

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A ONDAS DE RADIOFREQUÊNCIA GERADAS
POR UM APARELHO DE TELEFONE CELULAR CONVENCIONAL NA FUNÇÃO
TESTICULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS.**

Autor: Eduardo Porto Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Co-Orientadora: Dra. Marilise Mesquita Horn

Dissertação de Mestrado

2005

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A ONDAS DE RADIOFREQÜÊNCIA GERADAS
POR UM APARELHO DE TELEFONE CELULAR CONVENCIONAL NA FUNÇÃO
TESTICULAR DE RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Médicas

Autor: Eduardo Porto Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Co-Orientadora: Dra. Marilise Mesquita Horn

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Professor Adjunto Livre-Docente de Urologia da FFFCMPA

Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS

Professor dos Programas de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FFFCMPA

Pesquisador IC do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Co-Orientadora: Dra. Marilise Mesquita Horn

Doutora em Ciências Veterinárias com ênfase em fisiopatologia da reprodução animal pela UFRGS

Pós-doutorado em Medicina Veterinária pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

LOCAIS DE REALIZAÇÃO

- Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica da Pós-graduação da FFFCMPA (Profa. Dra. Claudia Rhoden)
- Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

“Opinions abound where truths are hard to prove”

John W. Duckett

Aos meus pais, Homero e Ivana, minhas bússolas

À amada Luciana, minhas velas, meu porto.

Agradecimentos

Embrenhar-me no mundo do ensino, da pesquisa e da geração de conhecimento foi um sonho que sempre me acompanhou. Este, aliou-se a busca por excelência na minha formação profissional, e trouxe-me a Porto Alegre, centro abrigador dos recursos físicos e humanos que me permitiriam alcançar minhas metas. O horizonte aqui se expandiu. A etapa que ora se encerra, abre-me a possibilidade de agradecer às pessoas que trouxeram valiosas contribuições no percurso da minha formação como urologista, pós-graduando, e especificamente na elaboração desta dissertação.

Ao Professor Doutor Carlos Ary Vargas Souto, chefe do Programa de Residência em Urologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas (FFFCMPA), à época da minha especialização, pelos ensinamentos, pela confiança depositada, e apoio sempre que solicitado.

Ao Professor Doutor Cláudio Teloken, atual chefe do Programa de Residência em Urologia da FFFCMPA, pela energia que transmite ao tratar com seriedade de temas científicos. O convívio com o Professor Teloken estimula e renova, a cada contato, a minha vontade de desenvolvimento profissional.

Aos preceptores do Programa de Residência em Urologia da FFFCMPA: Prof. Dr. Carlos Ary Vargas Souto, Prof. Dr. Claudio Teloken, Prof. Dr. Marco Aurélio Albuquerque, Dr. Paulo Torres, Dr. Paulo Roberto Sogari, Dr. José Francisco Lisboa, Dr. Dante Sicca, Dr. Giovanni Pioner, Dr. Carlos da Ros, Dr. Túlio Grazziotin, Prof. Dr. Ernani Rhoden, Dr. José Carlos Souto, Dr. Alexandre Fornari, Dr. Rafael Dyel e Dr. Rafael Mafessoni, pelo convívio fraterno e dedicada orientação.

À Dra. Marilise Mesquita Horn, co-orientadora desta dissertação, pela ajuda constante em todas as etapas da pesquisa, e pela transmissão de conhecimentos fundamentais na área de reprodução animal, e especificamente na avaliação histológica da espermatogênese, peça chave na composição deste trabalho.

À Profa. Dra. Sandra Costa Fuchs, por liderar com habilidade ímpar e admirável este Programa de Pós-graduação, estando fortemente comprometida com a manutenção do alto padrão científico já conquistado, e na busca seu pelo fortalecimento.

À Profa. Dra. Claudia Rhoden, Professora de Farmacologia e da Pós-Graduação em Ciências Médicas da FFFCMPA, e chefe do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica da FFFCMPA, pela amizade e inestimável auxílio em uma importante etapa da pesquisa, não só cedendo o Laboratório que chefia para a realização da mesma, mas participando de forma ativa, com várias idéias e ensinamentos, em acordo com o seu perfil de pesquisadora experiente e competente.

Aos colegas pesquisadores do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, pelos vários auxílios e fraterna convivência. Em especial aos alunos Lucas Toniolo, Camila Ordakowski de Oliveira, Lucas Pereira Lima e Patrick Teloken, pela diuturna dedicação com que comigo trabalharam, inclusive aos finais de semana.

Aos Pesquisadores: Profa. Dra. Maria Isabel Edelweis, professora adjunta do Departamento de Patologia da UFRGS; Profa. Dra. Carmen Pilla, chefe da Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Profa. Dra. Eliane Dallegrave, professora substituta do Departamento de Farmacologia da UFRGS; doutoranda Cristina Luisa Conceição de Oliveira e seu orientador, Prof. Dr. Luiz Roberto Malabarba, do Instituto de Biociências, Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da UFRGS; doutorando Amâncio Romanelli Ferreira e seu orientador, Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS, Dr. Claudio Enrique Fernández Rodríguez, pesquisador responsável pelo Laboratório de Comunicações Eletro-Óticas do Depto. de Engenharia Elétrica da UFRGS, e Dra. Marilda da Cruz Fernandes, responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Patologia do Centro de Pesquisa e Pós-Graduação Heitor Cirne Lima da FFFCMPA. A estes só posso dizer como me senti bem acompanhado ao

longo desta jornada. Pesquisadores deste calibre são exemplos da potencialidade da Pós-Graduação no Brasil. Agradeço a ajuda, a parceria, e a amizade.

Aos técnicos em histopatologia Neiva Copetti e Jorge Alberto Lopes do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA, pelo cuidadoso e competente trabalho no processamento do material histopatológico.

Aos funcionários do PPG de Ciências Médicas, Leticia Konrath, Vera Suzana Ribeiro e Fagner Sutel de Moura, pela competência e disponibilidade.

À minha querida esposa Luciana, que auxiliou diretamente na realização desta dissertação, não só pelo amor, parceria e compreensão, mas de forma ativa, adivinhando necessidades de ajuda e percorrendo ao meu lado esta importante fase da minha vida.

E a todos os colegas do mestrado, pelo agradável e estimulante convívio.

Agradecimento Especial

Ter vontade, almejar, sonhar, é importante, mas não basta. Para se extrair o máximo do nosso potencial, sobretudo na academia, torna-se fundamental a presença de uma pessoa mais experiente, um tutor, que nos mostre os caminhos e nos auxilie no processo de lapidação. O Professor Doutor Ernani Luis Rhoden exerceu com maestria este papel nos três últimos anos. Mais que isto, virou um bom amigo, o que tornou meu convívio com ele não só muito proveitoso, como extremamente agradável. Inteligente, perspicaz e com uma impressionante capacidade de trabalho, o Professor Ernani é responsável direto pelas minhas conquistas científicas neste período, inclusive pelo meu direcionamento à Pós-graduação. Ao Professor Ernani, meu especial agradecimento, com a certeza de que a parceria constituída, e que vence nesta defesa uma importante etapa, é definitiva, e está apenas começando.

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1. Introdução.....	12
2. Radiofrequência.....	14
3. Física da telefonia móvel.....	17
4. Efeitos biológicos das radiações não-ionizantes.....	21
5. Estudos epidemiológicos	27
6. Avaliação de Toxicidade Testicular	30
7. Efeitos biológicos da RF nos testículos.....	37
OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ARTIGO EM INGLÊS.....	49
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	69

REVISÃO DA LITERATURA

1. Introdução

José acorda todos os dias como de costume ao som da sua rádio FM preferida. Levanta-se, toma banho, esquenta o café em um forno de microondas, acha o controle remoto da TV entre os demais, e assiste ao jornal matinal, antes de partir para mais um dia de trabalho. Fica interessado em uma notícia polêmica em torno da instalação de uma antena de radio-transmissão para acesso à *internet* rápida no seu bairro. No escritório, José já dispõe de tal tecnologia, a qual vê com bons olhos. Também aprecia o sistema *bluetooth*, recém instalado, que eliminou boa parte dos fios de equipamentos eletrônicos da sua sala. Em seguida, José inicia a série de contatos telefônicos que fará ao longo do dia, principalmente via seu inseparável celular, o qual guarda, como de costume, no bolso da frente da sua calça.

Com o caso supracitado, pretende-se ilustrar o cotidiano de um típico executivo, exposto a um ambiente moderno, bombardeado por ondas eletromagnéticas. O progressivo aumento no uso mundial de tecnologias emissoras de radiofrequência, particularmente pelo setor de tele-comunicações, sentiu uma forte explosão nos últimos 15 anos, motivada principalmente pela disseminação do uso de telefones celulares, que adquiriram, rapidamente, notória popularidade.

Em junho de 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou uma previsão da indústria de que, em 2005, 1.6 bilhões de pessoas estariam utilizando celulares em todo o mundo (WHO, 2000). O Brasil encerrará 2005 com mais de 81 milhões de celulares em uso, segundo dados oficiais da Agência Nacional de Telecomunicações (ANATEL) (ANATEL, 2005). Esta marca espantosa, que corresponde a uma densidade de 44 celulares para cada grupo de 100 habitantes, foi alcançada em apenas oito anos de funcionamento da telefonia celular móvel no nosso país. Notadamente, integramos o rol de países nos quais o número de telefones celulares superou o de terminais fixos. Em países como a Suécia já

existem mais telefones desse tipo do que habitantes, pois as pessoas costumam ter um para o trabalho e outro para uso particular. Além disso, é grande a expectativa da indústria que o recente advento dos sistemas de terceira geração estenda ainda mais o uso da tecnologia móvel para várias formas de comunicação, incluindo fax, e-mail e acesso à *internet*. Em uma clara extrapolação do papel para o qual foi originalmente concebida, a telefonia móvel será utilizada como fonte de comunicação, informação e entretenimento.

A revolução da telefonia mundial trouxe consigo a preocupação de que a exposição humana às ondas de radiofrequência (RF) geradas pelos telefones móveis pudesse impor riscos à saúde. De fato, nos últimos anos, pode-se observar um gradativo aumento do interesse e debate público em relação aos riscos do uso indiscriminado dos telefones móveis, com ampla exploração do tema pela mídia (INSKIP *et al.*, 2001). Dado o imenso número de usuários, é evidente que por mais raros que sejam os efeitos adversos oriundos da exposição às microondas dos celulares, estes poderiam ter implicações consideráveis na saúde pública mundial. A exposição cerebral às microondas dos telefones celulares por 25% da população mundial, chegou a ser qualificada como o maior experimento realizado em humanos da história (SALFORD *et al.*, 2003). O efeito dos campos eletromagnéticos sobre a saúde humana, e especificamente da RF oriunda dos telefones celulares, tem sido o foco de inúmeros estudos ao redor do mundo, havendo até 2001 cerca de 6000 publicações (LESZCZYNSKI, 2001; AHLBOM *et al.*, 2004). Entretanto, grupos de diversas nações designados a revisar a literatura sobre o tema concluíram pela falta de evidências científicas confiáveis (LESZCZYNSKI, 2001).

2. Radiofrequência

Radiações eletromagnéticas oriundas de diversas fontes, naturais e artificiais, desempenham importante papel nas nossas vidas. Enxergamos utilizando a faixa do espectro eletromagnético que nossos olhos conseguem detectar, e é dispensável descrever a importância do sol ao nosso planeta e do uso doméstico de diversas fontes de energia para aquecimento.

Ondas ou campos eletromagnéticos (CEM) são forças elétricas e magnéticas geradas por fluxo de eletricidade (corrente elétrica). Toda radiação eletromagnética consiste de campos elétricos e magnéticos oscilantes. Entre as suas características fundamentais, destaca-se a potência, o comprimento de onda e a frequência. Esta última, representa o número de vezes por segundo que as ondas oscilam. Varia de modo inversamente proporcional ao comprimento da onda ($\text{comprimento} = \text{velocidade da luz} / \text{frequência}$), e determina suas propriedades e o uso que podemos fazer dela. Desta maneira, o espectro eletromagnético é dividido, em ordem ascendente de frequência em: frequência extremamente baixa (ELF; < 300Hz); radiofrequência (10 KHz – 300 GHz), microondas (300 MHz – 300 GHz), infravermelho, luz visível, ultravioleta, raios-X, e raio-gama. A potência é expressa em Watts (W), o comprimento de onda em metros, e a frequência é medida em Hertz (Hz), onde 1 Hz representa uma oscilação por segundo. A densidade de potência de uma onda eletromagnética, também chamada de intensidade, é a quantidade de potência que passa por uma área de 1 metro quadrado, medida em W/m^2 . Na medida em que a área de uma esfera que circunda uma fonte eletromagnética aumenta na proporção do quadrado do seu raio, em uma situação ideal (na ausência de objetos próximos, incluindo o solo) a intensidade diminui de acordo com a lei quadrada inversa, ou seja, $1/(\text{distância})^2$ (IEGMP, 2000).

Ondas eletromagnéticas contêm energia, cuja quantidade aumenta de forma proporcional à frequência. Ao passar através da matéria, parte desta energia é absorvida pelos átomos. Radiação iônica é aquela que possui quantidade suficiente de energia para,

ao ser absorvida, produzir íons, ou seja, provocar a perda atômica ou molecular de um ou mais elétrons (quantidade de energia ≥ 1 elétron volt) (IEGMP, 2000). O processo de ionização é sabidamente capaz de produzir alterações moleculares com danos biológicos permanentes, incluindo efeitos deletérios ao DNA (BLETTNER e BERG, 2000). Existe uma importante marca no espectro eletromagnético, localizada na frequência ultravioleta, que divide as radiações em ionizantes e não ionizantes. Frequências elevadas, na faixa dos raios X e Gama, possuem energia suficiente para ionizar tecidos, enquanto radiações com frequência mais baixa são não ionizantes.

A existência de ondas eletromagnéticas foi prevista em 1864 pelo físico inglês James C. Maxwell. Em 1887, o físico alemão Heinrich Hertz comprovou as equações de Maxwell, e demonstrou que ondas da luz visível e ondas eletromagnéticas eram idênticas. Guglielmo Marconi, um inventor italiano, realizou em 1895 a primeira transmissão de voz criando o que ficou conhecido como transmissão via rádio, feito que lhe rendeu o prêmio Nobel da física em 1909. A partir destas descobertas, a utilização da radiofrequência (RF) como meio de comunicação cresceu vertiginosamente. Atualmente, é empregada em estações de rádio AM e FM, televisão, diversos sistemas de comunicação, em submarinos, na navegação, via satélite, em radares, e mais recentemente, em telefones celulares, redes locais sem fio (*wireless local area network, WLAN*), e redes pessoais sem fio (*bluetooth*).

Uma onda de RF que é utilizada para comunicação é referida como onda carreadora. A informação que é carregada – voz, dados de informática, etc – tem que ser adicionada de alguma forma, um processo chamado de modulação. Quando são utilizadas variações na característica da RF análogas ao sinal elétrico que as originou, o sistema é dito analógico. São exemplos as radiodifusões moduladas pela amplitude (AM) e pela frequência (FM). Quando o sinal elétrico é transformado em sinais binários (zero e um), o sistema é dito digital, que emprega, entre possíveis tecnologias, modulação por fase.

Além do uso na comunicação, escapa ao alcance desta revisão a ampla variedade de aplicações modernas das RFs, desde fornos de microondas, a equipamentos médicos e industriais. Entretanto, é válido lembrar que exposição ocupacional à RF pode ocorrer a

trabalhadores engajados em um grande número de processos industriais, particularmente nos que utilizam aquecedores dielétricos para laminação de madeira, selamento de embalagens plásticas, e aquecedores indutivos industriais (AHLBOM *et al.*, 2004). Também estão sob risco de altos níveis de exposição trabalhadores de indústrias de radiodifusão, e militares que trabalham em proximidade a antenas de transmissão e radares.

Uma questão importante é o fato de que pouco se conhece a respeito da exposição populacional às diversas fontes de RF, e menos ainda acerca da importância relativa das diferentes fontes. Numa casa típica, a exposição pode vir de fontes externas, como estações base de TV, rádio e telefonia móvel, os campos de frequência extremamente baixa (ELF, 3 – 30 Hz) de linhas de transmissão de energia, bem como de fontes internas, como um forno de microondas defeituoso, redes pessoais sem fio, telefones sem fio ou do uso de telefones celulares.

Transmissores de rádio e TV têm uma ampla área de cobertura, necessitando operar em níveis altos de potência, de até aproximadamente 1 MW (AHLBOM *et al.*, 2004). Embora estes transmissores possam gerar um campo de alta intensidade no nível do solo embaixo deles, a maioria está estrategicamente localizada em áreas elevadas e pouco povoadas, reduzindo sobremaneira a exposição populacional.

3. Física da telefonia móvel

Os primeiros sistemas de telefonia móvel foram desenvolvidos nos Estados Unidos, e começaram a operar em 1983. De lá para cá houve um enorme crescimento na utilização da RF como fonte de comunicação. Além disso, houve uma mudança contínua na frequência utilizada e variedade de aplicações.

A telefonia móvel baseia-se em uma comunicação de rádio de duas vias, entre um aparelho portátil e a estação rádio base (ERB) mais próxima. Cada ERB serve uma “célula”, que pode variar algumas centenas de metros de extensão em áreas densamente povoadas, até a vários quilômetros, em áreas rurais (Figura 1). As ERBs são responsáveis pela intercomunicação com a Central de Comutação e Controle, que interliga o usuário com as demais operadoras, de telefonia móvel e fixa. Os princípios fundamentais do funcionamento da telefonia móvel da maneira como é hoje concebida, são a reutilização e o compartilhamento de canais. Um canal é formado por duas frequências distintas, que permitem ao usuário falar e ouvir ao mesmo tempo. Uma empresa concessionária de telefonia móvel ganha o direito de explorar uma faixa (banda) do espectro eletromagnético com um número restrito de canais. A única forma de atender a milhares de pessoas, com um número limitado de frequências disponíveis, é fazer com que várias pessoas utilizem as mesmas frequências simultaneamente. Isto é possível, graças a implantação de uma ampla rede de ERBs de baixa potência, cada qual servindo a um número limitado de pessoas, utilizando todas as frequências da banda. É importante que sejam de baixa potência, porque desta forma uma ERB não gera interferência nas ERBs vizinhas. Quanto mais densamente povoada uma região, para que não se perca a qualidade do serviço, aumenta-se o número de antenas diminuindo-se a potência de cada uma delas. As ERBs podem ser instaladas em torres, postes, edifícios (“macrocélulas”), ou em lugares menores particularmente povoados, como em estações de metrô (“microcélulas”) ou edifícios comerciais (“picocélulas”). Além disso, os sistemas dispõem de tecnologia de mudança automática de canal se, por exemplo, um celular estiver em um veículo em movimento que se desloque de uma célula a outra.

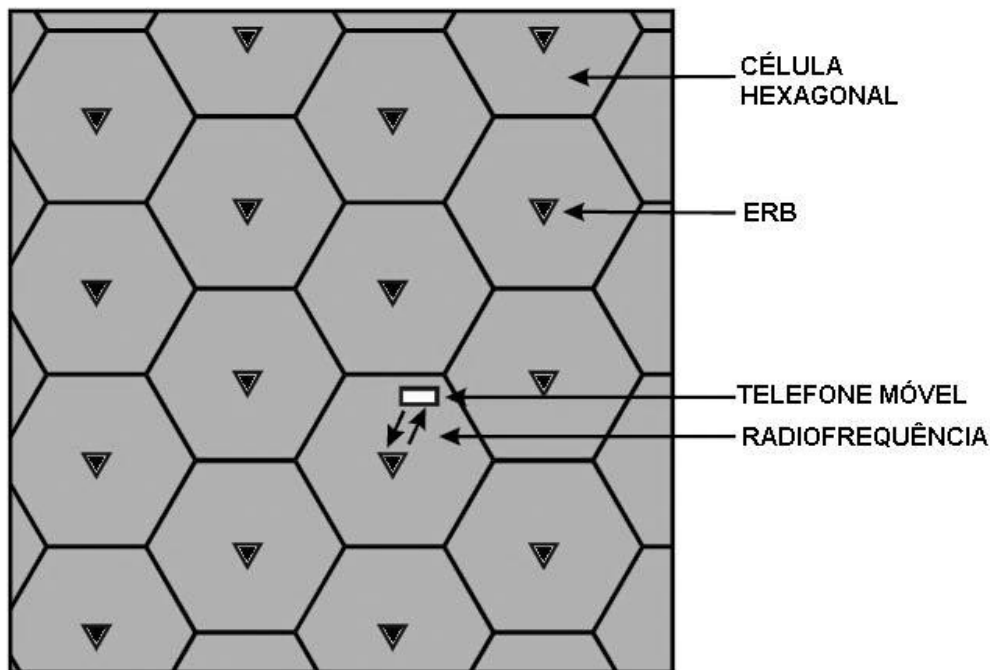


Figura 1: Sistema de Telefonia Móvel (IEGMP, 2000)

Os primeiros sistemas de telefonia móvel implantados eram analógicos (modulados por frequência), operando à frequência de 450 e 900 MHz. A partir dos anos 90, houve uma progressiva substituição por sistemas digitais, que operam em frequências um pouco mais elevadas. Estes sistemas apresentam uma série de vantagens em relação aos primeiros, entre elas menor suscetibilidade à distorção do sinal por interferências, e utilização de diversas tecnologias de modulação, que permitem, em última análise, o compartilhamento de canais, aumentando a capacidade do serviço. Atualmente, está proposta a introdução dos sistemas de terceira geração, que utilizarão o Sistema de Telecomunicação Móvel Universal, com frequência de 1900 – 2200 MHz.

Os telefones celulares modernos são fontes transmissoras e receptoras de radiação eletromagnética não-ionizável do tipo microondas, utilizando frequências que variam de 800 MHz a 250 GHz. Enquanto cada ERB gera em média 60W de potência (raramente mais que 100 W) de feixes de ondas direcionais, os aparelhos celulares irradiam 1 W (900 MHz) a 2 W (1800 MHz) igualmente para todas as direções (HYLAND, 2000; SCHUZ e MANN, 2000).

Ambos, como já mencionado, são considerados transmissores de ondas eletromagnéticas de baixa potência.

Neste contexto, é importante mencionar que a potência da microonda emitida por um telefone celular é extremamente variável. Sistemas analógicos operam em níveis de potência maiores que os digitais, que emitem uma RF com potência média típica de 0,25 W (900 MHz) a 0,125 W (1800 MHz). A exposição verdadeira do usuário, depende também de um número de fatores, como características do telefone, particularmente o tipo e a localização da antena; o jeito que o telefone é manejado; e mais importante, a potência emitida pelo telefone, que pode variar durante a conversação. O motivo principal para que ocorra esta variação, é a existência de uma tecnologia denominada de controle adaptativo da potência. Introduzida para que o telefone trabalhe com a menor potência necessária para a transmissão do sinal dentro de uma faixa de perda aceitável e pré-definida, permite uma variação da potência emitida em até 1000 ordens de magnitude. Fatores que influenciam o controle da potência adaptativa, incluem a distância da ERB, o número de celulares em atividade na mesma região, e as condições gerais de tráfego da RF. Desta forma, a potência tem que ser maior em áreas rurais (mais distantes) e em áreas de grande utilização, nas quais os aparelhos celulares podem ter que operar nos níveis superiores de potência em mais da metade do tempo (AHLBOM *et al.*, 2004). Além disso, para compensar o efeito de escudo de diversos materiais, a densidade de potência gerada pelos telefones pode ter que aumentar de 1 a 100 vezes quando em ambientes fechados em comparação aos abertos (AHLBOM *et al.*, 2004). A exposição pode também variar bastante conforme a localização dentro de um mesmo ambiente, sendo normalmente duas vezes maior e mais variável nos andares superiores dos edifícios que nos inferiores (ANGLESIO *et al.*, 2001). Há um padrão diurno típico de uso em dois picos, das 10:00 às 13:00 e das 18:00 às 22:00hs, que faz com que a potência emitida nestes períodos seja maior (SILVI, ZARI e LICITRA, 2001). Entretanto, mesmo considerando todas as tecnologias descritas, um estudo italiano recente utilizando telefones modificados para manter registro contínuo da potência emitida demonstrou que, na maior parte do tempo, os telefones operam em uma faixa de

intensidade muito próxima do limite máximo permitido (ARDOINO, BARBIERI e VECCHIA, 2004).

Uma importante técnica de modulação dos telefones celulares digitais é o chamado Acesso Múltiplo por Divisão do Tempo (*Time Division Multiple Access*, TDMA), que permite que 8 usuários utilizem um mesmo canal ao mesmo tempo. Cada 4.6 milissegundo (ms) de informação (binária) é compactado e transmitido em pulsos de 0.58 ms. A frequência destes pulsos é de 217 Hz (1 / 4.6 ms) (IEGMP, 2000). Além disso, alguns telefones celulares digitais dispõem de uma tecnologia chamada transmissão descontínua (*Discontinuous transmission*, DTX), que se refere ao fato de o telefone emitir estes pulsos em frequências ainda menores quando não há transmissão sonora de dados (quando a pessoa não está falando) (IEGMP, 2000).

Conforme já mencionado, a popularização da telefonia celular aumentou sobremaneira a taxa de RF do meio ambiente, principalmente urbano. Para se ter uma idéia da importância das ERBs da telefonia móvel como fontes transmissoras de RF, a intensidade total delas proveniente é levemente superior a intensidade de todas as outras fontes de RF combinadas. Entretanto, em situações ocupacionais, exposições bem maiores podem ocorrer. Operadores de radares da marinha, por exemplo, chegam a ficar expostos a intensidades superiores a 1000 W/m^2 (GROVES *et al.*, 2002).

4. Efeitos biológicos das radiações não-ionizantes

Como já ressaltado, os níveis de energia associados à RF não são grandes o bastante para provocar ionização. Entretanto, isto não significa dizer que as ondas de RF sejam inertes do ponto de vista da produção de efeitos biológicos. Por exemplo, ondas de maior intensidade podem gerar calor e provocar dano tecidual, fato de fácil comprovação ao se observar os efeitos de um forno de microondas.

Os mecanismos biofísicos da produção de efeitos biológicos das RF podem ser agrupados em dois tipos principais: térmicos (atribuíveis à produção de calor) e não térmicos (atribuíveis à interação direta do campo eletromagnético no tecido) (BLETTNER e BERG, 2000).

Efeitos térmicos ocorrem devido à absorção da energia eletromagnética nos tecidos, através da vibração das moléculas de água e dos íons nela dissolvidos. A força gerada pelo campo elétrico mobiliza os íons do tecido, gerando uma corrente elétrica oscilante. Além disso, moléculas dipolares como a água, normalmente com orientação espacial randômica, tendem a sofrer movimento de rotação, ficando alinhadas no sentido do campo elétrico. A resistência elétrica e a viscosidade do tecido são responsáveis pelo seu aquecimento (IEGMP, 2000). Em um ser vivo, a quantidade de calor produzida depende não só da intensidade da radiação e das propriedades elétricas da biomassa mas também da eficiência dos mecanismos de termorregulação. Efeitos à saúde, classicamente, podem ocorrer após elevação da temperatura tecidual em aproximadamente 1°C (HYLAND, 2000). A RF pode ser classificada, para fins de pesquisa, em relação a sua intensidade, em nível alto, intermediário, e baixo. O primeiro provoca aumento de temperatura, no segundo os efeitos térmicos são compensados pela termorregulação, enquanto no terceiro a RF não é intensa o suficiente para provocar aquecimento (REPACHOLI, 1998). Os limites de segurança propostos pelas agências que regulam a emissão de ondas eletromagnéticas não ionizantes, em conjunto com a OMS, são baseados em critérios térmicos. Estas agências impõem limites de segurança no que diz respeito à energia emitida por aparelhos

eletrônicos, e à absorção corporal dessa energia, indicada pela taxa de absorção específica (*Specific Absorption Rate, SAR*) – medida em watts por Kilograma (W/Kg).

A SAR depende da densidade de potência da onda eletromagnética e das características do tecido no qual a radiação incide. SAR média é definida como a relação entre a potência total absorvida pelo exposição de corpo inteiro e a sua massa. Para exposições localizadas, como por exemplo à cabeça dos usuários de telefones celulares, utiliza-se o termo SAR local, que é calculada para cada grama de tecido em questão. No que tange a energia emitida pelos celulares, o limite de segurança estabelecido pela Comissão Internacional de Proteção à Radiação Não Ionizante (*International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, ICNIRP*) para SAR média foi de 0.08 W/Kg, e SAR localizada (para cada grama de tecido) foi de 1,6W/Kg (ICNIRP, 1998). Este resultado foi obtido após inúmeros estudos que estabeleceram a intensidade necessária para elevar a temperatura do corpo humano em 1°C, e dividiram-na por um fator de segurança de 50 vezes. O limite imposto pela ANATEL (resolução N° 303) para SAR média é também de 0.08 W/Kg. Para SAR localizada na cabeça e no tronco é de 2 W/Kg, e nos membros, de 4 W/Kg. Quando avaliada pela intensidade do campo elétrico, o limite de exposição de segurança estabelecido pela ANATEL (resolução N° 303) é de $1,375 f^{1/2}$, onde f é a frequência utilizada pelo equipamento (ANATEL, 2005). Desta forma, um equipamento que opere com uma RF de 1900 MHz, por exemplo, terá imposto o limite máximo de 51 volts / metro. Efeitos biológicos térmicos iniciam ao redor de 100 volts / metro. Várias investigações para estimar a taxa de deposição de calor na cabeça durante o uso de telefones celulares foram realizadas, indicando que para a maioria dos aparelhos as orientações de segurança não são violadas (HYLAND, 2000). É interessante ressaltar que, durante uma conversa normal, a absorção da RF é máxima no lado da cabeça no qual o telefone celular é colocado, diminuindo para 1/100 do lado oposto da cabeça (AHLBOM *et al.*, 2004). Entre as áreas mais vulneráveis do corpo ao dano térmico da energia eletromagnética destacam-se os olhos e os testículos, e a formação de catarata e a diminuição da contagem espermática

são riscos da exposição aguda muito bem documentados (LIPMAN, TRIPATHI e TRIPATHI, 1988; ICNIRP, 1998).

Os mecanismos do dano biológico térmico estão relativamente bem estabelecidos e compreendidos. Em situações de exposição à RF de baixa intensidade, estes mecanismos não podem ser aplicados, porque neste caso, os efeitos eletrodinâmicos desencadeados pela RF são menores que a agitação térmica randômica (motilidade Browniana) naturalmente presente nos tecidos (“ruído térmico”) (CHALLIS, 2005). Entretanto, as ondas de RF têm outras características, além da intensidade, que podem exercer influência em organismos vivos. O corpo humano, por exemplo, pode ser considerado um instrumento eletroquímico de extraordinária sensibilidade, cujo bom funcionamento e controle são apoiados por processos elétricos oscilantes de diversos tipos, cada um caracterizado por uma frequência específica, algumas das quais são bem próximas das utilizadas na telefonia móvel (HYLAND, 2000). É bastante conhecida a proibição do uso dos telefones celulares em aeronaves e hospitais para evitar interferência nas operações de equipamentos eletrônicos sensíveis e em dispositivos médicos como marcapassos. Como é inconcebível que esta possível interferência seja desencadeada por efeito de aquecimento, uma outra influência da radiação (efeitos não térmicos) é na realidade considerada responsável. As mesmas considerações poderiam se estender aos organismos vivos, geralmente considerados imunes às influências adversas da radiação dos celulares, desde que respeitados limites que afastem os efeitos térmicos. De fato, os limites de exposição para humanos é de até 10 vezes maior intensidade que o limite aplicado para bens eletrônicos a venda na união européia (ICNIRP, 1998). Um bom exemplo da vulnerabilidade humana à influência eletromagnética não térmica é a habilidade de um lampejo de luz de aproximadamente 15 Hz induzir convulsões em pessoas com epilepsia fotossensível (HYLAND, 2000). A frequência dos lampejos é reconhecida como uma frequência cerebral específica, por similaridade, desencadeando crises convulsivas.

Teoricamente, a RF pode interferir com tecido biológicos por diversos mecanismos: movimentação celular; alterações da atração intercelular; interferência nos canais iônicos da

membrana celular; desnaturação de proteínas; interferência no estado de vibração / coerência quântica em sistemas biológicos como polímeros de DNA e elementos do citoesqueleto celular (modelo de Fröhlich); e produção de radicais livres (IEGMP, 2000; CHALLIS, 2005). O tema é bastante controverso, alguns estudiosos considerando improvável que a exposição à RF em níveis abaixo do limite imposto pela ICNIRP possa desencadear qualquer efeito adverso à saúde humana (MOULDER *et al.*, 1999; PICKARD e MOROS, 2001; ADAIR, 2003). De fato, embora explicações de dano não térmico para efeitos adversos da RF germinem com folga no solo da especulação científica, não há até o presente momento qualquer evidência robusta que sustente esta teoria (IEGMP, 2000). Diversos estudos experimentais demonstraram a existência de efeitos biológicos da RF, tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabela 1). Embora levantem questões potencialmente sérias para a saúde, devem ser interpretados com cautela, até que confirmações consistentes dos seus resultados estejam disponíveis (REPACHOLI, 2001; HABASH *et al.*, 2003). Em contraposição a estes estudos, há diversos experimentos demonstrando ausência de efeitos biológicos da RF de baixa intensidade (UTTERIDGE *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 2004; LAGROYE *et al.*, 2004; SHIRAI *et al.*, 2005). Além disso, é preciso considerar a possibilidade da ocorrência de viés de publicação, onde vários estudos com resultados negativos são rejeitados. Por outro lado, é preciso também estar bastante atento ao poder dos estudos com resultados negativos publicados e à sensibilidade dos parâmetros avaliados. Por fim, mesmo que se prove um efeito biológico não térmico incontestável da RF, haverá a necessidade de se estudar quais suas reais implicações na saúde humana. Em outras palavras, qual a possibilidade de ocorrência de dano biológico, definido com efeito biológico de proporções que ultrapassem o limite de compensação fisiológica do organismo, em detrimento à saúde ou bem estar (REPACHOLI, 2001).

Existe uma característica peculiar nos estudos envolvendo RF, que é uma ampla variedade de características da onda, como frequência, potência, tipo de modulação, variação da potência, tempo de exposição, bem como do órgão ou tecido estudado, como densidade, condutividade, tamanho e posição em relação a estruturas vizinhas. Estes

fatores fazem com que a dosimetria da real quantidade de energia absorvida envolva cálculos complexos que, conforme o modelo utilizado, seja de impossível precisão. Por exemplo, estudos experimentais que envolvam o uso de telefones convencionais, embora tenham o grande mérito de conseguir simular situações de exposição real, encontram muita dificuldade em dosar com precisão a real intensidade da RF em estudo, em função da variabilidade que envolve as taxas de potência emitida pelos aparelhos, conforme já mencionado. Já os estudos observacionais têm, em adição a este problema, a dificuldade de aferir com precisão a taxa de exposição ou de uso dos aparelhos (PARSLOW, HEPWORTH e MCKINNEY, 2003). Sistemas experimentais *in vitro* conseguem obter uma SAR mais bem controlada. Entretanto, os resultados obtidos por estes modelos não refletem o que ocorre ao organismo vivo, porque eliminam parte da capacidade de adaptação fisiológica. Por fim, sistemas *in vivo* que utilizam fontes geradoras controladas de RF podem eliminar parte destes problemas. Não é necessário dizer, entretanto, que nem sempre resultados obtidos em modelos animais podem ser transpostos para humanos.

Tabela 1: Estudos experimentais que demonstram efeitos biológicos da RF

MODELO	EXPOSIÇÃO*	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Ratos	2.45 GHz 0.4 – 0.15 W/Kg	Aumento de 4 vezes na incidência total de tumores (seguimento de 25 meses)	(CHOU <i>et al.</i> , 1992)
Ratos	915 MHz 0.002 – 0.2 W/Kg	Extravazamento de albumina pela barreira hemato-encefálica	(SALFORD <i>et al.</i> , 1994)
Ratos	2.45 GHz 1.2 W/Kg	Efeito genotóxico: Quebra de cadeia de DNA de fita simples e dupla	(LAI e SINGH, 1996)
Ratos	900 MHz 0.13-1.4 W/Kg	Aumento da incidência de linfomas	(REPACHOLI <i>et al.</i> , 1997)
Cultura de linfócitos	837 MHz 1.90 GHz 5 – 10 W/Kg	Efeito genotóxico: aumento da formação de micronúcleos	(TICE <i>et al.</i> , 2002)
Ratos	915 MHz 0.016 – 5 W/kg	Dano neuronal no córtex, hipocampo e gânglios da base	(SALFORD <i>et al.</i> , 2003)
Cultura celular	2.45 GHz 10 W/Kg	Efeito genotóxico: alterações da expressão, com aumento da expressão de genes de apoptose e diminuição de genes da regulação do ciclo celular	(LEE <i>et al.</i> , 2005)

* Freqüência e taxa de absorção específica (SAR)

5. Estudos epidemiológicos

A principal preocupação da maioria dos pesquisadores, acompanhados de uma atenta opinião pública, no que tange os riscos à saúde da exposição crônica à RF dos telefones celulares, é sem sobra de dúvida, a possibilidade do desenvolvimento de tumores cerebrais. Os motivos para o alarme são o fato de a cabeça ser a região de maior exposição localizada, e a ocorrência de casos anedóticos de grandes usuários que morreram de câncer cerebral (TRICHOPOULOS e ADAMI, 2001). Entre outras preocupações encontram-se a formação de neuroma do acústico e de tumores hematológicos (AHLBOM *et al.*, 2004).

Alguns estudos epidemiológicos sobre possíveis danos à saúde da exposição à RF dos telefones celulares foram publicados nos últimos anos (INSKIP *et al.*, 2001; STANG *et al.*, 2001; AUVINEN *et al.*, 2002; HARDELL *et al.*, 2002; MUSCAT *et al.*, 2002; CHRISTENSEN *et al.*, 2004; LONN *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria dos existentes envolve RF oriundas de outras fontes, já utilizadas por mais tempo e com populações específicas de alta exposição, como por exemplo, militares expostos a radares e populações de radio amadores. Estas exposições são das mais variadas em relação à potência, tipo de sinal e localização anatômica de exposição máxima, exigindo máxima cautela na validação externa e extrapolação dos resultados para situações diversas como, por exemplo, o uso de telefones celulares (ROTHMAN, 2000). De forma sucinta pode-se dizer que os estudos mais informativos, levando em consideração aspectos relativos ao tamanho, desenho e qualidade da medida da exposição à RF (AHLBOM *et al.*, 2004), fornecem pouca evidência de um aumento de mortalidade ou incidência de tumores cerebrais ou hematológicos (MILHAM, 1988; MORGAN *et al.*, 2000; GROVES *et al.*, 2002). Uma exceção é a análise de um subgrupo específico da coorte da marinha americana, de técnicos em eletrônica da aviação, que apresentaram risco relativo (RR) significativo de 2.6 para o desenvolvimento de leucemias (GROVES *et al.*, 2002). Entretanto, foi sugerido cautela na apreciação deste resultado, em razão do grande número de subgrupos analisados, ausência de informações

sobre hábitos de vida relevantes como o fumo, e ausência de achados similares em subgrupos igualmente expostos ao fator de risco em estudo (ELWOOD, 2003).

Entre os estudos de caso-controle envolvendo telefones celulares, enquanto alguns não detectaram associação com tumores cerebrais e da cabeça, (INSKIP *et al.*, 2001; MUSCAT *et al.*, 2002; CHRISTENSEN *et al.*, 2004; LONN *et al.*, 2005) em outros a razão de chance variou de 1.3 a 4.6, com riscos maiores para o glioma cerebral (OR: 2.1; IC95%: 1.3 – 3.4), (AUVINEN *et al.*, 2002) neuroma do acústico ipsilateral (OR: 3.5; IC95%: 1.8 – 6.8) (HARDELL *et al.*, 2002) e melanoma uveal (OR: 4.2; IC95%: 1.2 – 14.5) (STANG *et al.*, 2001). Existem várias críticas a estes estudos, que indicam a existência de graves deficiências metodológicas (ELWOOD, 2003). Um grande estudo de coorte prospectivo realizado na Dinamarca, envolvendo 420.000 usuários de telefones celulares por um período de até 15 anos não detectou aumento do risco para qualquer neoplasia, incluindo tumores cerebrais, de glândulas salivares e leucemia (JOHANSEN, 2004). O mesmo estudo conclui que no presente momento existem poucas evidências de que o uso de telefones celulares esteja associado com cânceres em adultos. Por outro lado, mesmo neste grande estudo apenas uma pequena proporção das pessoas avaliadas pertenciam ao grupo exposto por um período prolongado, de forma que o espaço para estudos de segurança em longo prazo ainda não está devidamente preenchido. Por fim, após extensa revisão da literatura disponível, a IEGMP concluiu que as evidências atualmente disponíveis não sugerem que a exposição a RF de baixa intensidade cause câncer, mas que estudos com uso de telefones celulares por períodos mais prolongados ainda são necessários para se excluir com segurança esta possibilidade (IEGMP, 2000).

Entre outros parâmetros de saúde avaliados, destaca-se cefaléia, astenia, perda de memória de curta duração, náusea, alterações de eletroencefalograma, disfunções cerebrais específicas e distúrbios do sono (HERMANN e HOSSMANN, 1997; OFTEDAL *et al.*, 2000). No geral, existem apenas relatos de usuários queixando-se destes sintomas, mais freqüentemente de cefaléia, insônia, zumbido, dificuldade de concentração e distúrbios do sono (REPACHOLI, 1998).

Alguns estudos exploraram o risco de efeitos adversos na gestação em fisioterapeutas que utilizavam microondas no tratamento de seus pacientes. Embora um destes estudos tenha de fato encontrado um maior número de abortos espontâneos em mulheres expostas seis meses antes e três após engravidarem (RR 1.28; IC95% 1.02 – 1.59) (OUELLET-HELLSTROM e STEWART, 1993), vários outros não confirmam este achado (KALLEN, MALMQUIST e MORITZ, 1982; TASKINEN, KYRONEN e HEMMINKI, 1990).

Há também diversos estudos avaliando aumento do risco de câncer de mama, de testículo, melanoma ocular, câncer de pulmão, doenças cardiovasculares e formação de catarata. Nenhum destes parâmetros pôde ser, até hoje, claramente associado à exposição a RF (AHLBOM *et al.*, 2004).

6. Avaliação de Toxicidade Testicular

Nas últimas duas décadas, a comunidade científica mundial assistiu travar-se um polêmico debate sobre uma possível diminuição da fertilidade masculina nos últimos 50 anos, representada por uma piora progressiva da qualidade dos espermogramas registrados no período (CARLSEN *et al.*, 1992). Um grupo de especialistas, que se uniu inicialmente com o declarado intuito de provar o contrário, acabou confirmando o fenômeno, demonstrando uma redução anual de 2,1% na concentração espermática dos parisienses nos últimos 20 anos (AUGER *et al.*, 1995).

Este assunto, ainda não resolvido, acabou por impulsionar uma gama de estudos envolvendo diversos agentes tóxicos possivelmente envolvidos. A presença de estrógenos ambientais representa, ainda hoje, a melhor explicação disponível para a propalada queda da fertilidade masculina (SHARPE *et al.*, 1995). No entanto, vários agentes tóxicos aos testículos foram já descritos, entre medicações, aditivos alimentares, agentes químicos da indústria, solventes e agrotóxicos (CREASY, 1997). Normalmente só se consegue demonstrar de forma objetiva efeitos tóxicos testiculares em estudos com modelos animais. Há dois motivos principais que explicam a dificuldade de se estudar toxicidade testicular em humanos. O primeiro é a falta de parâmetros confiáveis. O espermograma, parâmetro mais utilizado, tem baixa acurácia e reprodutibilidade (coeficiente de variação entre laboratórios de 37,5%), além de enorme variação entre indivíduos férteis (coeficiente de variação de 39%) e entre amostras de diferentes períodos do mesmo indivíduo (NEUWINGER, BEHRE e NIESCHLAG, 1990). O segundo motivo é a dificuldade de se conduzir estudos clínicos controlados que envolvam a coleta de sêmen, exame que costuma encontrar forte resistência para ser realizado (CREASY, 1997).

Durante muito tempo, diversas diretrizes reguladoras de estudos de toxicidade reprodutiva basearam-se na fertilidade (sucesso em atingir gravidez) como o principal índice da função masculina. Posteriormente, ficou demonstrado que a fertilidade, em estudos com modelos animais, é um dos piores marcadores, com sensibilidade extremamente baixa

(TAKAYAMA *et al.*, 1995). Só para se ter uma idéia, é necessário que a contagem espermática de ratos diminua em aproximadamente 90% antes que a fertilidade se altere (RUSSEL *et al.*, 1990). Neste período, a análise histopatológica testicular se firmou como o indicador mais sensível e confiável, capaz de detectar sutis alterações da produção espermática (LINDER *et al.*, 1992; TAKAYAMA *et al.*, 1995; CREASY, 2003). Para tanto, é imprescindível que sejam observadas técnicas adequadas de preparo (fixação, plano de corte, inclusão, coloração) e avaliação histopatológica. Por exemplo, a combinação de fixação em formol e inclusão em parafina, técnica habitualmente empregada na rotina laboratorial, provoca retração (encolhimento) tubular e uma maior distorção tecidual com prejuízo ao detalhamento morfológico, constituindo-se em técnica inadequada (RUSSEL *et al.*, 1990). Entre os fixadores preconizados, destacam-se a solução de Bouin, utilizada para imersão, e a solução de Karnovsky (glutaraldeído e paraformaldeído), tanto para imersão quanto perfusão vascular (KARNOVSKY, 1965). A inclusão em resinas plásticas como o glicol metacrilato fornece resultados bem superiores aos obtidos com parafina, permitindo inclusive análise em microscopia eletrônica. Quanto a coloração, preconiza-se a utilização do ácido periódico de Schiff (PAS), que marca o componente glicoproteico do acrossoma, componente nuclear espermático fundamental para uma análise histológica detalhada, conforme explicado a seguir (RUSSEL *et al.*, 1990).

Espermatogênese é o processo no qual células tronco germinativas diplóides passam por um processo de divisões e diferenciação para formar espermatozóides haplóides. O processo pode ser dividido em três fases: 1) proliferativa, na qual as espermatogônias passam por sucessivas divisões mitóticas até diferenciarem-se em espermatócitos primários; 2) meiótica, na qual um espermatócito primário duplica e recombina o seu material genético, sofre duas divisões meióticas, e dá origem a quatro espermátides redondas haplóides; 3) espermiogênica, na qual as espermátides diferenciam-se em espermatozóides.

Um corte transversal de um túbulo seminífero permite a visualização de diversas camadas concêntricas de células germinativas. As espermatogônias encontram-se

dispostas em contato com a membrana basal. Na medida em que avança o processo de espermatogênese, as células progressivamente se aproximam da luz tubular, até que são liberadas como espermatozóides formados. Uma característica extremamente interessante deste processo é que, sob o comando das células de Sertoli, os tipos celulares das diversas camadas identificadas em um corte transversal avançam de forma sincronizada. Desta forma, é possível descrever associações celulares em fases específicas, dividindo a espermatogênese em estágios. Por convenção, o estágio em que se encontra uma espermátide redonda recém formada – logo após a segunda meiose – é considerado o estágio I. No rato, a espermatogênese foi dividida em 14 estágios, conforme características das espermátides redondas, particularmente de acordo com o grau de desenvolvimento do acrossoma (LEBLOND e CLERMONT, 1952). Após o estágio XIV, o ciclo do epitélio seminífero recomeça, sendo que cada nova camada celular corresponde à camada inferior do ciclo anterior (Figura 2).

A freqüência da existência de um determinado estágio em um corte transversal é proporcional ao tempo em que o mesmo demora a terminar. Assim, por exemplo, enquanto um ciclo completo do epitélio seminífero de um rato Wistar tem duração de 13 dias (312 horas), o estágio VII, um dos mais longos, dura cerca de 56 horas. Logo, este ciclo estará presente em aproximadamente 18% dos túbulos de um corte transversal (56/312) (RUSSEL *et al.*, 1990). O processo de espermatogênese completo em ratos tem duração de aproximadamente 58 dias (4 ½ ciclos).

É recomendado que estudos desenhados no intuito de detectar se há dano testicular presente – em contraposição aos estudos desenhados para caracterizar este dano (*i.e.*, descrever qual tipo celular é afetado) – tenham duração de 6 ciclos do epitélio seminífero (no rato, em torno de 11 semanas). Esta exposição, chamada subcrônica, permite que o agente tóxico se distribua pelos tecidos e afete desde a formação de uma espermatogônia até o momento em que a mesma, após passar por todas as fases de divisão e diferenciação atinja o final do sistema ductal reprodutivo (RUSSEL *et al.*, 1990).

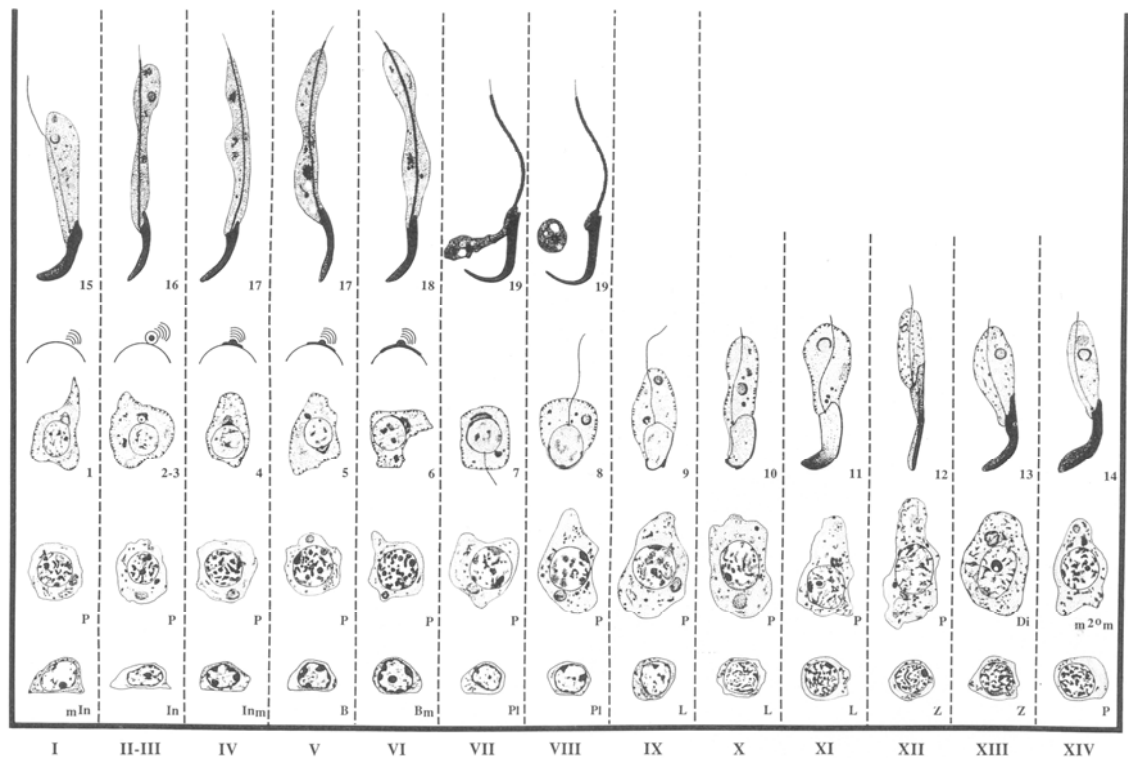


Figure 2. Estágios do ciclo do epitélio seminífero dos ratos (RUSSEL *et al.*, 1990)

O entendimento deste chamado “estagiamento” do epitélio germinativo é extremamente importante para se avaliar de forma acurada um possível dano tóxico aos testículos. No estágio IX, por exemplo, as espermátides alongadas, considerando-se o processo fisiológico normal, já foram liberadas, e as redondas estão recém iniciando o processo de remodelamento para se tornarem um pouco mais achatadas e alongadas. Nesta fase, portanto, só há uma camada de espermátides. Um pesquisador que desconheça a divisão em estágios pode interpretar erroneamente este fato por ausência patológica de um tipo celular. Por outro lado, caso espermátides alongadas estejam presentes nesta fase, isto deve ser na verdade interpretado como atraso na liberação de espermátides ou “retenção de espermátides”, este sim um processo patológico que representa um distúrbio funcional das células de Sertoli (CREASY, 1997). Além disso, o número médio de células de cada tipo em um corte transversal é relativamente constante de acordo com o estágio em que se encontra. É possível, desta forma, realizar contagens de tipos celulares específicos

em determinados estágios em ratos expostos e controles e verificar se houve perda celular (análise quantitativa da espermatogênese) (RUSSEL *et al.*, 1990).

Entre as análises histopatológicas quantitativas, destacam-se:

1. Contagem celular determinada por morfometria – somente através de correções estereológicas de células redondas é possível se obter as contagens celulares verdadeiras em um corte transversal. O número bruto de células contadas varia naturalmente conforme a espessura do corte empregada. A contagem celular verdadeira é obtida através da fórmula de Abercrombie (contagem bruta x [espessura do corte / [espessura do corte + diâmetro nuclear]]). Além disso, é possível corrigir a contagem para uma possível retração de comprimento tubular isolada – sem diminuição de diâmetro – através do fator de correção da célula de Sertoli (contagem verdadeira x [células de Sertoli por túbulo nos animais controle / células de Sertoli por túbulo nos animais tratados]). Por fim, é possível ainda realizar-se contagens celulares totais por testículo, através de cálculos estereológicos um pouco mais complexos (RUSSEL *et al.*, 1990).

2. Razões celulares – normalmente utiliza-se a contagem do tipo celular que se quer averiguar dividido pelo número de células de Sertoli ou de nucléolos de células de Sertoli, que costumam sobreviver mesmo após várias situações que resultam em depleção germinativa.

Análises histopatológicas qualitativas costumam detectar alterações um pouco menos sutis. Pode-se avaliar a presença de infiltração intersticial, vacuolização celular, formação de células gigante multinucleadas, falha da liberação das espermatídes, ausência completa de tipos celulares (culminando com a situação descrita como *Sertoli cell only syndrome*), ausência de luz tubular, aumento no conteúdo lipídico celular, e quebra da barreira hemato-testicular (com presença de células inflamatórias ou hemácias no interior dos túbulos, por exemplo). Em 1970, Johnsen (1970) descreveu um escore no qual classifica os túbulos em uma escala de 1 a 10, conforme a presença das camadas celulares do epitélio seminífero (*i.e.*, 1 = ausência de células; 5 = ausência de espermatozóides ou espermatídes, mas vários espermátócitos presentes; 10 = espermatogênese completa, com

vários espermatozóides). Além de relativamente subjetiva, esta divisão não leva em consideração o conhecimento do estagiamento tubular.

Existem ainda outros parâmetros comumente empregados na avaliação da toxicidade germinativa masculina, com sensibilidades intermediárias entre os estudos reprodutivos e a histopatologia testicular:

1. Pesos dos testículos e epidídimos: costumam ser apresentados tanto em valores absolutos como em relação ao peso corporal total. Embora a variabilidade interindividual seja baixa, alguns fatores como, por exemplo, a presença de infiltrado inflamatório, podem alterar seus valores. Ainda assim, podem ser considerados como tendo boa sensibilidade.

2. Contagem espermática: em cães e coelhos, pode ser avaliada no ejaculado. Em ratos e camundongos, que ejaculam uma pelota endurecida, a contagem espermática é determinada através da análise do homogeneizado do testículo e do epidídimo. No testículo, a técnica é conhecida como “técnica das espermátides resistentes a homogeneização com detergente”. Somente as espermátides alongadas dos estágios VI-VIII permanecem íntegras ao final do processo. Utilizando-se um hematocítmetro, o número de espermátides resistentes é determinado, e o resultado expresso por grama de tecido (RUSSEL *et al.*, 1990). No epidídimo, normalmente utiliza-se o homogeneizado da cauda, por um processo bastante similar. O resultado é expresso em espermatozóides por epidídimo ou por grama de tecido. O maior problema destas contagens, é a grande variabilidade interindividual, em torno de 16% para a contagem de espermátides e de até 29.3% para a de espermatozóides, fato que diminui de forma considerável a sensibilidade deste parâmetro (BLAZAK, ERNST e STEWART, 1985).

3. Morfologia e a motilidade: os espermatozóides podem ser coletados na cauda do epidídimo ou no lavado do ducto deferente. A morfologia espermática, em ratos, é o parâmetro que apresenta a maior variabilidade interindividual. Além disso, é o mais trabalhoso dos três parâmetros da análise seminal. Existem diversas anormalidades morfológicas descritas, embora seja preconizada a classificação em normais e anormais. Por outro lado, a motilidade é o parâmetro espermático que apresenta a menor variabilidade

interindividual (coeficiente de variação de 16%). Apresenta boa sensibilidade e relação com a fertilidade. Em alguns estudos de toxicidade testicular, a motilidade chegou a ser o único parâmetro a se alterar, demonstrando, nestes casos, sensibilidade superior à histopatologia (MANGELSDORF, BUSCHMANN e ORTHEN, 2003). Entretanto, além de ser um critério relativamente subjetivo, pode ser influenciado por fatores como tempo de abstinência, método de coleta e manipulação, temperatura de armazenamento, concentração e meio de diluição e método de contagem (especificamente, tipo de câmara empregada e uso de computador para a contagem) (SEED *et al.*, 1996). Discute-se quais os critérios que melhor refletem o dano espermático, entre velocidade, linearidade ou amplitude do deslocamento da cabeça. De forma simplificada, e no intuito de tornar o método mais objetivo, é bastante usual a descrição dos resultados em porcentagem de espermatozoides móveis.

7. Efeitos biológicos da RF nos testículos

Os testículos são órgãos alvos potenciais para efeitos danosos térmicos da RF. Dentro da fisiologia normal do sistema reprodutivo humano masculino, há um mecanismo de troca de calor entre o plexo venoso pampiniforme e a artéria testicular que propicia aos testículos a manutenção de uma temperatura em média 2°C a 4°C inferior à retal. Alterações neste mecanismo que impeçam um controle de temperatura apropriado, como ocorre, por exemplo, na criptorquidia e na varicocele, estão associadas à disfunção gonadal. Além disso, basta um único episódio febril para que ocorra prejuízo da espermatogênese por um período de até 3 meses. É também conhecido o fato que situações de intensa exposição a calor externo podem prejudicar a espermatogênese (SIGMAN e JAROW, 2002).

Neste contexto, a exposição testicular a diversas fontes de calor, em temperaturas de aproximadamente 42°C, vem sendo estudada como método contraceptivo masculino (CHIANG, 1988; KANDEEL e SWERDLOFF, 1988; LUE *et al.*, 2000). Embora seja uma idéia antiga, simples e promissora, faltam ainda respostas em relação à eficácia, segurança e reversibilidade da manipulação termal da espermatogênese realizada com o intuito de contracepção masculina. Várias fontes de calor externo foram já testadas, desde o simples banho de imersão em água quente ou aplicação de bolsas térmicas, à aplicação de ultrassom e ondas de RF (FAHIM *et al.*, 1975).

Um tema bem mais controverso é a possibilidade de que efeitos biológicos não térmicos da exposição à RF de baixa intensidade possam prejudicar a espermatogênese. Embora o assunto esteja na ordem do dia, entre as preocupações da opinião pública, principalmente após a disseminação do uso dos telefones celulares, a fertilidade masculina recebeu uma atenção discreta da comunidade científica mundial no que tange aos possíveis danos não térmicos da RF. O hábito comum a várias pessoas da utilização do telefone celular preso na cintura e/ou dentro do bolso da calça, faz com que os testículos estejam sob exposição pequena porém constante dos sinais de RF emitidos no modo em espera e no momento do recebimento das chamadas. Dependendo do modo de utilização (*e.g.*, viva

voz) ou do motivo (e.g., internet), os telefones podem ser utilizados em uma maior ou menor distância dos testículos.

Não há até o presente momento nenhum estudo clínico com metodologia minimamente confiável sobre a influência da RF de baixa intensidade na fertilidade masculina. Estudos prévios que avaliaram o espermograma de militares expostos a microondas de diversas fontes e radares, demonstraram resultados controversos. Enquanto três destes estudos observaram piora nos parâmetros seminais dos indivíduos mais expostos, entre diminuição da concentração espermática e porcentagem de formas e motilidade normais (HJOLLUND, BONDE e SKOTTE, 1997; LANCRANJAN *et al.*, 1975; WEYANDT *et al.*, 1996), em outros nenhuma diferença pode ser detectada (SCHRADER *et al.*, 1998; GRAJEWSKI *et al.*, 2000). Infelizmente o controle da real exposição individual à RF, em todos estes trabalhos, é extremamente problemática (AHLBOM *et al.*, 2004).

Em um estudo apresentado em Berlim, em junho de 2004, no Congresso Anual da Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia, recentemente publicado, foi descrita uma relação negativa entre o uso crônico de telefones celulares e a fertilidade masculina (FEJES *et al.*, 2005). Refletindo o imenso interesse e preocupação pública pelo assunto, o trabalho mereceu destaque farto e cobertura sensacionalista da imprensa leiga mundial nas semanas que sucederam o referido congresso. Tratou-se de um estudo transversal em 371 homens com infertilidade conjugal idiopática. A exposição aos telefones celulares foi controlada pelo tempo de posse do telefone e lembrança aproximada da duração média do uso em conversação e em modo espera junto ao corpo. Os principais achados foram uma fraca correlação negativa entre o tempo de aquisição e de uso ativo do aparelho e a porcentagem de motilidade rápida ($r = -0,12$ e $-0,19$, respectivamente; $P = 0,02$) e uma fraca correlação positiva entre estes fatores e a porcentagem de motilidade lenta ($r = 0,12$ e $0,28$, respectivamente; $P = 0,01$). Embora tenha o mérito do levantamento da hipótese, é nítido que há uma lacuna para estudos clínicos com maior rigor metodológico e melhor nível de evidência.

Poucos são os estudos experimentais desenhados especificamente para avaliar a ocorrência de danos testiculares não térmicos da RF de baixa intensidade. Além de controversos, os resultados destes estudos são de difícil comparação, pela existência de inúmeras variações metodológicas. Enquanto alguns utilizam fontes emissoras controladas de RF, outros utilizam telefones celulares convencionais. Há diferenças tanto na frequência e intensidade estudadas, quanto no período de exposição (7 a 60 dias). Mais importante, os parâmetros de toxicidade testicular avaliados costumam ser subjetivos, qualitativos ou mesmo pobremente descritos.

Johnson *et al.* (1984) realizaram um estudo com fonte de exposição controlada, permitindo um cálculo da SAR relativamente preciso, e cuidadoso preparo histológico para avaliação da toxicidade testicular através da contagem histológica da produção de espermatozoides diária potencial, um parâmetro objetivo e bastante sensível. Embora tenham utilizado uma potência relativamente elevada, que resultou em SAR maior que o limite imposto aos telefones celulares (6.3 W/Kg) e conseqüente aumento da temperatura retal (1.5°C em média), não foi verificada nenhuma alteração na espermatogênese. O curto período de exposição, de apenas 9 dias, e o efeito térmico descrito dificultam a interpretação deste achado negativo. Dasdag *et al.* (1999, 2003), em dois estudos com telefone celular convencional, encontraram resultados positivos no primeiro e negativos no segundo. Interessante notar que no primeiro estudo, mesmo com um período de exposição ao telefone celular em conversação extremamente baixo, de apenas 3 minutos por dia, foi observado um aumento da temperatura retal médio de 0.46°C no grupo exposto. A toxicidade testicular foi avaliada por parâmetros espermáticos, diâmetro tubular e escore de Johnsen. No segundo estudo do mesmo grupo, no qual o período de exposição foi aumentado para 20 minutos por dia por 30 dias e foi acrescentada a avaliação da lipoperoxidação testicular pela dosagem de malondialdeído e a análise imunohistoquímica do gene p53, nenhuma alteração testicular pode ser verificada (DASDAG *et al.*, 2003). Os autores não calcularam a intensidade média da RF emitida pelos aparelhos durante o estudo, mas apresentaram um cálculo de SAR impreciso, baseado em uma simulação na

qual a potência média máxima imposta pelos órgãos reguladores foi utilizada. Ozguner *et al.* (2005) basearam sua análise em parâmetros similares, com uma exposição de 30 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 30 dias, encontrando diminuição do diâmetro tubular e espessura do epitélio germinativo no grupo exposto. Haidt e McTighe (1973) utilizaram fonte controlada para exposição por 216 horas em um período de 60 dias. Os autores descrevem a presença de alterações patológicas no grupo exposto, embora não utilizem nenhum parâmetro que as quantifiquem. Rosas *et al.* (2004) não detectaram qualquer alteração histopatológica, embora não descrevam em detalhes quais foram os parâmetros avaliados. Aitken *et al.* (2005) após exposição de 12hs por dia durante 7 dias encontraram um significativo efeito genotóxico em espermatozóides do epidídimo, com dano ao DNA mitocondrial e no locus da β -globina nuclear. Nenhum parâmetro histológico testicular foi avaliado neste estudo.

Por fim, um estudo experimental com o intuito de detectar a ocorrência de dano testicular após exposição à RF gerada por um aparelho celular, que utilize tempo de exposição adequado e parâmetros objetivos, quantitativos e sensíveis, seguindo recomendações consagradas e de consenso para estudos de toxicidade testicular, pode certamente trazer grande contribuição a um tema tão pertinente e obscuro.

Tabela 2: Estudos em ratos dos efeitos da RF na espermatogênese

Características da Radiofrequência	Período de Exposição	Parâmetros Avaliados	Res	Referência
Fonte controlada Fr: 2.45 GHz Dpot: 6.5 mW/cm ²	12 x 18hs Período: 60 dias	Temperatura retal Lesões tubulares esparsas em 7/9 Expostos e 2/9 controles: Vacuolização, células multinucleadas e Degeneração de túbulos subcapsulares	- +	(HAIDT e MCTIGHE, 1973)
Fonte controlada Fr: 1.3 GHz SAR média: 6.3 W/Kg	6hs/dia Período: 9 dias	Temperatura retal: aumento (1.5°C) Produção de espermatozói de diária por contagem histológica (método de Chalkey)	+ -	(JOHNSON, LEOVITZ e SAMSON, 1984)
Telefone celular convencional Fr modulação: 217 Hz Fr: 890 – 915 MHz SAR média: 0.141 W/Kg	3min/dia: <i>em conversação</i> 2hs/dia: <i>em espera</i> Período: 30 dias	Temperatura retal: aumento (0.46°C) Diâmetro tubular Contagem e morfologia esp. Escore histológico de Johnsen	+ + - +	(DASDAG <i>et al.</i> , 1999)
Telefone celular convencional Fr: 890 – 915 MHz Fr modulação: 217 Hz SAR média: 0.52 W/Kg	20min/dia: <i>em conversação</i> Período: 30 dias	Temperatura retal Diâmetro tubular Contagem e morfologia esp. Stress oxidativo (Malondialdeído) Imunohistoquímica (p53) Escore histológico de Johnsen	- - - - -	(DASDAG <i>et al.</i> , 2003)
Fonte controlada Fr: 869 – 894 MHz Dpot: 1.6 mW/cm ²	1 h/dia Período: 30 dias	Temperatura retal Descrição histológica testicular qualitativa	NR -	(ROSAS <i>et al.</i> , 2004)
Fonte controlada Fr: 900 MHz Dpot: 1.0 mW/cm ²	30 min/dia 5 dias/semana Período: 30 dias	Temperatura retal Diâmetro tubular Espessura do epitélio tubular Peso dos testículos Escore histológico de Johnsen Testosterona sérica LH e FSH séricos	NR + + - - - -	(OZGUNER <i>et al.</i> , 2005)
Fonte controlada Fr: 900 MHz Dpot: 1.9 mW/cm ²	12hs/dia Período: 7 dias	Temperatura retal Peso dos testículos e epidídimos Contagem, motilidade e morfologia esp. Dano ao DNA: eletroforese Dano ao DNA: PCR quantitativa para o genoma mitocondrial e β-globina nuclear	- - - - +	(AITKEN <i>et al.</i> , 2005)

Res: resultados; Fr: frequência; Dpot: densidade de potência; - : ausência de diferença significativa entre expostos e controles (p > 0.05); + : presença de diferença significativa entre expostos e controles (p < 0.05); SAR: taxa de absorção específica de corpo total; esp.: espermática

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição subcrônica a ondas de radiofrequência geradas por um aparelho de telefone celular convencional na função testicular de ratos Wistar adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar alterações de volume gonadal através da pesagem dos testículos e epidídimos;
 2. Identificar alterações dos níveis séricos de testosterona total;
 3. Avaliar os níveis de estresse oxidativo dos testículos e epidídimos através da quantificação da lipoperoxidação pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
 4. Avaliar quantitativamente a produção de gametas, através da contagem de espermatozoides da cauda do epidídimo;
 5. Identificar a frequência dos estágios do ciclo do epitélio seminífero;
 6. Avaliar a integridade do epitélio germinativo, através de análise histológica testicular qualitativa, observando a presença de infiltração intersticial, vacuolização celular, formação de células gigante multinucleadas e falha da liberação das espermátides no estágio IX;
- Avaliar a integridade do epitélio germinativo, através de análise histológica testicular quantitativa, pela contagem celular determinada por morfometria e cálculo de razões celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAIR, R. K. Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation. *Bioelectromagnetics*, v.24, n.1, p.39-48, Jan. 2003.

AHLBOM, A.; *et al.* Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. *Environ Health Perspect*, v.112, n.17, p.1741-1754, Dec. 2004.

AITKEN, R. J.; *et al.* Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl*, v.28, n.3, p.171-179, Jun. 2005.

ANATEL. Agência Nacional de Telecomunicações. Perspectivas para ampliação e modernização do setor de telecomunicações 2005.

ANDERSON, L. E.; *et al.* Two-year chronic bioassay study of rats exposed to a 1.6 GHz radiofrequency signal. *Radiat Res*, v.162, n.2, p.201-210, Aug. 2004.

ANGLESIO, L.; *et al.* Population exposure to electromagnetic fields generated by radio base stations: evaluation of the urban background by using provisional model and instrumental measurements. *Radiat Prot Dosimetry*, v.97, n.4, p.355-358, 2001.

ARDOINO, L., BARBIERI, E.; VECCHIA, P. Determinants of exposure to electromagnetic fields from mobile phones. *Radiat Prot Dosimetry*, v.111, n.4, p.403-406, 2004.

AUGER, J.; *et al.* Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*, v.332, n.5, p.281-285, Feb. 1995.

AUVINEN, A.; *et al.* Brain tumors and salivary gland cancers among cellular telephone users. *Epidemiology*, v.13, n.3, p.356-359, May. 2002.

BLAZAK, W. F., ERNST, T. L.; STEWART, B. E. Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol*, v.5, n.6 Pt 1, p.1097-1103, Dec. 1985.

BLETTNER, M.; BERG, G. Are mobile phones harmful? *Acta Oncol*, v.39, n.8, p.927-930, 2000.

CARLSEN, E.; *et al.* Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj*, v.305, n.6854, p.609-613, Sep. 1992.

CHALLIS, L. J. Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue. *Bioelectromagnetics*, v.Suppl 7, p.S98-S106, 2005.

CHIANG, H. Microwave male contraception studies in China. *Engineering in Medicine and Biology Society, 1988. Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE*, v.4, p.1883, 1988.

CHOU, C. K.; *et al.* Long-term, low-level microwave irradiation of rats. *Bioelectromagnetics*, v.13, n.6, p.469-496, 1992.

CHRISTENSEN, H. C.; *et al.* Cellular telephone use and risk of acoustic neuroma. *Am J Epidemiol*, v.159, n.3, p.277-283, Feb. 2004.

CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol*, v.25, n.2, p.119-131, Mar-Apr. 1997.

CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, v.68, n.5, p.408-415, Oct. 2003.

DASDAG, S.; *et al.* Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urol Res*, v.27, n.3, p.219-223, Jun. 1999.

DASDAG, S.; *et al.* Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics*, v.24, n.3, p.182-188, Apr. 2003.

ELWOOD, J. M. Epidemiological studies of radio frequency exposures and human cancer. *Bioelectromagnetics*, v.Suppl 6, p.S63-73, 2003.

FAHIM, M. S.; *et al.* Heat in male contraception (hot water 60 degrees C, infrared, microwave, and ultrasound). *Contraception*, v.11, n.5, p.549-562, May. 1975.

FEJES, I.; *et al.* Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl*, v.51, n.5, p.385-393, Sep-Oct. 2005.

GRAJEWSKI, B.; *et al.* Semen quality and hormone levels among radiofrequency heater operators. *J Occup Environ Med*, v.42, n.10, p.993-1005, Oct. 2000.

GROVES, F. D.; *et al.* Cancer in Korean war navy technicians: mortality survey after 40 years. *Am J Epidemiol*, v.155, n.9, p.810-818, May. 2002.

HABASH, R. W.; *et al.* Health risks of electromagnetic fields. Part II: Evaluation and assessment of radio frequency radiation. *Crit Rev Biomed Eng*, v.31, n.3, p.197-254, 2003.

HAIDT, S. J.; MCTIGHE, A. H. The Effect of Chronic Low-Level Microwave Radiation on the Testicles of Mice. *Microwave Symposium Digest, G-MTT International*, v.73, n.1, p.324-325, 1973.

HARDELL, L.; *et al.* Cellular and cordless telephones and the risk for brain tumours. *Eur J Cancer Prev*, v.11, n.4, p.377-386, Aug. 2002.

HERMANN, D. M.; HOSSMANN, K. A. Neurological effects of microwave exposure related to mobile communication. *J Neurol Sci*, v.152, n.1, p.1-14, Nov. 1997.

HJOLLUND, N. H., BONDE, J. P.; SKOTTE, J. Semen analysis of personnel operating military radar equipment. *Reprod Toxicol*, v.11, n.6, p.897, Nov-Dec. 1997.

HYLAND, G. J. Physics and biology of mobile telephony. *Lancet*, v.356, n.9244, p.1833-1836, Nov. 2000.

ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Phys*, v.74, n.4, p.494-522, Apr. 1998.

IEGMP. Mobile Phones and Health. Report of an Independent Expert Group on Mobile Phones: UK Minister of Public Health. National Radiological Protection Board. Chilton, Oxon. www.iegmp.org.uk/report/index.htm, 2000.

INSKIP, P. D.; *et al.* Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med*, v.344, n.2, p.79-86, Jan. 2001.

JOHANSEN, C. Electromagnetic fields and health effects--epidemiologic studies of cancer, diseases of the central nervous system and arrhythmia-related heart disease. *Scand J Work Environ Health*, v.30 Suppl 1, p.1-30, 2004.

JOHNSON, S. G. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, v.1, n.1, p.2-25, 1970.

JOHNSON, L., LEBOVITZ, R. M.; SAMSON, W. K. Germ cell degeneration in normal and microwave-irradiated rats: potential sperm production rates at different developmental steps in spermatogenesis. *Anat Rec*, v.209, n.4, p.501-507, Aug. 1984.

KALLEN, B., MALMQUIST, G.; MORITZ, U. Delivery outcome among physiotherapists in Sweden: is non-ionizing radiation a fetal hazard? *Arch Environ Health*, v.37, n.2, p.81-85, Mar-Apr. 1982.

KANDEEL, F. R.; SWERDLOFF, R. S. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. *Fertil Steril*, v.49, n.1, p.1-23, Jan. 1988.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, v.27, p.137-138, 1965.

LAGROYE, I.; *et al.* Measurement of DNA damage after acute exposure to pulsed-wave 2450 MHz microwaves in rat brain cells by two alkaline comet assay methods. *Int J Radiat Biol*, v.80, n.1, p.11-20, Jan. 2004.

LAI, H.; SINGH, N. P. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int J Radiat Biol*, v.69, n.4, p.513-521, Apr. 1996.

LANCRANJAN, I.; *et al.* Gonadic function in workmen with long-term exposure to microwaves. *Health Phys*, v.29, n.3, p.381-383, Sep. 1975.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, v.55, n.4, p.548-573, Nov. 1952.

LEE, S.; *et al.* 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. *FEBS Lett*, v.579, n.21, p.4829-4836, Aug. 2005.

LESZCZYNSKI, D. Mobile phones, precautionary principle, and future research. *Lancet*, v.358, n.9294, p.1733, Nov. 2001.

LINDER, R. E.; *et al.* Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*, v.6, n.6, p.491-505, 1992.

LIPMAN, R. M., TRIPATHI, B. J.; TRIPATHI, R. C. Cataracts induced by microwave and ionizing radiation. *Surv Ophthalmol*, v.33, n.3, p.200-210, Nov-Dec. 1988.

LONN, S.; *et al.* Long-term mobile phone use and brain tumor risk. *Am J Epidemiol*, v.161, n.6, p.526-535, Mar. 2005.

- LUE, Y.; *et al.* Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the "two-hit" approach to male contraceptive development. *Endocrinology*, v.141, n.4, p.1414-1424, Apr. 2000.
- MANGELSDORF, I., BUSCHMANN, J.; ORTHEN, B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol*, v.37, n.3, p.356-369, Jun. 2003.
- MILHAM, S., JR. Increased mortality in amateur radio operators due to lymphatic and hematopoietic malignancies. *Am J Epidemiol*, v.127, n.1, p.50-54, Jan. 1988.
- MORGAN, R. W.; *et al.* Radiofrequency exposure and mortality from cancer of the brain and lymphatic/hematopoietic systems. *Epidemiology*, v.11, n.2, p.118-127, Mar. 2000.
- MOULDER, J. E.; *et al.* Cell phones and cancer: what is the evidence for a connection? *Radiat Res*, v.151, n.5, p.513-531, May. 1999.
- MUSCAT, J. E.; *et al.* Handheld cellular telephones and risk of acoustic neuroma. *Neurology*, v.58, n.8, p.1304-1306, Apr. 2002.
- NEUWINGER, J., BEHRE, H. M.; NIESCHLAG, E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*, v.54, n.2, p.308-314, Aug. 1990.
- OFTEDAL, G.; *et al.* Symptoms experienced in connection with mobile phone use. *Occup Med (Lond)*, v.50, n.4, p.237-245, May. 2000.
- OUELLET-HELLSTROM, R.; STEWART, W. F. Miscarriages among female physical therapists who report using radio- and microwave-frequency electromagnetic radiation. *Am J Epidemiol*, v.138, n.10, p.775-786, Nov. 1993.
- OZGUNER, M.; *et al.* Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J*, v.26, n.3, p.405-410, Mar. 2005.
- PARSLOW, R. C., HEPWORTH, S. J.; MCKINNEY, P. A. Recall of past use of mobile phone handsets. *Radiat Prot Dosimetry*, v.106, n.3, p.233-240, 2003.
- PICKARD, W. F.; MOROS, E. G. Energy deposition processes in biological tissue: nonthermal biohazards seem unlikely in the ultra-high frequency range. *Bioelectromagnetics*, v.22, n.2, p.97-105, Feb. 2001.
- REPACHOLI, M. H. Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, v.19, n.1, p.1-19, 1998.
- REPACHOLI, M. H. Health risks from the use of mobile phones. *Toxicol Lett*, v.120, n.1-3, p.323-331, Mar. 2001.
- REPACHOLI, M. H.; *et al.* Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields. *Radiat Res*, v.147, n.5, p.631-640, May. 1997.
- ROSAS, R. J.; *et al.* Estudo Histológico em Testículos de Ratos Submetidos à Radiação Eletromagnética Não-Ionizante Usada na Telefonia Celular. In: S. B. D. M. E. Optoeletrônica (Ed.). Anais do Simpósio Brasileiro de Microondas e Optoeletrônica (MOMAG 2004). São Paulo, Brasil, 2004.

ROTHMAN, K. J. Epidemiological evidence on health risks of cellular telephones. *Lancet*, v.356, n.9244, p.1837-1840, Nov. 2000.

RUSSEL, L. D.; *et al.* Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, FI, USA: Cache River Press. 1990

SALFORD, L. G.; *et al.* Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc Res Tech*, v.27, n.6, p.535-542, Apr. 1994.

SALFORD, L. G.; *et al.* Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect*, v.111, n.7, p.881-883; discussion A408, Jun. 2003.

SCHRADER, S. M.; *et al.* Reproductive function in relation to duty assignments among military personnel. *Reprod Toxicol*, v.12, n.4, p.465-468, Jul-Aug. 1998.

SCHUZ, J.; MANN, S. A discussion of potential exposure metrics for use in epidemiological studies on human exposure to radiowaves from mobile phone base stations. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, v.10, n.6 Pt 1, p.600-605, Nov-Dec. 2000.

SEED, J.; *et al.* Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol*, v.10, n.3, p.237-244, May-Jun. 1996.

SHARPE, R. M.; *et al.* Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect*, v.103, n.12, p.1136-1143, Dec. 1995.

SHIRAI, T.; *et al.* Chronic exposure to a 1.439 GHz electromagnetic field used for cellular phones does not promote N-ethylnitrosourea induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics*, v.26, n.1, p.59-68, Jan. 2005.

SIGMAN, M.; JAROW, J. P. Male infertility. In: P. C. Walsh (Ed.). Campbell's Urology. Philadelphia, v.2, p.1477-1478, 2002.

SILVI, A. M., ZARI, A.; LICITRA, G. Assessment of the temporal trend of the exposure of people to electromagnetic fields produced by base stations for mobile telephones. *Radiat Prot Dosimetry*, v.97, n.4, p.387-390, 2001.

STANG, A.; *et al.* The possible role of radiofrequency radiation in the development of uveal melanoma. *Epidemiology*, v.12, n.1, p.7-12, Jan. 2001.

TAKAYAMA, S.; *et al.* Studies on the optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorder in rats--introductory summary. *J Toxicol Sci*, v.20, n.3, p.173-182, Aug. 1995.

TASKINEN, H., KYIRONEN, P.; HEMMINKI, K. Effects of ultrasound, shortwaves, and physical exertion on pregnancy outcome in physiotherapists. *J Epidemiol Community Health*, v.44, n.3, p.196-201, Sep. 1990.

TICE, R. R.; *et al.* Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics*, v.23, n.2, p.113-126, Feb. 2002.

TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H. O. Cellular telephones and brain tumors. *N Engl J Med*, v.344, n.2, p.133-134, Jan. 2001.

UTTERIDGE, T. D.; *et al.* Long-term exposure of E-mu-Pim1 transgenic mice to 898.4 MHz microwaves does not increase lymphoma incidence. *Radiat Res*, v.158, n.3, p.357-364, Sep. 2002.

WEYANDT, T. B.; *et al.* Semen analysis of military personnel associated with military duty assignments. *Reprod Toxicol*, v.10, n.6, p.521-528, Nov-Dec. 1996.

WHO. World Health Organization. Electromagnetic fields and public health: mobile telephones and their base stations. Fact sheet N°193, 2000.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

(Formato: Journal of Urology)

EFFECTS OF SUBCHRONIC EXPOSURE TO RADIOFREQUENCY FROM A CONVENTIONAL CELLULAR TELEPHONE UPON TESTICULAR FUNCTION IN ADULT RATS.

Eduardo Porto Ribeiro , MD (1)

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD (1,2,3,5)

Marilise Mesquita Horn, PhD (4)

Claudia Rhoden, PhD (5)

Lucas Pereira Lima (6)

Lucas Toniolo (7)

1. Postgraduate Course of Medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil
2. Urology Division, Surgery Department, Federal Foundation of Medical Sciences of Porto Alegre (FFFCMPA)
3. National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)
4. Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre, UFRGS
5. Postgraduate Course of Medical Sciences, FFFCMPA
6. FFFCMPA Graduate School of Medicine
7. FFFCMPA Graduate School of Biomedicine

RUNNINGHEAD: RADIOFREQUENCY EXPOSURE FROM CELLULAR TELEPHONE AND TESTICULAR FUNCTION

MESH TERMS: Male infertility, spermatogenesis, testicles, microwave, radiofrequency, cellular telephone.

CONFLIT OF INTEREST

None to declare.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Eliane Dallegrove, Dr. Cristina Luisa Conceição de Oliveira, Dr. Amâncio Romanelli Ferreira, Dr. Claudio Enrique Fernández Rodríguez, Dr. Marilda da Cruz Fernandes, Mr. Patrick Teloken and Ms. Camila Ordakowski de Oliveira for their invaluable assistance. This study was supported by the Coordination of Improvement of Personnel of Superior Level (CAPES, Brazil). Dr. E Rhoden is a researcher I-C from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil).

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to investigate the effects of subchronic exposure to radiofrequency (RF) emitted from a conventional cellular telephone upon the testicular function in adult rats.

Materials and Methods: Sixteen male Wistar rats (30-day-old) were randomly divided into two groups, experimental and control. The experimental group was exposed to RF emitted from a conventional GSM cellphone (1835 MHz – 1850 MHz), for one hour a day, during 11 weeks. Rectal temperature was measured before and after the exposure period. Testicular and epididymal weight, lipid peroxidation levels in these organs, serum total testosterone levels and the epididymal sperm count were evaluated. Maturation-phase spermatid retention at stage IX-X, interstitial infiltration, cellular vacuolation, and multinucleate giant cells were among the qualitative testicular histopathological endpoints analyzed. Each rat had 10 consecutive round seminiferous tubules at stage VII-VIII evaluated for the mean seminiferous tubular diameter measurement, the crude histologic count of round spermatids, pachytene spermatocytes and Sertoli cells with nucleoli, and the true histologic count (Abercrombie's correction factor) of round spermatids and pachytene spermatocytes.

Results: Mean rectal temperature did not alter following exposure. There was no statistical difference between control and experimental groups in any of the endpoints evaluated.

Conclusions: The present study showed that the low intensity pulsed RF emitted by conventional cellphones did not impair the testicular function in adult rats.

INTRODUCTION

The recent world-wide telephony revolution with the dissemination of cellphone use was followed by a growing public concern over the possible health risks from human exposure to the low intensity radiofrequency (RF) /microwave that cellphones emit ^{1,2}.

Although it is a non-ionizing radiation, RF is capable of causing biological effects by both thermal and non-thermal mechanisms ¹. While it is well established that its heating effects may cause health injury (e.g., severe damage to the spermatogenesis), the link between the direct interaction of non-ionizing radiation with biological tissues by non-thermal effects and the occurrence of health hazard is much weaker ².

Experimental studies specifically designed to evaluate the occurrence of testicular damage caused by low intensity RF have found conflicting results ³⁻⁸. The interpretation of these studies is partially complicated by the existence of several methodological variations and the presence of one or more flaws, such as the lack of adequate thermal control, a short exposure period, and the selection of endpoints poorly described or with low sensitivity.

In this context, the objective of the present study was to evaluate the effects of subchronic exposure to RF emitted from a conventional cellular telephone upon the testicular function in adult rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Sixteen male Wistar rats (30-day-old) were housed in standard plastic cages (45 x 30 x 12 cm), four animals per cage, with free access to food and water, in a room with a 12-hour light : dark cycle and controlled temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. The principles contained in the guide for the care and use of laboratory animals of the Institute of Laboratory Animal Resources (Commission on Life Sciences, National Research Council, USA) were followed throughout the experiment, and the study was approved by the Animal Care and Ethics Committee of the author's Institution.

Experimental Design

A conventional commercially available cellphone with GSM (Global System for Mobile Communication) digital technology was used. The cellphone had the following characteristics: 1835 MHz – 1850 MHz carrier frequency, 217 Hertz time division modulation frequency, 0.125 milliwatts (mW) maximal average power and 1 Watt maximal peak power.

The rats were randomly divided into two groups, experimental (n=8) and control (n=8), and placed inside two distinct cages (eight by cage) for 1 hour a day, during 11 weeks. The cages upsides were half covered, creating a dark ambient under the cover where the rats kept grouped in clusters for most of the exposure time. In the same dark region, inside the experimental cage, an active cellphone in the conversation mode protected by a small plastic container was allocated. Only a similar small plastic container was accommodated in the control group cage.

The cellphone volume control was switched to the lowest level. The average strength of the electric field emitted by the telephone, measured every second by a radiation meter (Narda® EMR300, isotropic probe 8C) was 7.3 volts/meter (power density of 1.4 mW/cm^2) 1 centimeter away, and 1.2 volts/meter (0.04 mW/cm^2) at the most distant region of inside the cage from the phone. In the control group cage, positioned 8 meters away, the average

strength of the electric field detected was equivalent to the background radiation (0.2 volts/meter). Rectal temperature of all rats was measured before and immediately after exposure in at least two different occasions.

Rats were killed by decapitation, between 9:00 AM and 12:00 PM. Cervical blood was collected and serum samples separated by centrifugation and stored at -80°C until analysis. The testes and epididymides were carefully dissected out and weighted (analytical balance Marte®, precision 0.01g).

Epididymal Sperm Count

The right cauda epididymides were isolated, minced with scissors and manually homogenized with a pistil in 10 ml of 0.9% NaCl containing 0.05% Triton X-100 during 1 minute. After dilution (1:9) the number of sperm heads was counted in four chambers of a Neubauer-type hemacytometer. Final data were expressed as the total number of sperms per cauda epididymis, after correcting for the chamber and dilution factors ($\times 10^6$).

Testicular Histology

The right testes were fixed by immersion in Bouin's solution immediately after removal (24h), dehydrated and embedded in glycol methacrylate resin (Technovit 7100®, Heraeus Kulzer Co., Germany). The testes were transversely cut into 3 μm sections, stained with periodic acid Schiff's reagent (PAS) and counter-stained with hematoxylin. Leblond and Clermont stages of the spermatogenesis⁹ were combined into 5 different stages (I-VI, VII-VIII, IX-X, XI-XIII e XIV) and determined in 100 consecutive tubules per rat.

The crude number of Sertoli cell nuclei with evident nucleoli, pachytenes spermatocytes and round spermatids were recorded in 10 round (long / short diameter < 1.5) tubular cross-sections at stage VII-VIII per rat. The mean nuclear diameter of pachytenes spermatocytes and round spermatids was also determined. The crude nuclear count of these germ cells, which represented both whole and sectioned nuclei, was then corrected to the

true cellular count, using the Abercrombie's correction factor (crude cellular count X section thickness / [section thickness + nuclear diameter])¹⁰. The mean diameter of these 10 round tubules per rat and the ratios of the different cell types were also determined. Quantitative analysis was done manually with the aid of an image editor (Adobe photoshop®) and an image analyzer (Image J®). The presence of retained maturation-phase spermatids was determined at the postspermiation Stage IX-X. The presence of interstitial infiltration, cellular vacuolation, and giant multinucleated cells was also investigated.

Lipid Peroxidation

The left testes and epididymides were separately homogenized in phosphate buffer (pH 7.4) (1:9). Lipid peroxidation was estimated (in duplicate) by monitoring the formation of thiobarbituric acid (TBA) reactive substances, following the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), an aldehyde by-product of cellular lipoperoxidation¹¹. Briefly, 0.5 ml of the crude homogenate was incubated with 1.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 30 min. After centrifugation (15 min at 3000 rpm), 1.5 ml of the supernatant was transferred to a tube containing 1.5 ml of TBA 0.67% (Sigma ®), agitated, and heated during 15 min in a boiling water bath. After cooling to room temperature, 3 ml of n-butyl alcohol was added to the mixture, which was then vigorously agitated for 40 seconds and centrifuged at 2000 rpm. The absorbance of the supernatant containing the MDA-TBA pigment was read at 535 nm in a spectrophotometer (Perkin Elmer® Lambda 35, Fremont, CA, USA). Total protein concentration in the homogenate samples was determined using the Lowry's colorimetric method¹². Results were expressed in nmol MDA mg⁻¹ of protein.

Serum Total Testosterone Determination

The serum total testosterone concentration was determined by radioimmunoassay (DSL-4000®, Webster, Texas, USA). The limit of sensitivity was 0.1ng/mL, and the intra- and interassay coefficients of variation were 8.5%.

Statistical Analysis

The histological crude count of round spermatids at stage VII-VIII of the seminiferous epithelium cycle was the endpoint used for sample size calculation. The mean crude count \pm standard deviation was estimated in 210 ± 17 ¹³. With significance level set at 0.05, power at 0.9 and minimum exposure effect at 15% (reduction of 32 round spermatids), a total of 8 animals per group was required.

All analyses were done by the same examiner (E.P.R) who was blind in relation to the samples groups. Student's t-test was conducted, and a *p*-value less than 0.05 was considered to be statistically significant. The number of round spermatids and pachytene spermatocytes was recounted in one randomly selected tubule per rat (10%), and the intraclass correlation coefficient was calculated. Accordingly, the statistical software package (SPSS® version 12.0) was used.

RESULTS

Rectal temperature (mean \pm SD) before and immediately after RF exposure was respectively equal to $36.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ and $37.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ in the control group ($P = 0.28$), and $36.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ and $37.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ in the experimental group ($P = 0.58$).

Total body weight and the absolute and relative testicular and epididymal weights did not change significantly (Table 1). Epididymal sperm count was not significantly different between the groups either.

Serum total testosterone mean values in the control (2.61 ± 1.46 ng/mL) and experimental (2.54 ± 0.64 ng/mL) groups were similar ($P = 0.9$). Mean MDA concentration in the testicular homogenate of the control and experimental groups was equal to 109 ± 32 nmol g^{-1} of protein and 90 ± 28 nmol g^{-1} of protein ($P = 0.23$), while in the epididymal homogenate it was equal to 301 ± 76 nmol g^{-1} of protein and 252 ± 81 nmol g^{-1} of protein ($P = 0.23$).

No histopathological qualitative alteration was observed in the examined seminiferous tubules of control and experimental rats (Figure 1). Stages mean proportions of the seminiferous epithelium cycle was similar in both groups (Table 2). Neither the diameter of the seminiferous tubules, nor the crude number of round spermatids, pachytene spermatocytes and Sertoli cells, the true germ cell counts, and the cell ratios were decreased by cellphone RF exposure (Table 3). A high reliability of the germ cell counts was observed (intraclass correlation coefficient of 0.98).

DISCUSSION

The present study was aimed at verifying if radiation emitted by mobile cellular telephones may impair testicular function of adult rats. No statistical significant difference between the experimental and control groups could be observed in any of the parameters evaluated.

To our knowledge, this is the first study to investigate the testicular non-thermal effects of cellphones RF by performing a detailed histopathological examination of the testes after an adequate exposure time, aspects that strengthen the consistency of the findings.

Histologic true germ cell count at specific stages of the spermatogenic cycle is considered an extremely sensitive method, capable of detecting subtle alterations of the spermatic production¹⁴. The exposure time used, equivalent to 6 seminiferous epithelium cycles of the Wistar rats, covers the period of time necessary for a spermatogonia to turn into a sperm and reach the cauda epididymes, being the recommended for studies aimed at detecting subtle reproductive toxicity alterations^{9, 14}.

Occupational studies have been conducted in the past few decades to evaluate the effects of RF exposure in the human male fertility, most of them related to military exposure to microwaves and radars. Some of these studies did find worse seminal parameters in individuals prone to a greater exposure². However, exposure assessment have usually been retrospective and based simply on the job titles of volunteers, (*i.e.* radar operators), leaving them susceptible to several confusional, measurement and classification biases.

In a recent retrospective study, a weak correlation between cellphone use (duration of phone possession and of daily transmission) and sperm motility impairment (decrease in grade A and increase in grade B motility) was demonstrated¹⁵. Nevertheless, estimation of exposure on self-reported levels of phone use in retrospective studies may not fully represent patterns of actual use¹⁶. Finally, the low accuracy and reproducibility of seminal analysis, the endpoint most commonly used, is a common problem to every clinical study¹⁷.

There are only a few experimental studies specifically designed to evaluate the occurrence of non-thermal testicular damage after exposure to low intensity RF ³⁻⁸. Besides controversial, results from these studies are difficult to compare, mostly because they have several methodological variations. RF source has varied from continuous wave electromagnetic energy generators to conventional cellphones with different modulation technologies. Animals have been exposed to different RF frequencies, intensities and exposure times. In addition, reproductive endpoints chosen have been mostly qualitative, subjective or even poorly described.

Haidt e McTighe ³ exposed mice to a controlled RF generator (2.45GHz) for 230 hours during a 60 days period. Histopathological testicular alterations were described but poorly quantified. Johnson *et al.* ⁴, after a careful histological examination, did not observe any sign of spermatogenesis impairment. A controlled RF generator (1.3 GHz) was used for 6 hours a day during 9 days. A rectal temperature elevation after exposure was described.

Dasdag *et al.* ⁵ using a conventional cell phone (890 – 915 MHz) active for 3 minutes a day during 30 days observed a reduction in the mean seminiferous tubular diameter. Testicular toxicity was also evaluated by sperm parameters and the Johnsen histopathological score, which were unremarkable. A second study from the same group was unable to replicate those previous findings even after applying a longer exposure time ⁶. Ozguner *et al.* ⁸, using a controlled RF generator (869 – 894 MHz) as RF source (30 min a day, 5 days a week, during 30 days) and similar endpoints found a reduction in the mean seminiferous tubular diameter and in the seminiferous epithelium thickness. Aitken *et al.* ⁷, after a controlled generator exposure (900 MHz) of 12 hours a day during 7 days, found a statistically significant genotoxic effect to epididymal sperm, with damage to the mitochondrial DNA and the nuclear β -globin locus.

Reactive oxygen species (ROS) formation and oxidative damage may contribute to spermatogenesis impairment. For example, ROS were shown to be involved in testicular germ cell apoptosis induced by heating ¹⁸. The present study did not show any increase in cellular lipid peroxidation intensity in cellphone RF exposed animals.

The RF source chosen in the present study, a conventional cellphone, has an intrinsic limiting factor that is the difficulty of measuring the specific absorption rate, as cellphones potency during calls is extremely variable. Nonetheless, it has the merit of simulating a exposure situation close to reality ². The average strength of the electric field emitted was measured by a radiation meter with an isotropic probe in the dark region of the cage where the rats kept concentrated most of the time and at the greater possible distance from the phone. Both measurements were well below the levels necessary for heating to take place ¹⁹.

In conclusion, based on the data obtained by the present study, RF emitted by a conventional cellphone did not cause deleterious effects in the testicular function of adult rats.

REFERENCES

1. Hyland, G. J.: Physics and biology of mobile telephony. *Lancet*, **356**: 1833, 2000
2. Ahlbom, A., Green, A., Kheifets, L. et al.: Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. *Environ Health Perspect*, **112**: 1741, 2004
3. Haidt, S. J., McTighe, A. H.: The Effect of Chronic Low-Level Microwave Radiation on the Testicles of Mice. *Microwave Symposium Digest, G-MTT International*, **73**: 324, 1973
4. Johnson, L., Lebovitz, R. M., Samson, W. K.: Germ cell degeneration in normal and microwave-irradiated rats: potential sperm production rates at different developmental steps in spermatogenesis. *Anat Rec*, **209**: 501, 1984
5. Dasdag, S., Ketani, M. A., Akdag, Z. et al.: Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urol Res*, **27**: 219, 1999
6. Dasdag, S., Zulkuf Akdag, M., Aksen, F. et al.: Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics*, **24**: 182, 2003
7. Aitken, R. J., Bennetts, L. E., Sawyer, D. et al.: Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl*, **28**: 171, 2005
8. Ozguner, M., Koyu, A., Cesur, G. et al.: Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J*, **26**: 405, 2005
9. Russel, L. D., Ettl, R. A., Sinha Hikim, A. P. et al.: Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, FL, USA: Cache River Press, 1990
10. Abercrombie, M.: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Record*, **94**: 239, 1946
11. Buege, J. A., Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **52**: 302, 1978
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265, 1951
13. Ichihara, G., Yu, X., Kito, J. et al.: Reproductive toxicity of 1-bromopropane, a newly introduced alternative to ozone layer depleting solvents, in male rats. *Toxicol Sci*, **54**: 416, 2000
14. Creasy, D. M.: Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol*, **25**: 119, 1997
15. Fejes, I., Zavaczki, Z., Szollosi, J. et al.: Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl*, **51**: 385, 2005
16. Parslow, R. C., Hepworth, S. J., McKinney, P. A.: Recall of past use of mobile phone handsets. *Radiat Prot Dosimetry*, **106**: 233, 2003

17. Neuwinger, J., Behre, H. M., Nieschlag, E.: External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*, **54**: 308, 1990
18. Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J. et al.: Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod*, **61**: 393, 1999
19. IEGMP: Mobile Phones and Health. Report of an Independent Expert Group on Mobile Phones: UK Minister of Public Health. National Radiological Protection Board. Chilton, Oxon: www.iegmp.org.uk/report/index.htm, 2000

Table 1. Body, testicular and epididymal weights and cauda epididymis sperm count of control and exposed rats to RF emitted from a conventional cellphone.

Endpoint	Control Group	Experimental Group	<i>P</i> value
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	
Body weight (bw) (g)	427 ± 27	410 ± 34	0.29
Absolute organ weight			
Testes (g)	1.72 ± 0.08	1.77 ± 0.17	0.46
Epididymides (mg)	269 ± 19	265 ± 25	0.72
Relative organ weight			
Testes (mg/g bw)	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.6	0.20
Epididymides (mg/g bw)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.07
Cauda epididymis sperm count			
(x 10^6 / cauda)	88 ± 23	83 ± 18	0.64
(x 10^6 / g cauda)	328 ± 91	319 ± 82	0.84

Table 2. Mean proportion of stages of spermatogenesis of control and exposed rats to RF emitted from a conventional cellphone.

Stage frequency	Control Group	Experimental Group	<i>P</i> value
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	
I-VI	45.1 ± 5.8	42.5 ± 3.7	0.31
VII-VIII	23.9 ± 3.5	26.9 ± 2.5	0.08
IX-X	9.6 ± 1.1	8.4 ± 2.7	0.30
XI-XIII	17.4 ± 3.3	17.4 ± 4.0	0.98
XIV	4.0 ± 2.0	4.9 ± 1.6	0.36

Table 3. Quantitative histologic endpoints of control and exposed rats to RF emitted from a conventional cellphone.

Testicular histologic endpoints	Control Group	Experimental Group	<i>P</i> value
	X ± SD	X ± SD	
Tubular diameter (µm)	383 ± 11	379 ± 22	0.65
Crude nuclear count			
Round spermatids step 7	182 ± 15	189 ± 8	0.28
Pachytenes spermatocytes	71 ± 3	72 ± 5	0.69
Sertoli cell with nucleoli	9.9 ± 0.9	10.8 ± 0.9	0.06
True nuclear count *			
Round spermatids step 7	45.2 ± 3.6	47.4 ± 2.6	0.18
Pachytenes spermatocytes	14.9 ± 0.8	15.0 ± 1.1	0.84
Cell ratios			
Round spermatids step 7 / Pachytenes	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.1	0.13
Round spermatids step 7 / Sertoli cell	4.8 ± 0.7	4.5 ± 0.4	0.33
Pachytenes spermatocytes / Sertoli cell	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.08

* After Abercrombie's correction factor¹⁰.

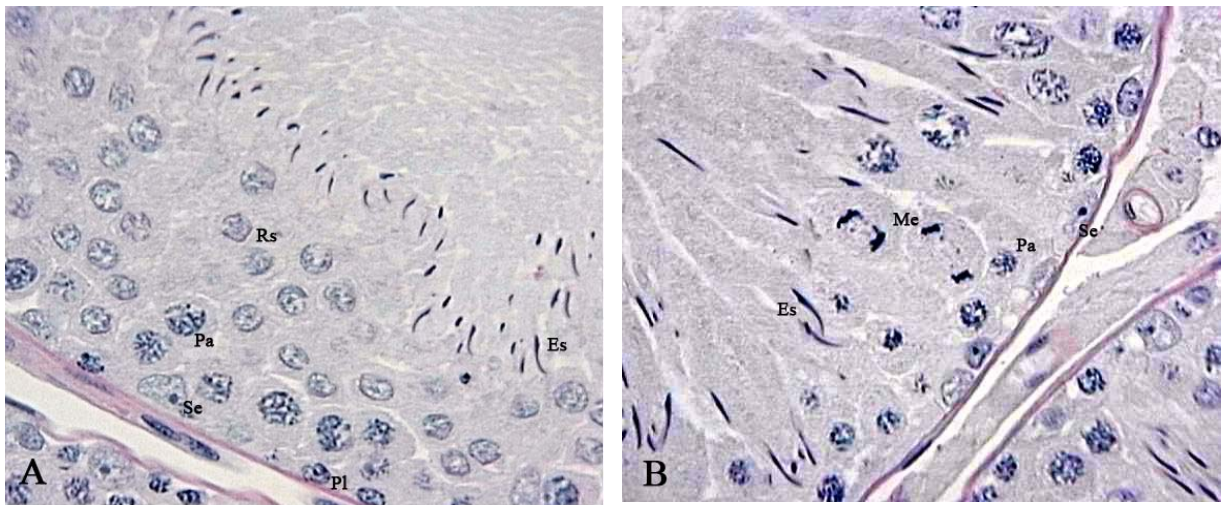


Figure 1. Histologic testicular sections of a rat exposed to RF emitted from a conventional cellphone, showing a normally organized seminiferous epithelium at stage VII-VIII (A) and at stage XIV (B). Rs = round spermatid; Es = Elongated spermatid; Pa = pachytene spermatocyte; Se = Sertoli cell; Pl = preleptotene spermatocyte; Me = meiosis (Bouin's immersion fixation; glycol methacrylate embedding; periodic acid Schiff - hematoxylin staining; final magnification X 800).

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

EFEITO DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA A ONDAS DE RADIOFREQUÊNCIA GERADAS POR UM APARELHO DE TELEFONE CELULAR CONVENCIONAL NA FUNÇÃO TESTICULAR DE RATOS ADULTOS.

Eduardo Porto Ribeiro , MD (1)

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD (1,2,3)

Marilise Mesquita Horn, PhD (4)

Claudia Rhoden, PhD (5)

Lucas Pereira Lima (6)

Lucas Toniolo (7)

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS
2. Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia, da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)
3. Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
4. Unidade de Experimentação Animal, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS
5. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FFFCMPA
6. Curso de Graduação em Medicina da FFFCMPA
7. Curso de Graduação em Biomedicina da FFFCMPA

UNITERMOS: Fertilidade masculina, espermatogênese, testículos, microondas, radiofrequência, telefone celular.

CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum a declarar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as contribuições dos pesquisadores Eliane Dallegrave, Cristina Luisa Conceição de Oliveira, Amâncio Romanelli Ferreira, Claudio Enrique Fernández Rodríguez, Marilda da Cruz Fernandes, Patrick Teloken e Camila Ordakowski de Oliveira. Este estudo recebeu bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica a radiofrequência (RF) emitida por um telefone celular convencional na função testicular de ratos adultos.

Materiais e métodos: Dezesesseis ratos Wistar machos (30 dias de vida), foram divididos aleatoriamente em dois grupos, teste e controle. O grupo teste foi exposto à RF emitida por um telefone celular convencional GSM (1835 MHz – 1850 MHz), 1 h por dia durante 11 semanas. A temperatura retal dos ratos foi aferida antes e após o período de exposição. Foi avaliado o peso dos testículos e epidídimos, a intensidade da peroxidação lipídica nestes órgãos, a dosagem de testosterona total sérica e a contagem de espermatozóides da cauda do epidídimo. A presença de retenção de espermátides alongadas maduras no estágio IX-X, infiltração intersticial, vacuolização celular e formação de células gigante multinucleadas, estão entre os parâmetros histopatológicos qualitativos analisados. Foram avaliados 10 túbulos seminíferos arredondados consecutivos em estágio VII-VIII por rato, para aferição do diâmetro tubular médio, contagem histológica bruta de espermátides redondas, paquítenos e células de Sertoli com nucléolos evidentes, e a contagem histológica verdadeira (fator de correção de Abercrombie) de espermátides redondas e paquítenos.

Resultados: Não houve modificação da temperatura retal média após a exposição à RF. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e teste em nenhum dos parâmetros avaliados.

Conclusões: O presente estudo demonstrou que a RF pulsátil de baixa intensidade emitida por telefones celulares convencionais não prejudicou a função testicular de ratos adultos.

INTRODUÇÃO

A recente revolução da telefonia mundial com a disseminação do uso do telefone celular foi seguida por uma crescente preocupação pública em relação aos possíveis riscos à saúde pela exposição humana às ondas de radiofrequência (RF)/microondas de baixa intensidade emitida pelos aparelhos ^{1,2}.

Embora seja uma radiação não ionizante, a RF é capaz de provocar efeitos biológico por mecanismos térmicos e não térmicos ¹. Enquanto está bem estabelecido que seus efeitos de aquecimento podem causar danos à saúde (e.g. dano severo à espermatogênese), o elo que liga a interação direta da radiação não ionizante com tecidos biológicos através de efeitos não térmicos e a ocorrência de dano à saúde é bem mais fraco ².

Estudos experimentais desenhados especificamente para avaliar a ocorrência de danos testiculares causados pela RF de baixa intensidade apresentaram resultados controversos ³⁻⁸. A interpretação destes estudos é parcialmente complicada pela existência de inúmeras variações metodológicas, e a presença de uma ou mais falhas, como a falta de controle térmico adequado, curtos intervalos de exposição, e a escolha de parâmetros finais mal definidos ou com baixa sensibilidade.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica a ondas de RF emitidas por um aparelho de telefone celular convencional na função testicular de ratos Wistar adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Dezesseis ratos machos Wistar (30 dias de vida) foram alojados em gaiolas plásticas padrão (45 x 30 x 12 cm), 4 animais por gaiola, com água e alimento *ad libitum*, em um ambiente com ciclo de luz:escuridão de 12 horas e temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os princípios contidos no guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do Instituto de Recursos de Animais de Laboratório (Comissão de Ciências da Vida, Conselho Nacional de Pesquisa, EUA) foram seguidos durante todas as fases do experimento, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

Desenho Experimental

Foi utilizado um aparelho de telefone celular convencional com tecnologia digital GSM (*Global System for Mobile Communication*). O telefone apresentava as seguintes características: frequência carreadora na banda 1835 MHz – 1850 MHz, modulação por divisão de tempo em pulsos de 217 Hz, potência média máxima de 0.125 milliwatts (mW) e pico máximo de potência de 1 Watt.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, teste (n=8) e controle (n=8) e colocados em duas gaiolas distintas (oito por gaiola) por 1 hora por dia, durante 11 semanas. Metade da extremidade superior das gaiolas foi coberta, criando-se um ambiente escuro embaixo da cobertura, onde os ratos permaneciam agrupados na maior parte do tempo de exposição. Nesta mesma região escura, dentro da gaiola experimental foi colocado um telefone celular ativo ligado no modo de conversação, protegido por recipiente plástico. A gaiola do grupo controle albergou apenas o recipiente plástico.

O controle do volume do telefone celular foi regulado para o nível mínimo. A força média do campo elétrico gerado pelo telefone, aferida por um medidor de radiação (marca Narda®, modelo EMR300, ponteira isotrópica 8C), segundo a segundo, foi de 7.3 volts/metro (densidade de potência aproximada de 1.4 mW/cm^2) há 1 cm de distância, e de

1.2 volts/metro (0.04 mW/cm²) na máxima distância possível, no canto contralateral da gaiola. Na gaiola controle, posicionada a 8 metros de distância, a intensidade média do campo elétrico foi de 0,2 volts/metro (0.001 mW/cm²). A temperatura retal de todos os ratos foi aferida antes e imediatamente após o período de exposição, em pelo menos duas ocasiões.

Os ratos foram sacrificados por guilhotinamento, entre 9:00 AM e 12:00 PM. O sangue troncular cervical foi centrifugado e o soro armazenado a - 80°C até a análise. Os testículos e epidídimos foram então cuidadosamente removidos e pesados (balança analítica Marte®, precisão de 0.01g).

Contagem de espermatozoides do epidídimo

A cauda de cada epidídimo direito foi isolada, cortada em pequenos pedaços e homogeneizada manualmente com um pistilo, em 10 ml de NaCl 0.9% contendo 0.05% de Triton X-100, durante um minuto. Após diluição (1:9) o número de cabeças de espermatozoides foi contado em 4 campos de um hemocitômetro tipo Neubauer. O valor médio final foi expresso como o número total de espermatozoides por cauda de epidídimo, após correção para os fatores da câmara e da diluição ($\times 10^6$).

Histologia testicular

Os testículos direitos foram fixados por imersão em solução de Bouin imediatamente após a remoção (24 horas), desidratados e embebidos para inclusão em resina de glicol metacrilato (Technovit 7100®, Heraeus Kulzer Co., Alemanha). Foram obtidas secções transversais de 3 micrômetros de espessura, coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina. Os estágios do ciclo espermatogênico de Leblond e Clermont ⁹ foram combinados em 5 estágios (I-VI, VII-VIII, IX-X, XI-XIII e XIV) e determinados em 100 túbulos seminíferos consecutivos por rato.

O número bruto de núcleos de células de Sertoli com nucléolos evidentes, de paquítenos e de espermátides redondas foi aferido em 10 túbulos arredondados

consecutivos (maior / menor diâmetro < 1.5) em estágio VII-VIII por rato. O diâmetro nuclear médio de paquítenos e espermatídes redondas foi também determinado. A contagem nuclear bruta destas células germinativas, que representa núcleos inteiros e em secções tangenciais, foi então corrigida para a contagem verdadeira, usando o fator de correção de Abercrombie (contagem celular bruta X espessura do corte / [espessura do corte + diâmetro nuclear])¹⁰. O diâmetro tubular médio destes 10 túbulos redondos e as razões entre os diversos tipos celulares foram também calculados. As análises quantitativas foram realizadas manualmente com o auxílio de um editor de imagens (Adobe Photoshop®) e um analisador de imagens (Image J®). Nos túbulos em estágio IX-X, foi avaliada a presença de retenção de espermatídes alongadas maduras. Foi também investigada a presença de infiltração intersticial, vacuolização celular e formação de células gigante multinucleadas.

Peroxidação lipídica

Os testículos e epidídimos esquerdos foram homogeneizados separadamente em tampão de fosfato (pH 7.4) (1:9). A peroxidação lipídica foi estimada (em duplicata) pelo monitoramento da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), seguindo a reação do TBA com o malondialdeído (MDA), um produto secundário aldeído da lipoperoxidação celular¹¹. Brevemente, 0,5 ml do homogeneizado bruto foi misturado com 1,5 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% a 4°C por 30 minutos. Após centrifugação (15 min a 3000 rpm), 1,5 ml do sobrenadante foi transferido a um tubo contendo 1,5 ml de TBA 0,67% (Sigma®), agitado e aquecido por 15 min em banho de água fervente. Após breve resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 3 ml de álcool n-butílico à mistura, que foi então vigorosamente agitada por 40 segundos e centrifugada a 2000 rpm. A absorbância do sobrenadante contendo o pigmento MDA-TBA foi lida em 535 nm em um espectrofotômetro (Perkin Elmer® Lambda 35, Fremont, CA, EUA). A concentração de proteínas totais nas amostras do homogeneizado foi determinada pelo

método colorimétrico de Lowry ¹². Os resultados foram expressos em nmol MDA mg⁻¹ de proteína.

Dosagem de testosterona total sérica

A concentração sérica da testosterona total foi aferida por radioimunoensaio (DSL-4000®, Webster, Texas, EUA). O limite mínimo de detecção foi de 0.1ng/mL, e o coeficiente de variação intra e interensaio médios foram de 8.5%.

Análise estatística

A contagem bruta de espermátides redondas no estágio VII-VIII do ciclo do epitélio seminífero foi o parâmetro utilizado para o cálculo do tamanho da amostra. A contagem bruta média \pm desvio padrão foi estimada em 210 ± 17 ¹³. Com o nível de significância fixado em 0.05, o poder em 0.9, e o efeito da exposição mínimo em 15% (redução de 32 espermátides redondas), um total de 8 animais por grupo foi necessário.

Todas as análises foram realizadas pelo mesmo examinador (E.P.R) que se encontrava cego em relação ao grupo a que pertenciam às amostras. Foi utilizado o teste t de Student. Um valor *p* menor que 0.05 foi considerado ser estatisticamente significativo. O número de espermátides redondas e paquítenos foi recontado em um túbulo (aleatoriamente selecionado) por rato (10%), e o coeficiente de correlação intraclasses foi calculado. Foi utilizado o programa SPSS® versão 12.0.

RESULTADOS

A temperatura retal (média \pm desvio padrão) antes e imediatamente após a exposição à RF foi, respectivamente, igual a $36.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ e $37.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ no grupo controle (*P* = 0.28) e $36.9 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ e $37.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ no grupo experimental (*P* = 0.58).

O peso corporal total e o peso absoluto e relativo dos testículos e epidídimos não se alteraram de forma significativa (Tabela 1). A contagem de espermatozoides do epidídimo também não apresentou diferença significativamente entre os grupos.

Os valores séricos médios da testosterona total medidas nos grupos controle (2.61 ± 1.46 ng/mL) e experimental (2.54 ± 0.64 ng/mL) foram similares ($P = 0.9$). A concentração de MDA no homogeneizado testicular dos grupos controle e experimental foi de, respectivamente, 109 ± 32 nmol g⁻¹ de proteína e 90 ± 28 nmol g⁻¹ de proteína ($P = 0.23$), enquanto no homogeneizado do epidídimo foi de 301 ± 76 nmol g⁻¹ de proteína and 252 ± 81 nmol g⁻¹ de proteína ($P = 0.23$).

Nenhuma alteração histopatológica qualitativa foi observada nos túbulos seminíferos examinados dos ratos controles e experimentais (Figura 1). A proporção média dos estágios do ciclo do epitélio seminífero nos grupos foi similar (Tabela 2). O diâmetro tubular, o número bruto de espermátides redondas, paquítenos e células de Sertoli, as contagens verdadeiras das células germinativas e as razões celulares não diminuíram em função da exposição à RF. (Tabela 3). Uma alta confiabilidade das contagens das células germinativas foi observada (coeficiente de correlação intraclasse de 0.98).

DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido para verificar se a radiação emitida por telefones celulares móveis pode prejudicar a espermatogênese. Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle foi observada em nenhum dos parâmetros avaliados.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos testiculares não térmicos da RF dos telefones celulares através de um detalhado exame histopatológico dos testículos e após um período de tempo adequado, aspectos que reforçam a consistência dos achados.

A contagem histológica verdadeira de células germinativas em estágios específicos do ciclo da espermatogênese é considerada um método extremamente sensível, capaz de detectar alterações sutis da produção espermática ¹⁴. O período de exposição utilizado, equivalente a 6 ciclos do epitélio seminífero dos ratos Wistar, abrange o período de tempo necessário para que uma espermatogônia se torne um espermatozóide e atinja a cauda do epidídimo, sendo o recomendado para estudos que visam a detecção de alterações tóxicas reprodutivas sutis ^{9, 14}.

Estudos ocupacionais foram conduzidos nas últimas décadas para avaliar os efeitos da exposição à RF na fertilidade humana masculina, a maioria relacionada à exposição de militares a microondas e radares. Alguns destes estudos detectaram de fato parâmetros seminais piores em indivíduos susceptíveis a uma maior exposição ². Entretanto, a aferição das taxas de exposição costuma ser retrospectiva e baseada simplesmente no perfil profissional de voluntários (*i.e.* operadores de radar), deixando-a susceptível a vários vieses de confusão, aferição e classificação.

Em um estudo retrospectivo recente, uma fraca correlação entre o uso de telefones celulares (duração da posse do aparelho e da transmissão diária) e a piora da motilidade espermática (diminuição da grau A e aumento motilidade da grau B) foi demonstrada ¹⁵. Entretanto, estimativas de exposição baseadas em informações colhidas dos próprios

indivíduos, estudados de forma retrospectiva, podem não traduzir plenamente os padrões reais de uso ¹⁶. Finalmente, a baixa acurácia e reprodutibilidade do espermograma, parâmetro clínico mais comumente utilizado, é um problema comum a todos os estudos clínicos ¹⁷.

Poucos são os estudos experimentais especificamente desenhados para avaliar a ocorrência de efeitos deletérios não térmicos aos testículos após exposição à RF de baixa intensidade ³⁻⁸. Além de controversos, os resultados destes estudos são de difícil comparação, principalmente devido à existência de inúmeras variações metodológicas. O tipo de fonte emissora da RF tem variado desde geradores de energia eletromagnética de onda contínua até telefones celulares convencionais, com diferentes tecnologias de modulação. Os animais têm sido expostos a diferentes frequências, intensidades e tempos de exposição. Além disso, os parâmetros reprodutivos escolhidos tem sido na maior parte das vezes qualitativos, subjetivos ou mesmo pobremente descritos.

Haidt e McTighe ³ expuseram camundongos a um gerador controlado de RF (2.45 GHz) por 230 horas durante um período de 60 dias. Alterações testiculares histopatológicas foram descritas, embora pobremente quantificadas. Johnson *et al.* ⁴, após um cuidadoso exame histológico, não observaram qualquer sinal de dano à espermatogênese. Um gerador controlado de RF (1.3 GHz) foi utilizado, durante 6 horas por dia, por 9 dias. Uma elevação da temperatura retal após a exposição foi descrita.

Dasdag *et al.* ⁵ utilizando telefones celulares convencionais (890 – 915 MHz) ativos por 3 minutos por dia durante 30 dias, observaram uma redução do diâmetro tubular médio seminífero. A toxicidade testicular foi também avaliada por parâmetros espermáticos e pelo escore histopatológico de Johnsen, que se encontravam inalterados. Um segundo estudo do mesmo grupo não foi capaz de replicar aqueles achados prévios, mesmo tendo utilizado um tempo de exposição mais longo ⁶. Ozguner *et al.* ⁸, utilizando uma fonte geradora controlada de RF (869 – 894 MHz, 30 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 30 dias) e parâmetros similares, encontraram uma redução no diâmetro tubular médio e na espessura do epitélio seminífero. Aitken *et al.* ⁷, após exposição à fonte geradora controlada (900 MHz)

de 12hs por dia durante 7 dias, encontraram um significativo efeito genotóxico em espermatozoides do epidídimo, com dano ao DNA mitocondrial e no locus da β -globina nuclear.

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com o consequente dano oxidativo pode prejudicar a espermatogênese. O envolvimento das ROS na apoptose de células germinativas induzida por aquecimento já foi demonstrado ¹⁸. O presente estudo não demonstrou qualquer aumento na intensidade da peroxidação lipídica celular dos animais expostos.

A fonte emissora de RF escolhida no presente estudo, um telefone celular convencional, apresenta um fator limitante intrínseco que é a dificuldade de aferição da taxa de absorção específica. A potência dos telefones celulares durante as ligações é extremamente variável. Entretanto, por outro lado, tem o mérito de simular uma situação de exposição próxima a da realidade ². O tamanho médio do campo elétrico emitido pelo telefone foi aferido por um medidor de radiação com sonda isotrópica, na região escura da gaiola, em torno da qual os ratos ficavam concentrados durante a maior parte do tempo, e na região mais distante possível do aparelho. Ambas as medidas foram bem inferiores aos níveis necessários para que se desencadeie um processo de aquecimento ¹⁹.

Em conclusão, baseado nos dados obtidos pelo presente estudo, a RF emitida por um telefone celular móvel convencional não causou efeitos deletérios na função testicular de ratos adultos.

REFERÊNCIAS

1. Hyland, G. J.: Physics and biology of mobile telephony. *Lancet*, **356**: 1833, 2000
2. Ahlbom, A., Green, A., Kheifets, L. et al.: Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. *Environ Health Perspect*, **112**: 1741, 2004
3. Haidt, S. J., McTighe, A. H.: The Effect of Chronic Low-Level Microwave Radiation on the Testicles of Mice. *Microwave Symposium Digest, G-MTT International*, **73**: 324, 1973
4. Johnson, L., Lebovitz, R. M., Samson, W. K.: Germ cell degeneration in normal and microwave-irradiated rats: potential sperm production rates at different developmental steps in spermatogenesis. *Anat Rec*, **209**: 501, 1984
5. Dasdag, S., Ketani, M. A., Akdag, Z. et al.: Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urol Res*, **27**: 219, 1999
6. Dasdag, S., Zulkuf Akdag, M., Aksen, F. et al.: Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics*, **24**: 182, 2003
7. Aitken, R. J., Bennetts, L. E., Sawyer, D. et al.: Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl*, **28**: 171, 2005
8. Ozguner, M., Koyu, A., Cesur, G. et al.: Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J*, **26**: 405, 2005
9. Russel, L. D., Ettl, R. A., Sinha Hikim, A. P. et al.: Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, FL, USA: Cache River Press, 1990
10. Abercrombie, M.: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Record*, **94**: 239, 1946
11. Buege, J. A., Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **52**: 302, 1978
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265, 1951
13. Ichihara, G., Yu, X., Kito, J. et al.: Reproductive toxicity of 1-bromopropane, a newly introduced alternative to ozone layer depleting solvents, in male rats. *Toxicol Sci*, **54**: 416, 2000
14. Creasy, D. M.: Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol*, **25**: 119, 1997
15. Fejes, I., Zavaczki, Z., Szollosi, J. et al.: Is there a relationship between cell phone use and semen quality? *Arch Androl*, **51**: 385, 2005
16. Neuwinger, J., Behre, H. M., Nieschlag, E.: External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*, **54**: 308, 1990

17. Parslow, R. C., Hepworth, S. J., McKinney, P. A.: Recall of past use of mobile phone handsets. *Radiat Prot Dosimetry*, **106**: 233, 2003
18. Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J. et al.: Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod*, **61**: 393, 1999
19. IEGMP: Mobile Phones and Health. Report of an Independent Expert Group on Mobile Phones: UK Minister of Public Health. National Radiological Protection Board. Chilton, Oxon: www.iegmp.org.uk/report/index.htm, 2000

Tabela 1. Peso corporal e peso dos testículos e epidídimos e contagem de espermatozoides da cauda do epidídimo de ratos controles e expostos à RF emitida por um telefone celular convencional.

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Experimento	Valor <i>P</i>
	X ± DP	X ± DP	
Peso corporal (pc) (g)	427 ± 27	410 ± 34	0.29
Peso absoluto dos órgãos			
Testículos (g)	1.72 ± 0.08	1.77 ± 0.17	0.46
Epidídimos (mg)	269 ± 19	265 ± 25	0.72
Peso relativo dos órgãos			
Testículos (mg/g do pc)	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.6	0.20
Epidídimos (mg/g do pc)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.07
Contagem de espermatozoides			
(x 10 ⁶ / cauda)	88 ± 23	83 ± 18	0.64
(x 10 ⁶ / g cauda)	328 ± 91	319 ± 82	0.84

Tabela 2. Proporção média dos estágios do ciclo do epitélio seminífero de ratos controles e expostos à RF emitida por um telefone celular convencional.

Frequência dos estágios	Grupo Controle	Grupo Experimento	Valor <i>P</i>
	X ± DP	X ± DP	
I-VI	45.1 ± 5.8	42.5 ± 3.7	0.31
VII-VIII	23.9 ± 3.5	26.9 ± 2.5	0.08
IX-X	9.6 ± 1.1	8.4 ± 2.7	0.30
XI-XIII	17.4 ± 3.3	17.4 ± 4.0	0.98
XIV	4.0 ± 2.0	4.9 ± 1.6	0.36

Tabela 3. Parâmetros histológicos quantitativos de ratos controles e expostos à RF emitida por um telefone celular convencional.

Parâmetros Histológicos	Grupo Controle X ± DP	Grupo Experimento X ± DP	Valor <i>P</i>
Diâmetro tubular (µm)	383 ± 11	379 ± 22	0.65
Contagem celular bruta			
Espermátides redondas	182 ± 15	189 ± 8	0.28
Paquítenos	71 ± 3	72 ± 5	0.69
Células de Sertoli com nucléolos	9.9 ± 0.9	10.8 ± 0.9	0.06
Contagem celular verdadeira *			
Espermátides redondas	45.2 ± 3.6	47.4 ± 2.6	0.18
Paquítenos	14.9 ± 0.8	15.0 ± 1.1	0.84
Razões celulares			
Espermátides redondas / paquítenos	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.1	0.13
Espermátides redondas / cel. de Sertoli	4.8 ± 0.7	4.5 ± 0.4	0.33
Paquítenos / cel. de Sertoli	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.08

* Contagem bruta corrigida pela fórmula de Abercrombie¹⁰.



A

B

Figura 1. Cortes histológicos do testículo de um rato exposto à RF emitida por um telefone celular convencional, demonstrando a organização normal do epitélio seminífero no estágio VII-VIII (A) e estágio XIV (B). Er = espermátide redonda; Ea = espermátide alongada; Pa = paquíteno; Se = célula de Sertoli; Me = meiose (fixação em Bouin; inclusão em resina de glicol metacrilato; coloração com PAS e hematoxilina; magnificação final X 800).