmo espermatozóide em quadrantes

adjacentes, um espermatozóide posicionado em uma das bordas, só foi contado com a cabeça na linha limite inferior ou esquerda do quadrante, formando um “L” como mostrado na figura 12.

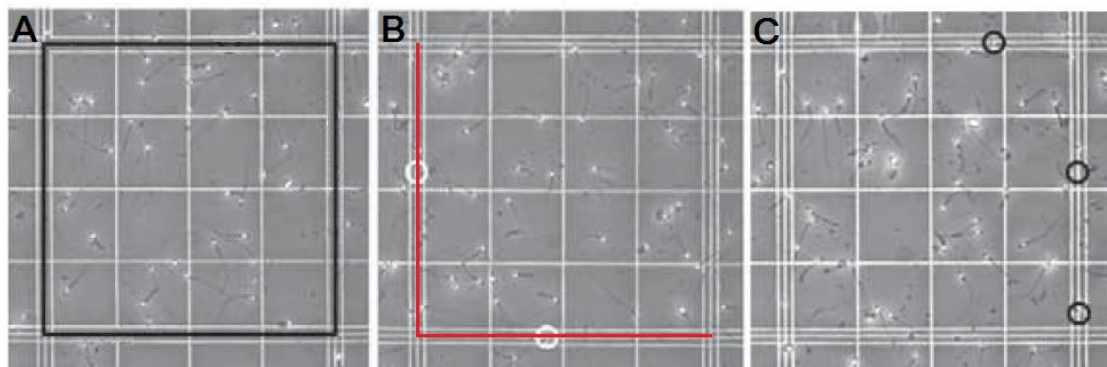


Figura 12. **A**, representa o quadrante delimitado; **B**, representa o “L” formado pelas linhas limites sobre as quais os espermatozoides, circulosos em branco, são contados e em **C**, estão representados os espermatozoides que não são contados nesse quadrante, circulosos em preto.
Fonte: WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Organização Mundial da Saúde, 2010.

3.9.5 ENSAIO TUNEL

A integridade do DNA dos espermatozoides foi avaliada pelo ensaio *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL). As amostras de espermatozoides foram suspensas em 0,5 mL de Solução Tampão Fosfato (PBS), 5 mL de solução de paraformaldeído 1 % (m / v) adicionados, e foram incubadas por 15 minutos a 4 °C para permeabilização das células. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 600 x *g* e o *pellet* ressuscitado em 5 mL de PBS para lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 0,5 mL de PBS e 5 mL de etanol 70 % gelado (v / v) foram adicionados para fixação das amostras. As células foram então armazenadas a - 20 °C por 24 horas.

As amostras do controle positivo foram tratadas com 50 µL de DNase I (1 mg /

mL, Sigma) e incubadas por 30 minutos a 37 °C em banho-maria. A marcação TUNEL foi realizada utilizando o kit APO-BrdUTM TUNEL Assay (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Iodeto de Propídio e Alexa Fluor 488 foram usados para as análises. As amostras foram mantidas protegidas da luz e analisadas por citometria de fluxo (Facscalibur - BD). Ao menos 10.000 células foram analisadas por amostra. O software *Cell Quest* foi usado para a análise dos dados.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As variações estatísticas em mortalidade, morfologia e concentração de espermatozoides entre os grupos expostos e respectivos controles bem como entre os grupos expostos foram analisadas pelo teste t de Student usando o software Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc); valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados provenientes de citometria de fluxo foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Dunnett também utilizando o software Prism 5.0. Microsoft Office Excel 2007 foi usado para fazer o gráfico da avaliação da temperatura.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

Como mostrado na figura 13, não houve aumento da temperatura, devido à exposição, dentro das gaiolas dos animais expostos (com o telefone celular). A temperatura variou igualmente dentro das gaiolas dos dois grupos de acordo com a variação da temperatura ambiente.

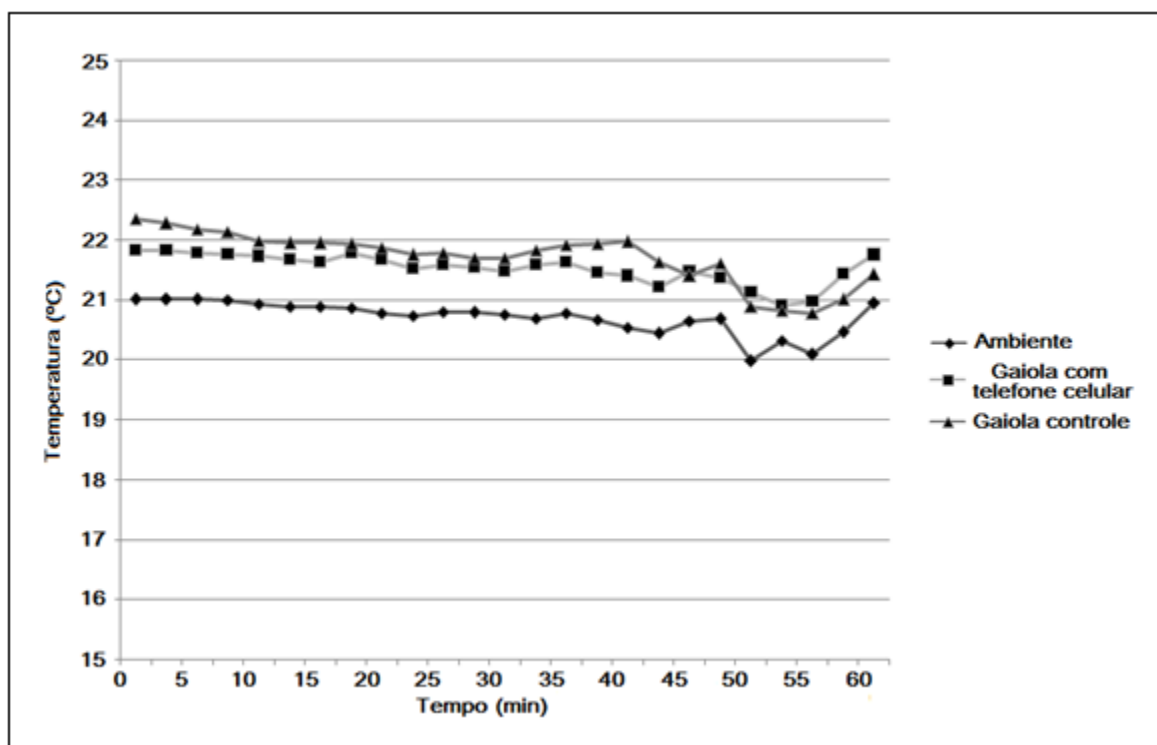


Figure 13. Diagrama das temperaturas, ambiente e dentro das gaiolas dos grupos controle e exposto. Em $t = 5$ minutos o telefone celular foi acionado para realizar uma ligação, a qual teve duração de 55 minutos; os valores de temperatura foram registrados a cada 5 minutos.

Além disso, não houve diferença significativa entre a temperatura retal dos animais dos grupos controle e exposto após exposição à radiação. A temperatura média em °C dos animais expostos durante 3 noites foi $37,22 \pm 0,16$ ($n = 6$) e dos animais controle, $37,07 \pm 0,18$ ($n = 6$), $p = 0,55$; e a temperatura média dos animais

expostos durante 10 noites foi $37,53 \pm 0,22$ ($n = 6$) e dos animais controle, $37,10 \pm 0,23$ ($n = 6$), $p = 0,21$.

4.2 MASSA DOS ANIMAIS E ÓRGÃOS

Tanto a massa corporal dos animais quanto a massa relativa dos órgãos, ou seja, a massa dos órgãos em relação a massa corporal do animal, não apresentaram diferença significativa entre os grupos expostos e controles correspondentes como mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Massa dos animais antes (inicial) e após (final) exposição à radiação emitida por telefone celular; e massa relativa dos órgãos (testículos, epidídimos e vesícula seminal) após exposição.

Grupo (n=6)	Massa inicial dos animais (g)	Massa final dos animais (g)	Massa relativa dos órgãos (g)		
			Testículos	Epidídimos	Vesícula seminal
Exposto (3 noites)	$268,8 \pm 5,19$	$295,0 \pm 7,14$	$0,43 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,004$	$0,20 \pm 0,01$
Controle	$261,7 \pm 7,01$	$281,9 \pm 5,58$	$0,45 \pm 0,006$	$0,14 \pm 0,001$	$0,18 \pm 0,01$
Exposto (10 noites)	$269,9 \pm 5,12$	$284,4 \pm 6,68$	$0,47 \pm 0,006$	$0,17 \pm 0,002$	$0,14 \pm 0,008$
Controle	$273,9 \pm 3,91$	$286,1 \pm 7,19$	$0,46 \pm 0,009$	$0,17 \pm 0,003$	$0,17 \pm 0,009$

4.3 CARACTERÍSTICAS DOS ESPERMATOZOIDES

Os animais de ambos os grupos expostos, por 3 e 10 noites, mostraram aumento significativo da mortalidade (% de espermatozoides mortos) e redução

significativa da concentração (número de espermatozoides $\times 10^6 / \text{mL}$) comparados aos respectivos grupos controles (Figura 14).

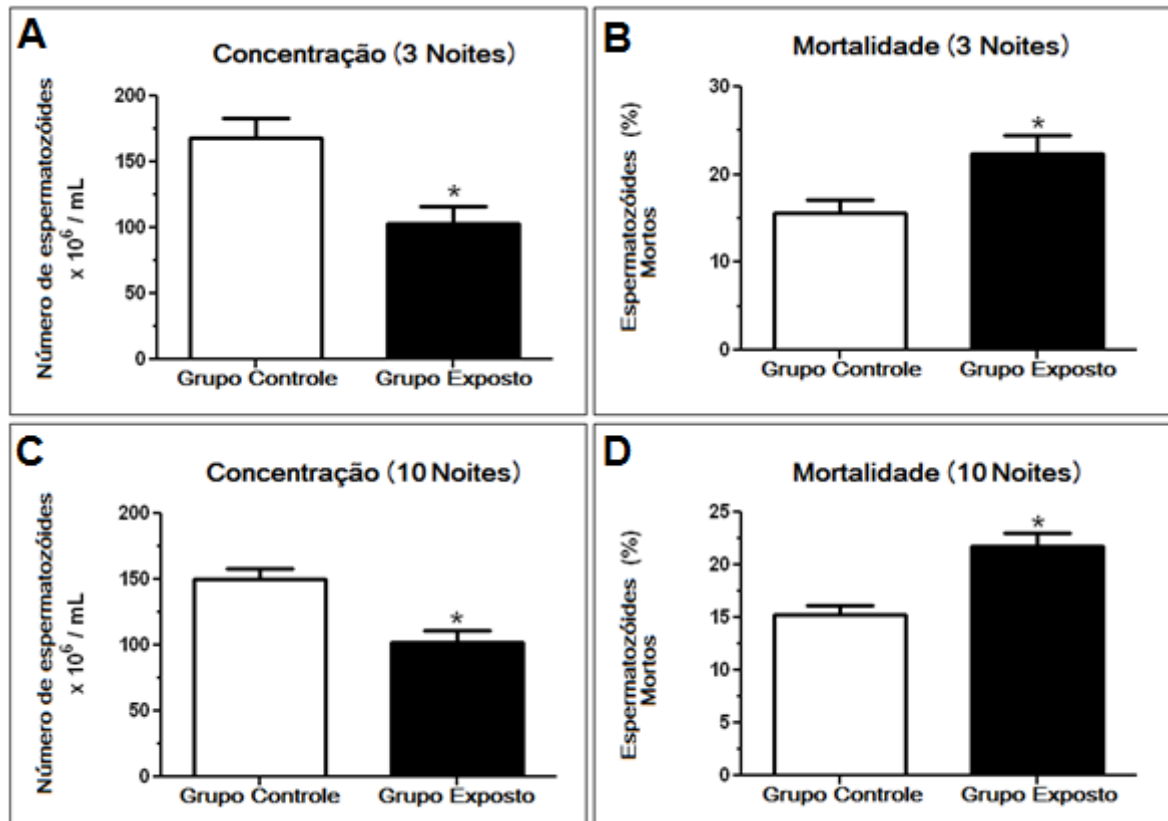


Figura 14. A e B, Número de espermatozoides nos grupo expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites e grupos controles correspondentes. C e D, percentual de espermatozoides mortos nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites e grupos controles correspondentes. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Como demonstrado na figura 14, a concentração de espermatozoides foi reduzida em 38,67 % nos animais do grupo exposto à RF-EMR por 3 noites comparado ao grupo controle (14^a) e o percentual de espermatozoides mortos foi 43,08 % maior comparado ao grupo controle (14^B). Os grupos controles apresentaram média de $15,62 \pm 1,50$ % ($n = 10$) e $167,8 \pm 15,03 \times 10^6 / \text{mL}$ ($n = 10$), enquanto os grupos expostos apresentaram média de $22,35 \pm 2,09$ % ($n = 10$) e $102,9 \pm 13,37 \times 10^6 / \text{mL}$ ($n = 10$); $p = 0,0089$ e $p = 0,0435$ respectivamente.

Como também demonstrado na figura 14, a concentração de espermatozoides foi reduzida em 31,78 % nos ratos do grupo exposto à RF-EMR por 10 noites, comparado ao grupo controle (14C) e o percentual de espermatozoides mortos foi 41,94 % maior comparado ao grupo controle (14D). Os grupos controles apresentaram média de $15,33 \pm 0,86$ % ($n = 10$) e $150,0 \pm 8,48$ ($n = 10$), enquanto os grupos expostos apresentaram média de $21,76 \pm 1,19$ % ($n = 10$) e $102,3 \pm 9,26$ ($n = 10$); $p = 0,0039$ e $p = 0,0005$ respectivamente.

Estatisticamente comparando os grupos expostos, não houve diferença significativa entre o grupo de animais expostos por 3 noites e por 10 noites nos parâmetros mortalidade e concentração avaliados (Figuras 15).

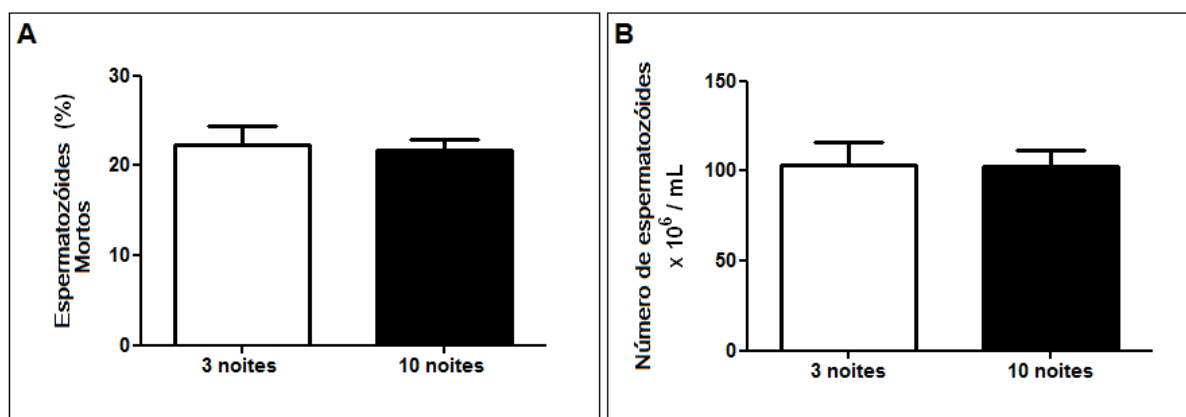


Figura 15. **A**, percentual de espermatozoides mortos nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites. **B**, número de espermatozoides nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência por 3 e 10 noites. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de espermatozoides com morfologia anormal entre os grupos. Os dados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Percentual de espermatozoides morfologicamente normais e anormais nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência, por 3 e 10 noites, e grupos controles correspondentes. Valores expressos como média \pm EPM.

Grupo (n=20)	Espermatozoides morfologicamente normais (%)	Espermatozoides morfologicamente anormais (%)		
		Anormalidades na cabeça	Anormalidades na cauda	Total de anormalidades
Exposto (3 noites)	98,86 \pm 0,17	0,64 \pm 0,16	0,49 \pm 0,12	1,14 \pm 0,17
Controle	98,53 \pm 0,16	0,85 \pm 0,15	0,61 \pm 0,11	1,17 \pm 0,16
Exposto (10 noites)	98,12 \pm 0,21	0,89 \pm 0,14	0,98 \pm 0,17	1,87 \pm 0,21
Controle	98,46 \pm 0,16	0,87 \pm 0,11	0,66 \pm 0,11	1,53 \pm 0,16

A figura 20 representa um espermatozóide considerado morfologicamente normal fotografado através de um microscópio Nikon TS100F. Espermatozoides com cauda quebrada (Figura 21), com cabeça quebrada, sem curvatura ou com duas cabeças (Figura 22) foram classificados como anormais. Cabeças decapitadas ou somente caudas foram considerados defeitos da técnica (Figura 23).



Figura 16. Espermatozóide de rato Wistar com morfologia normal.

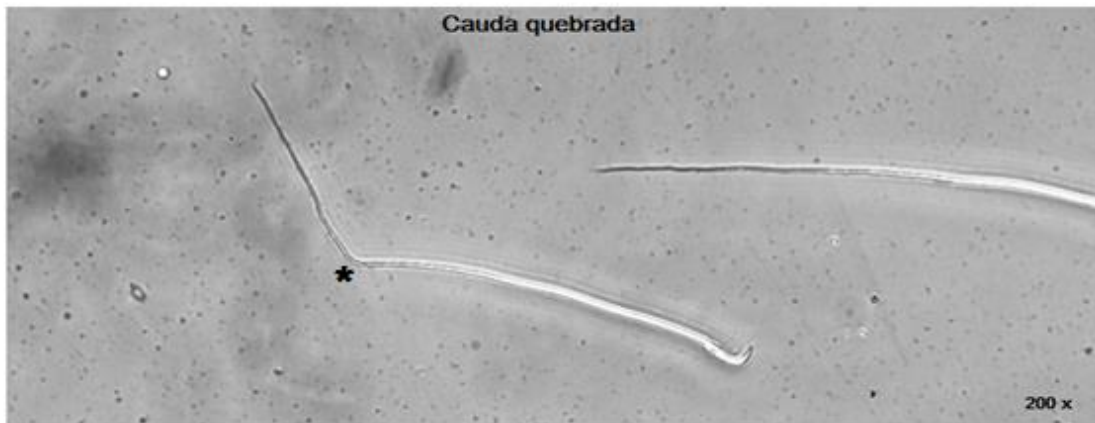


Figura 17. Espermatozóide de rato Wistar com anormalidade na cauda; * cauda quebrada.

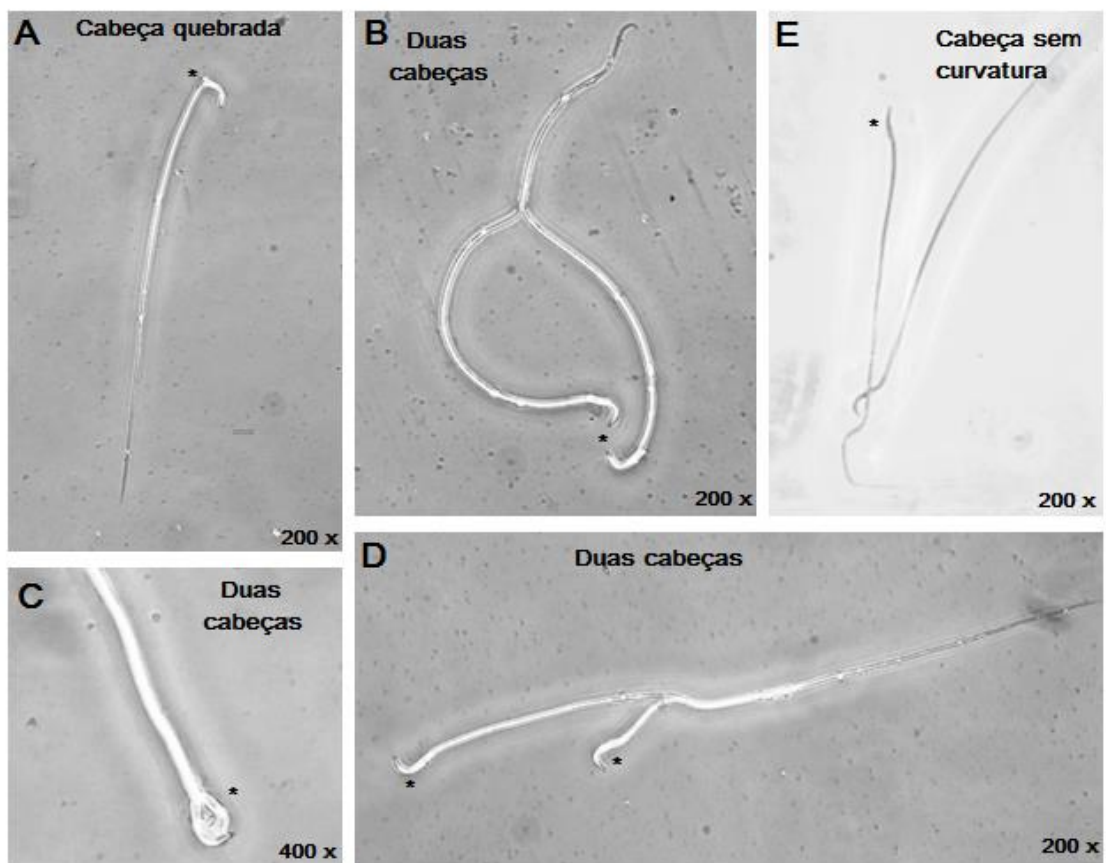


Figura 18. Espermatozoides de ratos Wistar com anormalidades na cabeça. **A**, espermatozoide com cabeça quebrada; **B**, **C** e **D**, espermatozoides com duas cabeças; **E**, espermatozóide com cabeça sem curvatura.

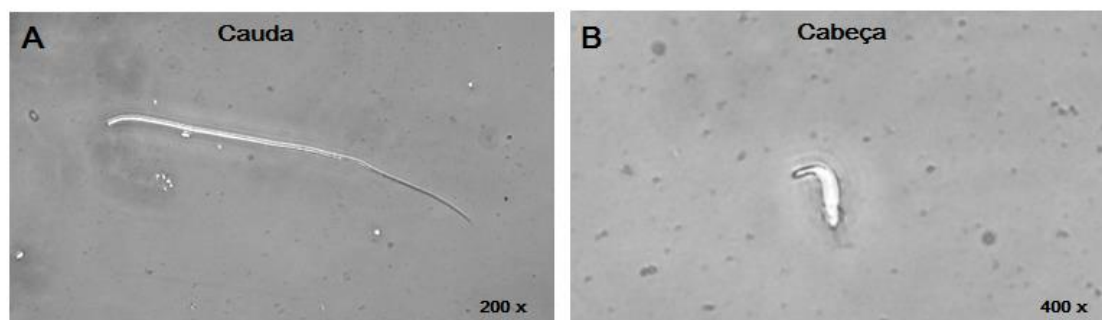


Figura 19. Espermatozoides considerados defeitos da técnica. **A**, cauda sem cabeça; **B**, cabeça decapitada.

4.4 ENSAIO TUNEL

Como demonstrado na figura 24, os animais apresentaram um aumento significativo no percentual de espermatozoides com DNA fragmentado após exposição à RF-EMR por 3 e 10 noites, comparado aos animais dos grupos controles correspondentes.

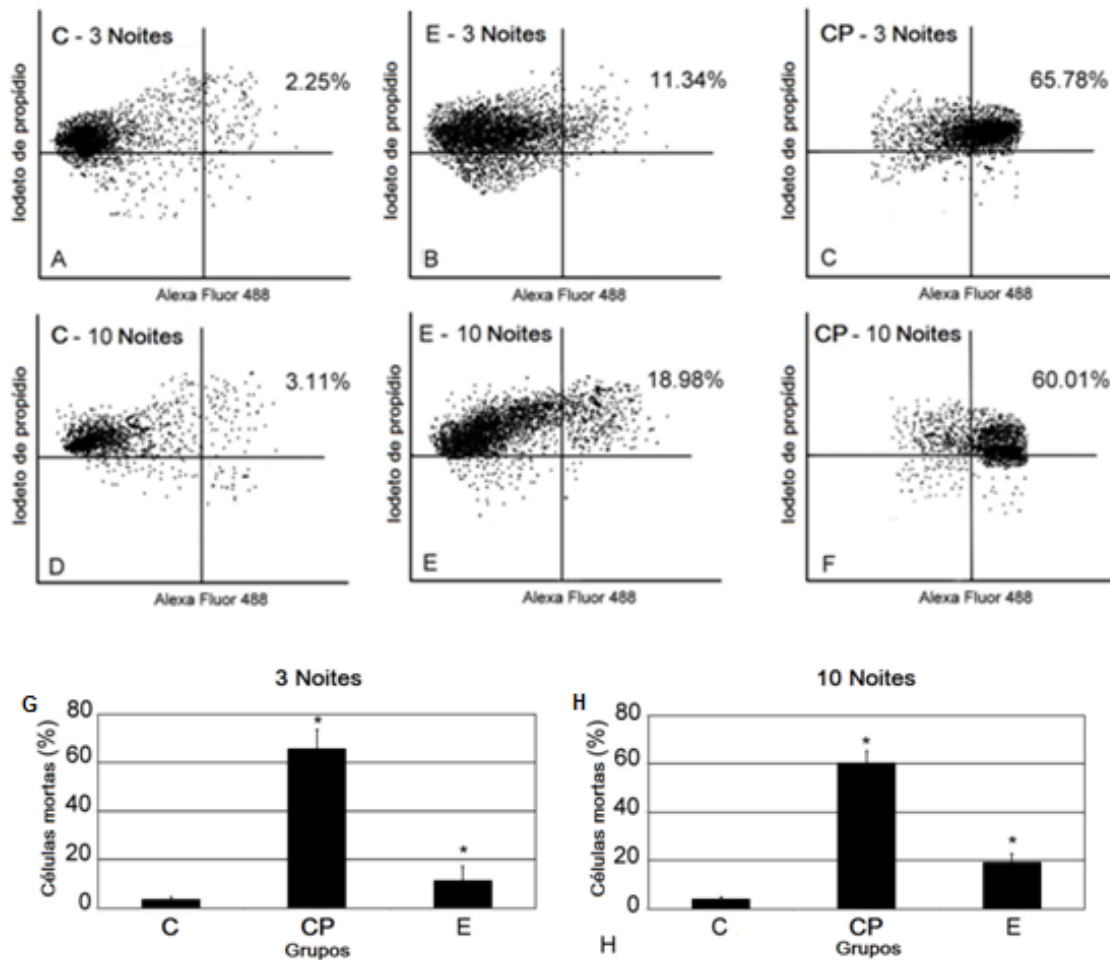


Figure 20. Percentual de espermatozoides com DNA fragmentado nos grupos expostos à radiação eletromagnética de radiofrequência, por 3 e 10 noites, e grupos controles correspondentes. O quadrante superior esquerdo representa as células marcadas somente com Iodeto de Propídio; o quadrante superior direito representa as células marcadas com Alexa Fluor 488 e Iodeto de Propídio, representando as células com fragmentações no DNA; a porcentagem indicada neste quadrante representa o percentual de espermatozoides com DNA fragmentado. Os quadrantes inferiores, que representam as células não marcadas ou fragmentos de células, não foram considerados. **A**, Grupo controle (C) correspondente ao grupo exposto por 3 noites (n=4); **B**, Grupo exposto (E) à RF-EMR por 3 noites (n=5); **C**, Grupo controle positivo (CP), amostras tratadas com DNase I (n=3); **D**, Grupo controle (C) correspondente ao grupo exposto por 10 noites (n=4); **E**, Grupo exposto (E) à RF-EMR por 10 noites (n=5); **F**, Grupo controle positivo (CP), amostras tratadas com DNase I (n=3). **G** e **H**, Comparação estatística entre os grupos por ANOVA e teste de Dunnett. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

5 DISCUSSÃO

Esse estudo demonstra que a radiação eletromagnética de radiofrequência emitida por telefones móveis afeta a qualidade dos espermatozoides, o que pode contribuir para a infertilidade masculina. Os resultados revelaram um aumento na mortalidade e diminuição na concentração de espermatozoides (Figura 14) juntamente com um aumento no número de células com DNA fragmentado (Figura 20) em ratos Wistar expostos a campos eletromagnéticos com 1,8 GHz de frequência. É importante considerar a soma dos efeitos observados sobre os parâmetros avaliados neste estudo. Os animais expostos possuem um número maior de espermatozoides mortos em um reduzido número de espermatozoides, restando assim um número de células viáveis significativamente inferior.

A fragmentação do DNA é uma característica das células em processo apoptótico (ALBERTS et al., 2014), ou seja, podemos associar a maior incidência de espermatozoides com DNA fragmentado em animais expostos com maior número de células em apoptose.

Em 2009, De Iuliis et al. e Agarwal et al. reportaram que a exposição à RF-EMR emitida por aparelhos celulares diminuem a vitalidade em espermatozoides *in vitro*. Estudos *in vitro* são limitados pelo tempo de sobrevivência dos espermatozoides em um meio de cultura. No entanto, efeitos na vitalidade dos espermatozoides foram também observadas em experimentos *in vivo*, por exemplo, Lee et al. (2004) demonstraram a indução de apoptose em espermatozoides de camundongos expostos a RF-EMR e Agarwal et al. (2008) reportaram uma diminuição significativa da vitalidade em 3 grupos de homens que usavam celular por períodos variáveis de tempo, comparados aos que não usavam.

Um aumento de apoptose e uma diminuição significativa na contagem de espermatozoides foram também observadas em ratos Wistar expostos a radiação emitida por telefones celulares por Kesari et al. (2010). Yan et al. (2007) e Kilgallon e Simmons (2005) também relataram um aumento significativo na incidência de

espermatozoides mortos e uma diminuição na concentração de espermatozoides devido a exposição à RF-EMR, respectivamente. Esses achados suportam nossos resultados.

Os efeitos da RF-EMR ao DNA têm sido relatados em vários estudos nas últimas décadas (GARAJ-VRHOVAC et al., 1990; LAI e SINGH, 1996). De Iullis et al. (2009) demonstraram fragmentação do DNA em espermatozoides humanos *in vitro* após exposição à radiofrequência, o que também é consistente com nossos resultados. Muitos pesquisadores tem associado a perda de função e os danos ao DNA a um estresse oxidativo devido a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DE IULLIS et al., 2009; KESARI et al., 2011b). Lai e Singh demonstraram em 1997 que protetores contra radicais livres bloquearam os efeitos da RF-EMR ao DNA de espermatozoides de ratos. Segundo a literatura científica existente, o aumento das quebras no DNA observado neste estudo pode estar relacionado a danos oxidativos ao DNA dos espermatozoides culminando na sua fragmentação. A fragmentação do DNA de células germinativas está associada à infertilidade, desenvolvimento embrionário comprometido, altas taxas de aborto espontâneo e aumento da morbidade da prole incluindo desenvolvimento de câncer na infância (EVENSON et al., 2006).

Neste estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na incidência de anormalidades nos espermatozoides após exposição à radiação por 3 e 10 noites entre grupos expostos e controles correspondentes (Tabela 2). Contrário a este resultado, uma análise feita por Wdowiak et al. (2007) dos parâmetros de espermatozoides de 304 homens, os quais usavam telefone celular por mais de 1 ano, revelou um aumento na porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal. Essas anormalidades estão diretamente relacionadas com a duração da exposição à radiação (LA VIGNERA et al., 2012).

O ciclo do epitélio seminífero leva 13,3 dias em ratos Wistar pós-púberes e a duração de todo o processo de espermatogênese leva mais de 50 dias (HUCKINS, 1965), de modo que não era esperado que o período de exposição avaliado neste

estudo, 3 ou 10 dias, provocasse quaisquer alterações morfológicas nos espermatozoides.

No que se refere a 3 noites vs. 10 noites de exposição, a diferença na percentagem de espermatozoides anormais pode ser explicada pela fisiologia do rato. Os tratamentos de 3 ou 10 dias realizadas neste trabalho não causaram anomalias morfológicas, porém, os espermatozoides podem levar até uma semana para se deslocar dos túbulos seminíferos nos testículos para a cauda do epidídimo e durante todo este tempo eles permanecem vulneráveis à exposição à RF-EMR (TURNERR, 1995) e este efeito é visível apenas no grupo exposto durante 10 dias.

Alguns pesquisadores acreditam que os efeitos da exposição à radiação emitida por telefones móveis podem ser devido aos efeitos cumulativos do calor gerado e da RF-EMR emitida, enquanto alguns têm sugerido que a contribuição do componente não-térmico é mínima (BLACK et al., 2003; MELTZ et al., 2003). No entanto, outros pesquisadores têm demonstrado que a radiação emitida por celulares tem efeitos não térmicos (LESZCZYNSKI et al., 2002; FRIEDMAN et al., 2007). Em nosso estudo, os animais foram mantidos em gaiolas especiais, em que o telefone celular foi mantido dentro de um tubo de PVC instalado na gaiola para evitar o contato direto dos animais com o telefone e permitir seu movimento livre; além disso, as gaiolas foram mantidas em ambientes bem ventilados. A temperatura ambiente foi medida e as temperaturas no interior das gaiolas dos grupos controle e exposto, bem como a temperatura dos animais após exposição, o que confirmou a ausência de aumento de temperatura devido exposição (Figura 13). Em contraste com as mensurações feitas por Dasdag et al. (1999), não houve diferença significativa na temperatura entre grupos expostos e controles.

Diante de todas as informações aqui tratadas, são necessários estudos mais detalhados para maior entendimento dos mecanismos envolvidos nos danos ao DNA e na modificação da concentração e vitalidade do sêmen.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a radiação eletromagnética de radiofrequência emitida por telefones móveis afeta a qualidade dos espermatozoides. Os dados apresentados são consistentes com estudos previamente publicados, demonstrando efeitos adversos da RF-EMR e validando a observação de que o uso de telefones celulares pode desempenhar um importante papel na redução do potencial de fecundidade dos espermatozoides. Este estudo tem implicações adicionais no que diz respeito à saúde e segurança do uso extensivo de telefones móveis por homens em idade reprodutiva, enfatizando a relevância clínica e biológica desses achados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVISORY GROUP ON NON-IONISING RADIATION, HEALTH PROTECTION AGENCY. 2012. Health Effects from Radiofrequency Electromagnetic Fields. **RCE**, **20**.

AGARWAL, A.; DEEPINDER, F.; SHARMA, R.K.; RANGA, G.; LI, J. 2008. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. **Fertility and Sterility**, **89(1)**:124-128.

AGARWAL, A.; DESAI, N.R.; MAKKER, K.; VARGHESE, A.; MOURADI, R.; SABANEQH, E.; SHARMA, R. 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. **Fertility and Sterility**, **92(4)**:1318-1325.

AGÊNCIA NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES (ANATEL). 2014. Anatel dados. Disponível em: <<http://www.anatel.gov.br/Portal/exibirPortalInternet.do>> Acesso em: 19 jan. 2014.

AITKEN, R.J.; BENNETTS, L.E.; SAWYER, D.; WIKLENDT, A.M.; KING, B.V. 2005. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. **International Journal of Andrology**, **28(3)**:171-179.

AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N.; MCLACHLAN, R.I. 2008. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, **32(1)**:46-56.

AITKEN, R.J.; KOOPMAN, P.; LEWIS, S.E.M. 2004. Seeds of concern. **Nature**, **432(7013)**:48-52.

AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; CURRY, B.J.; BAKER, M.A. 2003. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, **9(11)**:645-661.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J. 2004. Molecular Biology of the Cell. 4^a ed. New York: Garland Science.

ALDAD, T.S.; GAN, G.; GAO, X.; TAYLOR, H.S. 2012. Fetal radiofrequency radiation exposure from 800–1900 MHz-rated cellular telephones affects neurodevelopment and behavior in mice. **Science Reports**, **2**:312.

ARENDASH, G.W.; MORI, T.; DORSEY, M.; GONZALEZ, R.; TAJIRI, N.; BORLONGAN C. 2012. Electromagnetic treatment to old Alzheimer's mice reverses b-amyloid deposition, modifies cerebral blood flow, and provides selected cognitive benefit. **PLoS ONE**, **7(4)**:e35751.

ARENDASH, G.W.; SANCHEZ-RAMOS, J.; MORI, T.; MAMCARZ, M.; LIN, X.; RUNFELDT, M.; WANG, L.; ZHANG, G.; SAVA, V.; TAN, J.; CAO, C. 2010. Electromagnetic field treatment protects against and reverses cognitive impairment in Alzheimer's mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, **19**:191-210.

BEHARI, J. 2010. Biological responses of mobile phone frequency exposure. **Indian Journal of Experimental Biology**, **48(10)**: 959-981.

BEHARI, J.; KESARI, K.K. 2006. Effects of microwave radiations on reproductive system of male rats. **Embryo Talk**, **1**:81-85.

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

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

CAIRES, L.C.J.; GOULART, E.S.G.; 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 1.8ghz radiofrequency electromagnetic radiation. **Neurological Research**, In Press.

CAIRES, L.C.J.; MUSSO, C.M.; GOULART, E.S.G.; SANTOS, T.R.; GOULART, J.T.; KITAMURA, F.C.; SANTOS, M.O.; MENDONÇA, J.P.R.F.; GARCIA, R.M.G. Effects of radiofrequency electromagnetic radiation from mobile phones (1800 MHz) on the ERK1/2 pathway of pituitary cells in rats. **Resultados não publicados**.

CARAGLIA, 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 induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. **Journal of Cell Physiology**, **204(2)**:539-548.

CHAUHAN, V.; MARIAMPILLAI, A.; GAJDA, G.B.; THANSANDOTE, A.; McNAMEE, J.P. 2006. 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(5)**:347-354.

DASDAG, S.; AKDAG, M.Z.; ULUKAYA, E.; UZUNLAR, A.K.; YEGIN, D. 2008. Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats. **Archives of Medical Research**, **39(1)**:40-44.

DASDAG, S.; AKDAG, Z.M.; AKSEN, F.; YILMAZ, F.; BASHAN, M.; DASDAG, M.M.; CELIK, S.M. 2003. Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. **Bioelectromagnetics**, **24(3)**:182-188.

DE IULLIS, G.N.; NEWHEY, R.J.; KING, B.V.; AITKE, R.J. 2009. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. **PLoS One**, **4(7)**:e6446.

DE SEZE, R.; AYOUB, J.; PERAY, P.; MIRO, L.; TOUITOU, Y. 1999. Evolutions in humans of the effects of radiocellular telephones on the circadian patterns of melatonin secretion, a chronobiological rhythm marker. **Journal of Pineal Research** **27**:237-42.

DEEPINDER, F.; MAKKER, K.; AGARWAL, A. 2007. Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. **Reproductive BioMedicine Online**, **15(3)**:266-270.

DJERIDANE, Y.; TOUITOU, Y.; DE SEZE, R. 2008. Influence of electromagnetic fields emitted by GSM-900 cellular telephones on the circadian patterns of gonadal, adrenal and pituitary hormones in men. **Radiation Research** **169**:337-343.

DRAGICEVIC, N.; BRADSHAW, P.C.; MAMCARZ, M.; LIN, X.; WANG, L.; CAO, C.; ARENDASH, G.W. 2011. Long-term electromagnetic field treatment enhances brain mitochondrial function of both Alzheimer's transgenic mice and normal mice: a mechanism for electromagnetic field-induced cognitive benefit? **Neuroscience**, **185**:135-149.

EROGUL, O.; OZTAS, E.; YILDIRIN, I.; KIR, T.; AYDUR, E.; KOMESLI, G.; IRKILATA, H.C.; IRMAK, M.K.; PEKER, A.F. 2006. Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study. **Archives Medical Research**, **37(7)**:840-843.

EŞMEKAYA, M.A.; SEYHAN, N.; ÖMEROĞLU, S. 2010. Pulse modulated 900 MHz radiation and apoptosis inducer hypothyroidism in thyroid cells: a light, electron microscopy and immunohistochemical study. **International Journal of Radiation Biology** **86**:1106-1116.

EVENSON, D.P.; WIXON, R. 2006. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. **Reproductive BioMedicine Online**, **12**:466-472.

FALZONE, N.; HUYSER, C.; BECKER, P.; LESZCZYNSKI, D.; FRANKEN, D.R. 2011. The effect of pulsed 900-MHz GSM mobile phone radiation on the acrosome reaction, head morphometry and zona binding of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, **34(1)**:20-26.

FEJES, I.; ZÁVACZKI, Z.; SZOLLOSI, J.; KOLOSZÁR, S.; DARU, J.; KOVÁCS, L.; PÁL, A. 2005. Is there a relationship between cell phone use and semen quality? **Archives Andrology**, **51(5)**:385-393.

FRIEDMAN, J.; KRAUS, S.; HAUPTMAN, Y.; SCHIFF, Y.; SEGER, R. 2007. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. **Biochemistry Journal**, **405(3)**:559-568.

GARAJ-VRHOVAC, V.; HORVAT, D.; KOREN, Z. 1990. The effect of microwave radiation on the cell genome. **Mutation Research**, **243(2)**:87-93.

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 Cell Physiology**, **192(1)**:16-22.

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

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.

HARDELL, L.; CARBERG M.; SODERQVIST, F.; MILD, K.H.; MORGAN L.L. 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or = 10 years. **Occupational and Environmental Medicine**, **64**:626.

HARDELL, L.; CARBERG, M.; MILD, K.H. 2009. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. **Pathophysiology**, **16**:113.

HONDOU, T. 2002. Physical validity of assumptions for public exposure to mobile phones. **Journal of the Physical Society of Japan**, **71(12)**:3101-3102.

HONDOU, T. Rising level of public exposure to mobile phones: accumulation through additivity and reflectivity. 2002. **Journal of the Physical Society of Japan** **71(12)**:432-435.

HUCKINS C. 1965. Duration of spermatogenesis in pre and postpuberal Wistar rat. **Anatomical Record**, **151(3)**:364.

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.

KESARI, K.K.; BEHARI, J. 2011a. 900-MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain. **Electromagnetic Biology and Medicine**, **30**:2019.

KESARI, K.K.; KUMAR, S.; BEHARI, J. 2010. Mobile phone usage and male infertility in Wistar rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, **47**:987-992.

KESARI, K.K.; KUMAR, S.; BEHARI, J. 2011b. Effects of radiofrequency electromagnetic wave exposure from cellular phones on the reproductive pattern in male Wistar rats. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **164(4)**:546-559.

KESARI, K.K.; KUMAR, S.; BEHARI, J. 2012. Pathophysiology of microwave radiation: Effect on rat brain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **166**:379.

KESARI, K.K.; SIDDIQUI, M.H.; MEENA, R.; VERNA, H.N.; KUMAR, S. 2013. Cell phone radiation exposure on brain and associated biological systems. **Indian Journal of Experimental Biology**, **51**:187-200.

KHILLARE, B.; BEHARI, J. 1998. Effect of amplitude modulated radio frequency radiation on reproduction pattern in rats. **Electro and Magnetobiology**, **17**:43-55.

KILGALLON, S.J.; SIMMONS L.W. 2005. Image content influences men's semen quality. **Biological Letters**, **1(3)**:253-255.

KIM, H.S.; PAIK, M.J.; KIM, Y.J.; LEE, G.; LEE, Y.S.; CHOI, H.D.; KIM, B.C.; PACK, J.K.; KIM, N.; AHN, Y.H. 2013. Effects of whole-body exposure to 915 MHz RFID on secretory functions of the thyroid system in rats. **Bioelectromagnetics**, **34**:521-529.

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.

KOPPENOL, W.H.; MORENO, J.J.; PRYOR, W. A. ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J.S. 1992. Peroxynitrite a cloaked oxidant formed binitric oxide and superoxide. **Chemical Research in Toxicology**, **5**:834.

KOPPERS, A. DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M. McLAUGHLIN, E.A.; AIKTEN, R.J. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **93(8)**:3199-3207.

KOYU, A.; CESUR, G.; OZGUNER, F.; AKDOGAN, M.; MOLLAOGLU, H.; OZEN, S. 2005. Effects of 900 MHz electromagnetic field on TSH and thyroid hormones in rats. **Toxicology Letters** **157**:257-262.

LA VIGNERA, S.; CONDORELLI, R.A.; VICARI, E.; D`AGATA, R.; CALOGERO, A.E. 2012. Effects of the exposure to mobile phones on male reproduction: a review of the literature. **Journal of Andrology**, **33(3)**: 350-356

LAI, H.; SINGH, N.P. 1996. Single and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. **International Journal of Radiation Biology**, **69(4)**:513-521.

LAI, H.; SINGH, N.P. 1997. Melatonin and N-tert-butyl-alpha-phenyini-trone block 60-Hz magnetic field-induced DNA single and double strand breaks in rat brain cells. **Journal of Pineal Research**, **22(3)**:152-162.

LEE, J.; AHN, S.S.; JUNG, K.C.; KIM, Y.W.; LEE, S.K. 2004. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. **Asian Journal of Andrology**, **6(1)**:29-34.

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(2-3)**:120-129.

LEWIS, S.E.; AITKEN, R.J. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell Tissue Research**, **322(1)**:33-41.

MAILANKOT, M.; KUNNATH, A.P.; JAYALEKSHMI, H.; KODURU, B.; VALSALAN, R. 2009. Radio frequency electromagnetic radiation (RF-EMR) from GSM (0.9/1.8GHz) mobile phones induces oxidative stress and reduces sperm motility in rats. **Clinics**, **64(6)**:561-565.

MANN, K.; WAGNER, P.; BRUNN, G.; HASSAN, F.; HIEMKE, C.; ROSCHKE, J. 1998. Effects of pulsed high frequency electromagnetic fields on the neuroendocrine system. **Neuroendocrinology** **67**:139-144.

MARQUES, R.M.; OSHIO, L.T. 2009. Técnica de coleta e contagem de espermatozoides em roedores. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, **1**:34.

MAUSSET-BONNEFONT, A.L.; HIRBEC, H.; BONNEFONT, X.; PRIVAT, A.; VIGNON, J.; DE SEZE, R. 2004. Acute exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain. **Neurobiology**, **17**:445.

McLACHLAN, R.I.; DE KRETZER, D.M. 2001. Male infertility: the case for continued research. **Medical Journal of Australia**, **174**:116-117.

MELTZ, M.L. Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation. 2003. **Bioelectromagnetics**, **6**:196-213.

MORETTI, D.; GARENNE, A.; HARO, E.; GANNES, F.P.; LAGROYE, I.; LÉVÊQUE, P.; VEYRET, B.; LEWIS, N. 2013. In vitro exposure of neuronal networks to a GSM-1800 signal. **Bioelectromagnetics**, **34**:571-578.

NAKATANI-ENOMOTO, S.; FURUBAYASHI, T.; USHIYAMA, A.; GROISS, S.J.; UESHIMA, K.; SOKEJIMA, S.; SIMBA, A.Y.; WAKE, K.; WATANABE, S.I.; NISHIKAWA, M.; MIYAWAKI, K.; TAKI, M.; UGAWA, Y. 2013. Effects of electromagnetic fields emitted from W-CDMA-like mobile phones on sleep in humans. **Bioelectromagnetics**, **34**:589-598.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). 2011. 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. 8^a ed., Washington, D.C.: National Academies Press.

NISBET, H.O.; NISBET, C.; AKAR, A.; CEVIK, M.; KARAYIGIT, M.O. 2012. Effects of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9 GHz) on testicular function and structure in growing rats. **Research in Veterinary Science**, **93**:1001-1005.

OGER, I.; DA CRUZ, C.; PANTEIX, G.; MENEZO, Y. 2003. Evaluating human sperm DNA integrity: relationship between 8-hydroxydeoxyguanosine quantification and the

sperm chromatin structure assay. **Zygote**, **11(4)**:367-371.

PAULRAJ, R.; BEHARI, J. 2006a. Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. **Mutation Research**, **596**:76.

PAULRAJ, R.; BEHARI, J. 2006b. Protein kinase C activity in developing rat brain cells exposed to 2.45 GHz radiation. **Electromagnetic Biology and Medicine**, **25**:61.

PAULRAJ, R.; BEHARI, J.; RAO, A.R. 1999. Effect of amplitude modulated RF radiation on calcium ion efflux and ODC activity in chronically exposed rat brain. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, **36**:337-340.

PINHEIRO, L.S.; MELO, A.D.; ANDREAZZI, A.E.; CAIRES, L.C.J.; COSTA, M.B.; GARCIA, R.M.G. 2010. Protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, **37(4)**:117-127.

POLK, C.; POSTOW, E. 1996. Handbook of biological effects of electromagnetic fields. 2^a ed., CRC Press.

ROSSELL, M.; DUBEY, R.K.; IMTHURS, B.; MACASE, E.; KELLER, P.J. 1992. Effect of nitric oxide on human spermatozoa evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. **Human Reproduction**, **10**:1786.

RUBINFELD, H.; SEGER, R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. **Molecular Biotechnology**, **31(2)**:151-174.

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

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

SKAKKEBAEK, N.E.; JORGENSEN, N.; MAIN, K.M.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; LEFFERS, H.; ANDERSSON, A.M.; JUUL, A.; CARLSEN, E.; MORTENSEN, G.K.; JENSEN, T.K.; TOPPARI, J. 2006. Is human fecundity declining? **International Journal of Andrology**, **29(1)**:2-11.

Turner TT. 1995. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. **Journal of Andrology**, **16**:292-298.

WDOWIAK, A.; WDOWIAK, L.; WIKTOR, H. 2007. Evaluation of the effect of using mobile phones on male fertility. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, **14(1)**:169-172.

WEN, X.H.; YANG, Z.W. 2000. Quantitative study on the spermatozoal storage capacity of epididymis in rats and monkeys. **Asian Journal of Andrology**, **2**:73.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5^a ed.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2011. Electromagnetic fields and public health: mobile phones. Fact sheet n° 193. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs193/en/>> Acesso em: 10 jan. 2013.

WORTZEL, I.; SEGER, R. 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. **Genes Cancer**, **2(3)**:195-209.

YAN, J.G.; AGRETI, M.; BRUCE, T.; YAN, Y.H.; GRANLUND, A.; MATLOUB, H.S. 2007. Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. **Fertility and Sterility**, **88(4)**:957-964.

YOON, S.; SEGER, R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**, **24(1)**:21-44.

ANEXOS

- Anexo A** Pedido de depósito da patente “Caixa Blindada para Manter e Expor Pequenos Mamíferos de Laboratório à Radiação Eletromagnética”
- Anexo B** Pedido de depósito da patente “Dispositivo Eletrônico Ativador de Aparelhos Emissores de Radiação Eletromagnética”
- Anexo C** Pedido de depósito da patente “Dispositivo Estimulador de Ejaculação para Pequenos Mamíferos de Laboratório”
- Anexo D** Artigo intitulado “Effects of Radiofrequency Electromagnetic Radiation on sperm quality in Wistar rats”