

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-
PARASITÁRIAS / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Tatianne Rosa dos Santos

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A RADIAÇÃO
ELETROMAGNÉTICA EMITIDA POR APARELHO DE TELEFONIA
MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, NEONATAL
E O SISTEMA ENDÓCRINO DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*
BERKENHOUT, 1769)**

Juiz de Fora - MG

2016

TATIANNE ROSA DOS SANTOS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A RADIAÇÃO
ELETROMAGNÉTICA EMITIDA POR APARELHO DE TELEFONIA
MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, NEONATAL
E O SISTEMA ENDÓCRINO DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*
BERKENHOUT, 1769)**

Tese de Doutorado do Curso de Pós
Graduação em Ciências Biológicas, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Biológicas na área de Genética e
Biotecnologia

Orientador: Dr. Raúl Marcel González Garcia

Juiz de Fora

2016

TATIANNE ROSA DOS SANTOS

EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA EMITIDA POR APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO, NEONATAL E O SISTEMA ENDÓCRINO DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, 1769)

Tese de doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em 29 de março de 2016

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Scheila Cristina Potente Dutra Luquetti
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. João Henrique Moreira Viana
EMBRAPA

Dra. Mariana Sarto Figueiredo
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil! Mas também ninguém disse que seria! Chegar ao término desse trabalho que exige tanta dedicação e empenho se torna mais leve quando se está cercada de pessoas especiais. Agradeço com muito carinho estas pessoas que fizeram parte dessa etapa da minha vida e foram fundamentais para a concretização desse trabalho.

Aos estagiários, Yasmin, Lissa, Fernanda, Yamara, Arthur, pelas madrugadas e fins de semana de experimento, e mais que isso, pelo apoio, confiança, amizade, momentos de descontração, dedicação, carinho e até mesmo aprendizado, sem a ajuda de vocês com certeza a realização desse trabalho não seria possível. E especialmente às estagiárias Laís e Dani que além de tudo isso ainda ficaram até o último minuto me ajudando mesmo já envolvidas com outros projetos, não tem palavras pra descrever a gratidão que tenho por vocês.

Ao César, meu estagiário emprestado, que me socorreu em todos os momentos que precisei e nunca mediu esforços pra me ajudar. Obrigada pela amizade.

Aos amigos João Gabriel e Mariana com quem dividi tantos momentos desse trabalho, aflições e conquistas, por se empenharem sempre em me ajudar.

Aos amigos Luiz Caires e Camila Musso que além da convivência nos anos iniciais do doutorado sempre me apoiaram e me acolheram no laboratório.

À Cíntia pelas conversas e troca de experiências no laboratório.

À professora Mariana Sarto da UERJ, pelo acolhimento, carinho, incentivo, amizade e exemplo de dedicação à pesquisa. E aos professores Egberto Moura e Patrícia Lisboa por abrirem as portas de seu laboratório e viabilizar essa importante parceria.

Ao professor José Paulo pela ajuda com os cálculos de SAR.

Ao professor Manoel Couto pela ajuda com a histologia.

Aos pesquisadores da Embrapa João Henrique e Luiz Sérgio pelos conselhos dados durante a qualificação e disponibilidade em ajudar.

Aos professores da pós-graduação José Marcelo e Carlos Maranduba pelas conversas, conhecimentos compartilhados, confiança e sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos professores do departamento de fisiologia da UFJF, Carlos Mourão e Ana Eliza, pela ajuda com os testes comportamentais, diversas discussões sobre meu trabalho, disponibilidade e ajuda.

Ao professor José Otávio do Amaral Correa e à professora Scheila Cristina Potente Dutra Luquetti pela parceria estabelecida.

Ao técnico do laboratório Silvionei Augusto pela ajuda, ensinamentos, conversas, conselhos, disponibilidade, compreensão e amizade.

Ao meu orientador, Raúl Garcia, por conhecimentos adquiridos e orientação.

À Capes pela bolsa de estudos concedida e à Bioclin pelos recursos oferecidos.

Aos meus queridos amigos que fizeram com que essa caminhada fosse mais leve, me apoiaram e entenderam tantos momentos de ausência.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira participaram desse trabalho.

Muito obrigada !!!

RESUMO

O uso de telefones móveis suscita preocupações sobre as possíveis implicações para a saúde humana. Desde a introdução desta tecnologia a utilização de telefones celulares aumentou e estamos cada vez mais expostos à radiação eletromagnética. Devido à susceptibilidade do embrião, neonatos e crianças a qualquer efeito embriotóxico e subseqüentes consequências para neonatos e crianças causado por campos eletromagnéticos, a Organização Mundial da Saúde tem recomendado que se dê alta prioridade a investigações experimentais sobre os efeitos de radiação eletromagnética em mulheres grávidas e crianças. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de ondas eletromagnéticas irradiadas por aparelhos celulares sobre o desenvolvimento embrionário e neonatal, e seu possível efeito programador na prole de ratas Wistar submetidas. Para isso ratas prenhes foram expostas à radiofrequência emitida por telefones celulares (1,8 GHz) por diferentes períodos gestacionais. Foram analisadas a possível toxicologia materna, parâmetros reprodutivos, marcadores bioquímicos de toxicidade materna e peróxido de hidrogênio, além da concentração de hormônios sexuais (progesterona e 17 β -estradiol) e morfologia do ovário. No estudo da prole foi feito o acompanhamento neonatal do desenvolvimento físico e reflexológico. Atingindo a idade adulta, os machos foram submetidos a testes comportamentais e avaliação de conteúdo total e secreção de catecolaminas adrenais, corticosterona e glicose sérica. Aos 90 dias foi feito estudo da capacidade reprodutiva da prole (machos e fêmeas). Foi observado que a radiação emitida por aparelhos celulares foi capaz de aumentar a concentração sérica de 17 β -estradiol e peróxido de hidrogênio em ratas prenhes com 15 dias de gestação, além de levar a alterações no diâmetro de folículos ovarianos, porém não interferindo nos parâmetros reprodutivos analisados. Durante a exposição no período de fetogênese observou-se uma possível toxicidade hepática. E quando foi feita exposição durante toda a gestação foi observado que a radiação leva a alterações no tempo gestacional. Na prole adulta (machos) os resultados mostram um aumento no conteúdo total de catecolaminas acompanhado de uma diminuição da glicose no grupo exposto, mas sem alterações nos testes comportamentais. Alterações reprodutivas nos machos expostos à radiação durante a vida embrionária não foram observadas. Nas fêmeas expostas à radiação na vida intra-uterina foram observadas alterações na concentração sérica de 17 β -estradiol,

porém, sem comprometimento das suas funções reprodutivas. Diante dos resultados do presente estudo, especulamos que a radiação emitida por telefones móveis possui efeito sobre os processos reprodutivos além de um efeito programador da prole.

Palavras-chave: Telefones celulares, radiação, desenvolvimento embrionário, programação, hormônios, toxicologia reprodutiva

ABSTRACT

The use of mobile phones raises concerns about the possible implications for human health. Since the introduction of this technology the use of mobile phones has increased tremendously and we are increasingly exposed to electromagnetic radiation. Because of the susceptibility of the embryo, neonates and children at any embryotoxic effect caused by electromagnetic fields, the World Health Organization has recommended to give high priority to experimental investigations of radiation effects on pregnant women and children. This study aimed to evaluate the effect of electromagnetic waves radiated by cell phones on the embryonic and neonatal development, and its possible programmer effect in exposed Wistar rat's offspring. For that, pregnant rats were exposed to radio frequency emitted by mobile phones (1.8 GHz) for different gestational periods. The possible maternal toxicology, reproductive parameters, biochemical markers of maternal toxicity and hydrogen peroxide in addition to the concentration of sex hormones (progesterone and 17 β -estradiol) and ovarian histology, were analyzed. The evaluation of the offspring was conducted monitoring neonatal physical and reflexological development. Reaching adulthood, the rats were subjected to behavioral testing and evaluation of total content and adrenal catecholamine secretion, corticosterone and serum glucose. It was also evaluated the reproductive capacity of offspring (male and female) at 90 days of age. The radiation emitted by cell phones was able to increase the serum concentration of 17 β -estradiol and hydrogen peroxide in pregnant rats with 15 days of gestation also leading to changes in the diameter of ovarian follicles, but not interfering with reproductive parameters analyzed. A possible liver toxicity was observed during the period of fetogenesis. And when the exposure was taken throughout pregnancy it was observed that the radiation causes changes in gestational length. In the adult offspring (males) results show an increase in total content of catecholamine associated with by a glucose decrease in exposed group, but no change in the behavioral tests. No reproductive changes in males exposed to radiation during embryonic life were observed. In females exposed to radiation during intrauterine life changes were observed in serum concentration of 17 β -estradiol, but without compromising its reproductive functions. Given the results of this study, we speculate that the radiation emitted by mobile phones has effect on the reproductive processes as well as a programmer effect of offspring.

Keywords: embryonic development, hormones, mobile phones, programming, radiation, reproductive toxicology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O uso de telefonia móvel e fixa no Brasil entre os anos de 2011 e 2012. (Fonte: IBGE, 2015)	22
Figura 2. Assinaturas de aparelhos celulares, total e a cada 100 habitantes no período de 2005 a 2014, e por região (Fonte: ITU, 2014)	23
Figura 3. Espectro eletromagnético e suas aplicações (Fonte: disponível em: http://www.teleco.com.br/tutoriais/tutorialr/pagina_3.asp).	25
Figura 4. Gaiolas de experimento	40
Figura 5. Representação esquemática da gaiola utilizada para acomodar os animais durante os experimentos.	40
Figura 6. Mecanismo acionador dos aparelhos celulares A, dispositivo eletrônico micro-controlado; B, conexão com os telefones celulares; C, conexão com o no-break.	41
Figura 7. Identificação dos filhotes através de marcação com nanquim	47
Figura 8. Teste de resposta postural. A, representação do filhote na posição de decúbito dorsal e B, resposta do filhote ao teste.	48
Figura 9. Teste de geotaxia negativa. A, representação do filhote sendo colocado na rampa com a cabeça voltada para baixo e B, resposta do filhote ao teste.	49
Figura 10. Equipamento utilizado para o teste de esquiva inibitória.	51
Figura 11. Aparato utilizado para realização do teste de cruz elevada.	52
Figura 12. Variação da massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares ao longo dos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10, p > 0,05.	60
Figura 13. Ganho de massa corporal de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10, p > 0,05.	61

Figura 14. Variação da massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.....	61
Figura 15. Ganho de massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.....	62
Figura 16. Variação da massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante os primeiros 21 dias de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.	62
Figura 17. Ganho de massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante os primeiros 21 dias de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.....	63
Figura 18. Consumo estimado de ração por ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2º ao 15º dia de gestação. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.	63
Figura 19. Consumo estimado de ração por ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares no período de fetogênese. Os resultados mostram o consumo médio diário do 16º ao 19º dia de gestação. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.	64
Figura 20. Consumo estimado de ração por ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares no período gestacional. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2º ao 21º dia de gestação. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.	64
Figura 21. Dosagem sérica de ALT, AST, fosfatase alcalina e gama GT em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.	65
Figura 22. Dosagem sérica de ALT, AST, fosfatase alcalina e gama GT em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º	

ao 20º dia de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10. *p < 0,05.	66
Figura 23. Dosagem sérica de peróxido de hidrogênio em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, *p < 0,05.	67
Figura 24. Dosagem sérica de peróxido de hidrogênio em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.	67
Figura 25. Fetos de ratas expostas durante o período de fetogênese que apresentam membros mal formados. As flechas indicam membros mal formados.	72
Figura 26. Placentas com morfologia alterada proveniente de rata exposta à radiação do 16º ao 20º dia de gestação. As flechas indicam as placentas alteradas.	73
Figura 27. Ganho de massa corporal dos filhotes do sexo feminino do primeiro ao 90º dia de vida expostos ou não à radiação eletromagnética emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média ± EPM. n = 30, p > 0,05.	75
Figura 28. Ganho de massa corporal dos filhotes do sexo masculino do primeiro ao 90º dia de vida expostos ou não à radiação eletromagnética emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média ± EPM. n = 30, p > 0,05.	75
Figura 29. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o estabelecimento de memória de longo prazo em animais expostos ou não à radiação durante a vida intra-uterina. Dados expressos em mediana mais intervalo interquartilico. n = 30, p > 0,05.	79
Figura 30. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o desenvolvimento de ansiedade em animais expostos ou não à radiação durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média ± EPM. n = 30, p > 0,05.	79
Figura 31. Concentração do conteúdo total de catecolaminas (µM) de animais não exposto e expostos à radiação emitida por telefones celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média ± EPM. n = 10, p < 0,05.	80

Figura 32. Secreção basal de catecolaminas de animais não exposto e expostos à radiação emitida por telefones celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média \pm EPM. n = 10, p > 0,05.....	80
Figura 33. Secreção de catecolaminas adrenal em animais não expostos e expostos a radiação eletromagnética emitida por telefones celulares durante o período embrionário. Dados expressos como média \pm EPM. n = 10, p > 0,05.....	81
Figura 34. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o nível de glicose sérica em animais não expostos (n = 19) e expostos (n = 16) a radiação eletromagnética emitida por telefones celulares durante o período perinatal. Dados são expressos como média \pm EPM. p < 0.05.	82
Figura 35. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o nível de corticosterona total sérica em animais não expostos e expostos a radiação eletromagnética emitida por telefones celulares durante o período perinatal. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.	82
Figura 36. Número de espermatozoides de machos não expostos e expostos à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.....	86
Figura 37. Efeito da exposição de ratas prenhes durante os primeiros 15 dias de prenhez sobre o nível sérico de progesterona. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.	87
Figura 38. Efeito da exposição de ratas prenhes do 16 ^o ao 20 ^o dia de prenhez sobre o nível sérico de progesterona. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.	87
Figura 39. Efeito da radiação em ratas prenhes expostas ou não à radiação durante a vida intra-uterina sobre o nível sérico de progesterona. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.....	88
Figura 40. Efeito da exposição de ratas prenhes durante os primeiros 15 dias de prenhez sobre o nível sérico de 17 β -estradiol. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. *p < 0,05.	88

Figura 41. Efeito da exposição de ratas prenhes do 16^o ao 20^o dia de prenhez sobre o nível sérico de 17 β -estradiol. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.89

Figura 42. Efeito da radiação em ratas prenhes expostas ou não à radiação durante a vida intra-uterina sobre o nível sérico de 17 β -estradiol. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. *p < 0,05.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de permissividade elétrica relativa, espessura e condutividade elétrica para as camadas ar, pele, músculo, gordura e ovário considerando a frequência de 1.8GHz.	43
Tabela 2. Os valores de SAR para as duas polarizações (s e p) e o SAR total. Cada cálculo foi feito por três diferentes ângulos de incidência. O resultado representa o valor total de SAR dentro da camada de ovário.	59
Tabela 3. Massa dos órgãos maternos de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez.	68
Tabela 4. Massa dos órgãos maternos de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16 ^o ao 20 ^o dia de prenhez.	68
Tabela 5. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez.	70
Tabela 6. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16 ^o ao 20 ^o dia de prenhez.	70
Tabela 7. Variáveis fetais de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16 ^o ao 20 ^o dia de prenhez.	71
Tabela 8. Variação do tempo gestacional de ratas Wistar não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante o período gestacional.	74
Tabela 9. Variáveis fetais logo após o nascimento de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante todo o período gestacional.	74
Tabela 10. Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos filhotes do sexo feminino e masculino de ratas expostas ou não à radiação durante a gestação.	77
Tabela 11. Desenvolvimento reflexológico (em dia de aparecimento) dos filhotes do sexo feminino e masculino de ratas expostas ou não à radiação durante a gestação.	78
Tabela 12. Massa dos órgãos maternos de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina.	83

Tabela 13. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina.	84
Tabela 14. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes acasaladas com machos não expostos e expostos à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina.	85
Tabela 15. Percentual de espermatozoides morfologicamente normais e anormais de machos programados não expostos e expostos à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina	86
Tabela 16. População folicular de óvários de ratas prenhes não expostas e exposta à radiação durante os primeiros 15 dias de prenhez.....	90
Tabela 17. População folicular de ovários de ratas prenhes não expostas e expostas à radiação durante a vida intra-uterina.....	90
Tabela 18. Resultados obtidos no experimento 1	91
Tabela 19. Resultados obtidos no experimento 2	92
Tabela 20. Resultados obtidos no experimento 3	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANATEL	Agência Nacional de Telecomunicações
AST	Aspartatoaminotransferase
BA	Braços Abertos
BF	Braços Fechados
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CDMA	Code Division Multiple Access
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
ERB	Estações de Rádio Base
FCC	Federal Communication Commission
Gama GT	Gama glutamiltransferase
GHz	Gigahertz
GSM	Global System for Mobile Communications
HF	High Frequency
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HSP	Proteínas Heat-shock
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICE	Instituto de Ciências Exatas
ICNIRP	International Commission on Non-ionizing Radiation Protection
ITU	International Telecommunication Union
KHz	Quilohertz
MHz	Megahertz

OMS	Organização Mundial da Saúde
RF-EMR	Radiação Emitida por Campos de Radiofrequência
RFR	Radiação de radiofrequência
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reactive Oxygen Species
SAR	Specific Absorption Rate
SIDF	Sinais Indicadores de Desenvolvimento Físico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TDMA	Time Division Multiple Access
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UMTS	Universal Mobile Telecommunications System
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO	World Health Organization
4G	Quarta geração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. O Sistema de Telecomunicação Móvel.....	22
1.2. Radiação Eletromagnética de Radiofrequência.....	24
1.3. Exposição à Radiação e os Sistemas Biológicos	26
1.4 Toxicologia Reprodutiva.....	29
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo Geral	38
2.2. Objetivos Específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Animais.....	39
3.2. Preparação das Gaiolas para Manutenção dos Animais.....	39
3.3. Mecanismo Acionador dos Aparelhos Celulares	41
3.4. Cálculo da Taxa de Absorção Específica (SAR).....	42
3.5. Organização dos Grupos Experimentais	43
3.6. Avaliação da Toxicidade Materna	44
3.7. Estudo do Período de Pré-implantação e Organogênese (Experimento 1)	45
3.8. Estudo do Período de Fetogênese (Experimento 2).....	45
3.9. Estudo do Desenvolvimento Neonatal da prole (Experimento 3)	46
3.9.1. Desenvolvimento Físico	47
3.9.2. Desenvolvimento Reflexológico	48
3.10. Estudo dos Animais na Idade Adulta	49

3.10.1. Testes Comportamentais	49
3.10.1.1. Teste de Esquiva Inibitória	49
3.10.1.2. Teste de Labirinto em Cruz	51
3.10.2. Avaliação de Catecolaminas	52
3.10.2.1. Conteúdo Total	53
3.10.2.2. Secreção Basal e Estimulada de Catecolaminas	53
3.10.3. Avaliação da Glicemia e Corticosterona Total Sérica	54
3.10.4. Estudo da Capacidade Reprodutiva da Prole – Avaliação das Fêmeas	55
3.10.5. Estudo da Capacidade Reprodutiva da Prole – Avaliação dos Machos.....	55
3.11. Dosagens de Progesterona e 17 β -estradiol	57
3.12. Análises Histológicas	57
3.13. Análise Estatística	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. Taxa de Absorção Específica (SAR).....	59
4.2. Avaliação da Toxicidade Materna	60
4.3. Estudo do Período de Pré implantação e Organogênese (Experimento 1) e Estudo do Período de Fetogênese (Experimento 2).....	67
4.4. Desenvolvimento Neonatal	73
4.5. Estudo dos Animais na Idade Adulta	78
4.5.1. Testes Comportamentais	78
4.5.2. Avaliação das Catecolaminas	79
4.5.3. Nível de Glicose e Corticosterona Total Sérica	81
4.5.4. Capacidade Reprodutiva das Fêmeas.....	82
4.6. Dosagem de Progesterona e 17 β -estradiol	86
4.7. Análise Histológica	89
4.8. Resumo dos Resultados	91

5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÕES	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8. ANEXOS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. O SISTEMA DE TELECOMUNICAÇÃO MÓVEL

O uso da telefonia móvel teve início no Brasil no final de 1990, sendo inicialmente um serviço caro e restrito a pessoas de alta renda. Após a concessão desse serviço a empresas privadas o setor começou a se expandir cada vez mais rápido. A concorrência no mercado, a inovação em serviços e aparelhos, a redução das tarifas e os crescentes investimentos em marketing pelas empresas foram fatores que contribuíram para o forte crescimento do mercado de telefonia móvel (PACHECO, 2004). A telefonia móvel ganha cada vez mais mercado, esse fato pode ser demonstrado através de um comparativo entre o uso de celulares e o uso de telefones fixos, que demonstra que mais da metade da população brasileira em 2012 já utilizava apenas o celular em suas ligações. O censo 2011-2012 (IBGE, 2015) demonstra que no Brasil 72,7% de pessoas com 10 anos ou mais possuíam telefone celular (Figura 1).

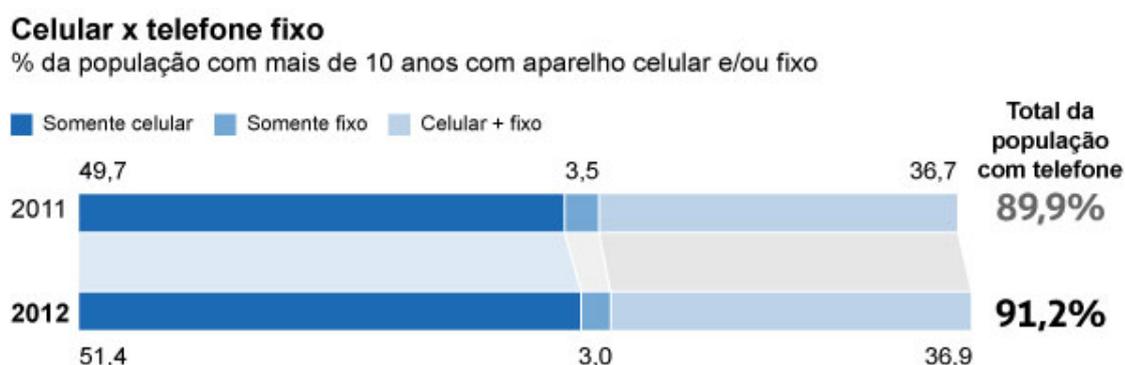


Figura 1. O uso de telefonia móvel e fixa no Brasil entre os anos de 2011 e 2012. (Fonte: IBGE, 2015)

A International Telecommunication Union (ITU) estimou que até o final de 2014 havia aproximadamente 7 bilhões de assinaturas de telefones móveis no mundo, correspondendo a uma taxa de penetração de 96%. Nos países em

desenvolvimento estão mais de três quartos de todas as assinaturas dos aparelhos celulares (Figura 2) (ITU, 2014). Em junho de 2015, o Brasil registrou 282,45 milhões de linhas ativas na telefonia móvel (ANATEL, 2015). Isto significa que no Brasil há 1,38 linhas ativas por habitante.

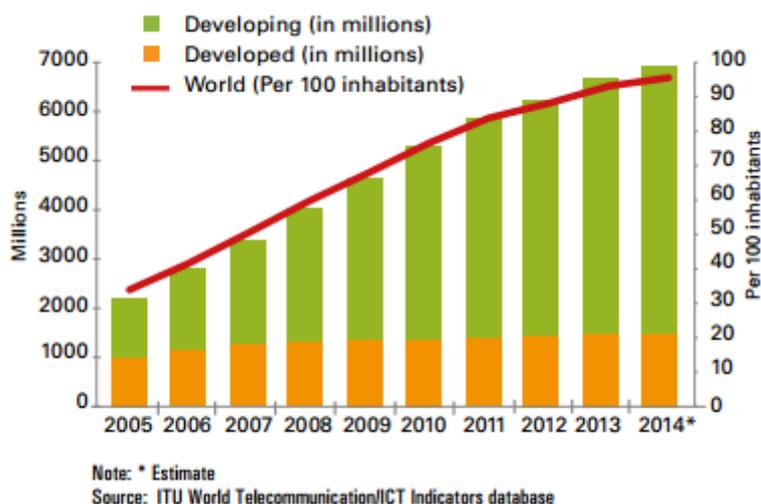


Figura 2. Assinaturas de aparelhos celulares, total e a cada 100 habitantes no período de 2005 a 2014, e por região (Fonte: ITU, 2014)

Acompanhando o aumento dos usuários de telefonia também houve o aumento do número de antenas de telefonia celular que são conhecidas como Estações de Rádio Base (ERB). Assim, também houve o aumento da quantidade de campos de irradiação no ambiente e conseqüentemente estamos mais expostos a esse tipo de radiação. Em novembro de 2015 haviam registradas 74.689 estações de rádio base no Brasil, sendo que mais da metade, 38.333, está instalada na região Sudeste (TELECO, 2016). Esta densidade de antenas na região Sudeste corresponde a uma antena a cada 15,04 Km², sendo que no Rio de Janeiro, estado com maior densidade de antenas do país, ela é de uma antena a cada 5,05 Km².

Muitos benefícios foram alcançados com a evolução da tecnologia na área da comunicação sem fio, graças a ela o mundo tornou-se mais conectado, o conhecimento se propagou mais rápido e as distâncias se encurtaram. Porém, talvez devido aos inúmeros benefícios dessa tecnologia, pouco se cogitou sobre seus malefícios ao ser humano e ao ambiente. Recentemente os efeitos de radiação

eletromagnética e suas conseqüências tem sido objeto de grande debate, tanto no meio público quanto na comunidade científica, e vem sendo questionado até que ponto a exposição a campos eletromagnéticos de baixa intensidade pode afetar os sistemas biológicos.

1.2. RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA DE RADIOFREQUÊNCIA

Os aparelhos celulares emitem energia de radiofrequência (ondas de rádio), uma forma de radiação eletromagnética não ionizante, que ao interagir com a matéria não possui energia suficiente para retirar elétrons de átomos que a constituem (ANATEL, 2014). Radiação de radiofrequência (RFR) é uma parte do espectro eletromagnético (Figura 3) com frequências de 30 kHz a 300 GHz, uma parte dessa RFR com as frequências mais elevadas (300 MHz a 300 GHz) é referida como microondas (YAKYMENKO et al., 2015). Esses aparelhos operam em alta frequência (HF), na faixa do espectro eletromagnético, para permitir chamadas de telefone sem fio e transferência de dados, incluindo a comunicação através da internet (ICNIRP, 2015).

A frequência exata usada difere entre as tecnologias (GSM - *Global System for Mobile Communications*; CDMA – *Code Division Multiple Access*; TDMA – *Time Division Multiple Access*, UMTS - *Universal Mobile Telecommunications System*, 4G – *Fourth Generation*, etc.) e entre os países (ICNIRP, 2015). O padrão digital mais comum de RFR para comunicação através de aparelhos móveis ainda é GSM (Global System for Mobile Communication), que utiliza frequências de 850, 900, 1800 e 1900 MHz. Com o aumento da velocidade de transmissão de dados há também o aumento da frequência em que operam esses aparelhos. No Brasil, o serviço 4G está sendo prestado na faixa de frequência de 2,5 GHz, a mesma usada em diversos países da Europa, da Ásia e do Oriente Médio (ANATEL, 2014).

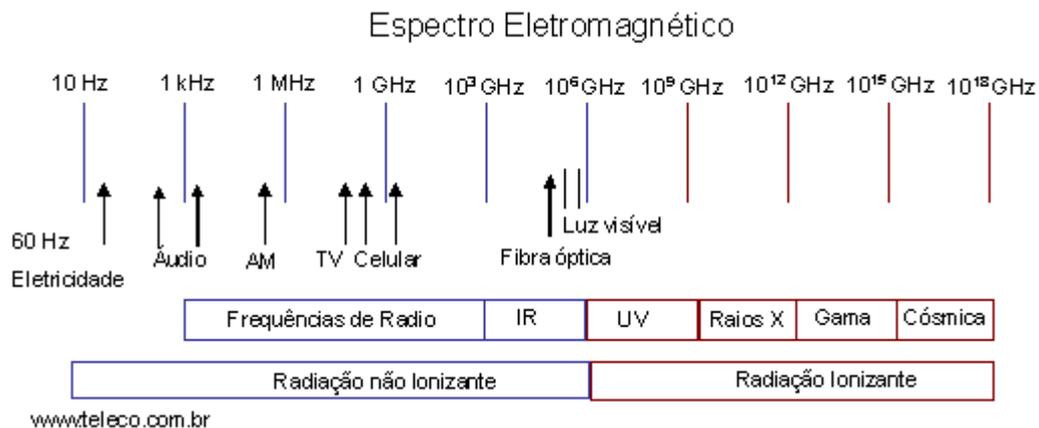


Figura 3. Espectro eletromagnético e suas aplicações (Fonte: disponível em: http://www.teleco.com.br/tutoriais/tutorialr/pagina_3.asp).

Campos HF permitem o transporte de grande quantidade de dados a uma taxa muito rápida e a grandes distâncias. Os sinais devem ser retransmitidos por uma rede de comunicação que compreende as estações de base e antenas e muitas vezes apoiados por uma rede com fio. Para economizar energia, um aparelho móvel regula automaticamente a intensidade do sinal e, portanto, o campo emitido para o nível de potência mais baixa possível para permitir uma conexão a ser feita. Um ambiente de transmissão fraca (por exemplo, causado pela estação base sendo muito distante ou pela presença de obstáculos como montanhas, prédios, árvores e assim por diante, entre a estação de base e o telefone móvel) irá resultar em uma maior potência de saída e emissão a partir do telefone móvel, a fim de efetuar uma ligação. Quanto melhor a conexão, menor é a saída de potência (ICNIRP, 2015).

Campos HF têm a capacidade de penetrar no corpo (ICNIRP, 2015) e há duas possibilidades distintas de como a saúde pode ser afetada em resposta à exposição à radiação emitida por campos de radiofrequência (RF-EMR), através de efeitos térmicos e não térmicos. O efeito mais reconhecido em sistemas biológicos é o aquecimento do tecido (WHO, 2015), sabe-se que os baixos níveis de exposição à radiação de rádio frequência podem resultar em pequenas mudanças de temperatura que causam alterações conformacionais em proteínas de choque térmico (WHO, 2015), uma importante família de proteínas produzidas pelas células em resposta à exposição a situações de estresse (YU et al., 2015). Por outro lado, diversos estudos demonstram que a radiação emitida por aparelhos celulares é capaz de causar vários efeitos em sistemas biológicos sem causar aumento na

temperatura corporal, chamados de efeitos não térmicos. Esses estudos incluem efeitos como genotoxicidade (FERREIRA et al., 2006; VIJAYALAXMI E PRIHODA, 2012; WHO, 2015), efeitos na função do sistema imune (JAUCHEM, 2008), de proteínas (BALAKRISHNAN et al., 2014), expressão gênica (ZALATA et al., 2015), sinalização celular (SUN et al., 2012; KESARI et al., 2014), estresse oxidativo (YAKYMENKO et al., 2015) e apoptose (MOTAWI et al., 2014; BEDIR et al., 2015), entre outros.

É recomendado que o aumento da temperatura no corpo seja restrito a fim de se evitar riscos para a saúde decorrentes da exposição à HF emitida por telefones móveis. Isto pode ser conseguido limitando a absorção de energia de alta frequência, que é expressa por um parâmetro conhecido como taxa de absorção específica, (representado pela sigla SAR, do inglês “*Specific Absortion Rate*”) (ICNIRP, 2015). A taxa de absorção de energia depende das características do tecido onde a radiação incide, com isso é importante destacar que diferentes tecidos expostos a uma mesma intensidade de radiação absorvem quantidades diferentes de energia. São estabelecidos limites de emissão e exposição a campos eletromagnéticos que são apresentados como valores de SAR, que levam em consideração o aumento térmico de 1°C produzido por uma quantidade específica de energia em 1g (padrão americano) ou 10g (padrão europeu) de massa de tecido (COSTA E FONTGALLAND, 2011). Nos Estados Unidos e na Europa, os valores limites são 1,6 W / Kg e 2,0 W / Kg, respectivamente (ICNRP, 1998; IEEE, 2005). O Brasil segue as recomendações da *International Commision on Non-ionizing Radiation Protection* (ICNRP) regulamentada pela Anatel (Agência Nacional de Telecomunicações) através da resolução nº303 de 2002 (ANATEL, 2002).

1.3. EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO E OS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os efeitos da RF-EMR emitida por aparelhos celulares disponíveis no mercado em sistemas biológicos têm sido amplamente debatidos. Estima-se que nos países industrializados o nível de radiação background tenha aumentado 5.000 vezes de 1985 a 2005 (MAES, 2005). Tais mudanças ambientais possuem um sério impacto na biologia e saúde humana, uma série de estudos epidemiológicos têm

sugerido o aumento de neoplasias em usuários que usam demasiadamente os aparelhos celulares (HARDELL, CARLBERG E HANSSON, 2005; HARDELL et al., 2007a; HARDELL et al., 2007b; SADETZKI et al., 2008; HARDELL E CARLBERG, 2009; HARDELL et al., 2011; SATO et al., 2011). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a radiação emitida pelo telefone móvel no grupo 2B de agentes possivelmente carcinogênicos (WHO, 2015). Nesta categoria são classificados os agentes para os quais existem evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos e menos que evidências suficientes de carcinogenicidade em modelos animais.

Alguns estudos indicam que a longo prazo a exposição a RF-EMR em seres humanos pode causar vários distúrbios não-cancerosos, como por exemplo: dores de cabeça, fadiga, depressão, zumbido, irritação de pele, distúrbios hormonais e outras condições (ABDEL-RASSOUL et al., 2007; BUCHNER E EGER, 2011, CHU et al., 2011, JOHANSSON, 2006; SANTINI et al., 2002). Além disso, estudos sobre os efeitos da radiação em células germinativas humanas têm sido publicados (AGARWAL et al., 2009; DE LULIIS et al., 2009). Muitos estudos já demonstram uma possível interferência da radiação não ionizante no processo reprodutivo, principalmente relacionada à infertilidade masculina: em homens expostos a radiação desses aparelhos há diminuição do número de espermatozóides viáveis (FEJES et al., 2005) e diminuição na motilidade desses espermatozóides (WDOWIAK, WDOWIAK E WIKTOR, 2007). Há ainda estudos que apontam danos no DNA dessas células devido, principalmente, ao estresse oxidativo causado pela exposição a ondas eletromagnéticas de radiofrequência (DE LULIIS et al., 2009). Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a exposição à radiação aumenta a fragmentação de DNA em espermatozóides já após três dias de exposição em modelos animais, além de ser responsável pelo aumento da mortalidade e diminuição na concentração dos espermatozóides (MUSSO, 2014).

Tem sido demonstrado que crianças apresentam maior susceptibilidade a agentes tóxicos, físicos e ambientais, em comparação aos adultos, especialmente nos sistemas reprodutivo, endócrino, e no sistema nervoso central (SNC). A susceptibilidade de cada órgão para o agente tóxico depende do período da embriogênese em que a exposição ocorre (TAKAHASHI et al., 2010), o que torna importante detectar possíveis alterações em diferentes fases gestacionais.

Considerando que crianças têm um tempo de vida de exposição maior quando comparados com os adultos, e a preocupação com a vulnerabilidade do desenvolvimento do sistema nervoso de crianças à radiofrequência, a OMS definiu os estudos relacionados ao risco na saúde das crianças de RF-EMR como prioridade.

Os estudos realizados até agora mostram resultados controversos. Alguns mostram efeitos na prole exposta no período pré-natal como alterações nas características eletrofisiológicas de neurônios (HAGHANI, SHABANI E MOAZZAMI, 2013) e redução do número de folículos ovarianos (GUL, CELEBI E UĞRAŞ, 2009). Além disso, foi demonstrado que ratas prenhes expostas à radiação emitida por celulares por 30 minutos por dia durante diferentes períodos da gestação apresentaram índices de reabsorção aumentados e possível toxicidade hepática e seus fetos apresentam retardo no processo de ossificação, além de alterações hematológicas e mudanças na expressão de genes envolvidos na organogênese (EL-SAYED et al., 2011). Aldad et al. (2012) sugerem o efeito programador da exposição in-utero à radiação de aparelhos celulares afetando o neurodesenvolvimento e o comportamento em camundongos. Por outro lado, outros estudos não mostraram nenhum efeito da exposição pré-natal a campos RF-EMR (OGAWA et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2010). Tomados em conjunto todos eles sugerem estudos adicionais sobre possíveis efeitos sutis na estabilidade do desenvolvimento, a fim de esclarecer sobre a sensibilidade dos organismos biológicos a campos magnéticos de baixa frequência.

Até agora, os mecanismos moleculares relacionados à possíveis efeitos não térmicos da RF-EMR não foram elucidados, mas tem sido sugerido que a radiação emitida por aparelhos celulares é responsável por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e óxido nítrico (SHAHIN et al., 2013; YAKYMENKO et al., 2015). ROS são relacionadas com muitas condições patológicas, como o crescimento e desenvolvimento prejudicado, o que pode ser devido ao fato de que espécies reativas de oxigênio afetam a comunicação entre cérebro, pituitária e ovário, interferindo na maturação do oócito, processo de ovulação e implantação do zigoto. Altos níveis de ROS e baixa atividade antioxidante são responsáveis pela diminuição da esteroidogênese (LIU, ZHANG E ZENG, 2006; PALACIO et al., 2006). Shahin et

al. (2013) demonstraram que ratas prenhes expostas à radiação apresentaram alta produção de espécies reativas de oxigênio e alta concentração plasmática de progesterona e estrogênio, o que prejudica o processo de implantação do embrião.

O aumento da produção materna de espécies reativas de oxigênio provoca mudanças na saúde materna, podendo indiretamente afetar a prole. O fígado é o principal órgão de desintoxicação, e já foi relatada a ocorrência de alterações hepatológicas em animais expostos a radiação (EL-BEDIWI et al., 2011). Juntamente com o aumento da produção de ROS também foi demonstrada a diminuição de enzimas antioxidantes, como resultado da exposição à radiação, conseqüentemente, os fetos que tiveram suas mães expostas durante a gestação apresentaram danos cerebrais (JING et al., 2012), o que pode levar a sequelas permanentes e influenciar o seu comportamento.

1.4 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

O ciclo reprodutivo inicia-se com a produção dos gametas nos pais (ainda no período pré-natal), seguido pela fertilização e desenvolvimento embrionário, nascimento e desenvolvimento pós-natal até atingir a maturidade sexual quando os descendentes, já adultos, tornam-se capazes de procriar. Dessa forma, diferentes fases da vida reprodutiva podem ser afetadas dependendo de quando o indivíduo foi exposto ao agente tóxico.

Quando estes agentes atuam na fase de fecundação - implantação (0-6 dias, em roedores), seus efeitos mais evidentes são o aborto ou a reabsorção; no período de organogênese (6-15 dias), o embrião sofre alterações profundas da morfogênese e na fase fetal (15-22 dias), os efeitos prováveis são a toxicidade, retardo no crescimento e alterações no sistema nervoso central (RABELLO-GAY, RODRIGUES E MONTELEONE-NETO, 1991).

Assim, a exposição durante a fase de implantação acarreta mais embriofetalidade do que teratogênese; no período de organogênese tanto pode haver teratogênese, caso as lesões produzidas sejam compatíveis com a vida ou embriofetalidade, se não o forem; no período fetal e neonatal os esboços dos órgãos já estão definidos e a maioria dos tecidos já está formada, nessa etapa as

malformações são menos freqüentes, mas o crescimento e a maturação fisiológica podem ser afetados por agentes tóxicos (BERNARDI, 2002).

A toxicologia reprodutiva dedica-se ao estudo de fatores que possam alterar o sistema reprodutor, o desenvolvimento do embrião e feto e o desenvolvimento pós-natal da prole. Podemos dividir esses estudos nos seguintes estágios:

Estágio 1. Maturação sexual à concepção. Avaliam-se as funções reprodutivas de machos e fêmeas adultas, o desenvolvimento e maturação de gametas, o comportamento sexual e o processo de fertilização.

Estágio 2. Concepção à implantação. São estudados as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento pré-implantação e o período de implantação propriamente dito.

Estágio 3. Implantação ao fechamento do palato duro. As funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento embrionário e a formação dos principais órgãos são os objetivos de estudo nesse estágio.

Estágio 4. Fechamento do palato duro ao final da gestação. Avaliam-se aqui as funções reprodutivas de fêmeas adultas, o desenvolvimento e crescimento fetal e o desenvolvimento e crescimento dos órgãos fetais.

Estágio 5. Nascimento ao desmame. Os focos de estudo são a função reprodutora de fêmeas adultas, adaptação neonatal à vida extra-uterina, desenvolvimento pré-desmame e crescimento.

Estágio 6. Desmame à maturidade sexual. Investigam-se as ações toxicológicas dos agentes durante o desenvolvimento e crescimento pós-desmame, adaptação da prole à vida independente até atingir a maturidade sexual. Aqui se investigam também a fisiologia e indícios de toxicidade materna.

Para que haja uma gestação bem sucedida vários fatores coordenados precisam ocorrer. Obtida a fertilização, a transferência para o útero se faz em diferentes fases – duas células, mórula, blastocisto, sendo essa última fase melhor para análise, visto que a quantificação morfológica dessa estrutura permite prever as chances do êxito na implantação do blastocisto (MARGANHA, PETERS E GUERRA, 2002).

No caso da implantação, é necessária uma sequência de interações bioquímicas e físicas entre blastocisto e útero, que conduz à formação de um contato íntimo e especializado entre trofoblasto e endométrio (ACOSTA, 1994). Essa requintada coordenação envolve a produção regulada de fatores de crescimento, citocinas e hormônios por tecidos embrionários e maternos, tanto de origem uterina quanto extrauterina (PSYCHOYOS, 1986). O trofoblasto, em particular, é muito eficaz na produção de vários hormônios e citocinas que mostram profundos efeitos sobre a fisiologia materna (PETRAGLIA et al., 1998; ROBERTS et al., 1999). Em adição, as células de trofoblasto expressam uma série de receptores na matriz extracelular e secreta proteases envolvidas na degradação de matriz que dão suporte à interação e à invasão através do endométrio (CROSS, WERB E FISHER, 1994; ALEXANDER et al., 1996). Janela de receptividade é o nome dado ao momento em que há receptividade endometrial, para que isso ocorra é necessário que haja um pico de estrogênio agindo no endométrio, sensibilizado previamente por concentrações elevadas de progesterona (PSYCHOYOS, 1986). Falhas na coordenação de eventos iniciais críticos para a implantação durante essa “janela de receptividade” resultam em perda gestacional precoce (CARSON et al., 2000). A janela de implantação, em roedores, tem duração de 12 a 24 horas (YOSHINAGA, 1988; PSYCHOYOS, 1996) e, em humanos, dura quatro dias (STRAUSS E COUTIFARIS, 1999).

No útero, a secreção de estrogênios ovarianos é responsável por tornar o estroma uterino receptivo para a implantação, assim como por estimular a proliferação de células epiteliais do endométrio, e a progesterona é responsável pela implantação do blastocisto e manutenção da gestação. O transporte do embrião pela tuba uterina é acelerado sob efeito do estrogênio, devido ao aumento da contratilidade tubária (VINIJSAMUN et al., 1990; CROXATTO et al., 1991). O desenvolvimento dos estágios de zigoto a blastocisto requer a presença de estrógeno e progesterona. A concentração inadequada destes hormônios leva à diminuição do número de embriões e do número de células por embrião (PARIA, SONG E DEY, 2001).

Ao ocorrer uma gestação, o concepto produz gonadotrofina coriônica que mantém o funcionamento do corpo lúteo pelo tempo inicial da gestação, até que a placenta ocupe seu lugar. O corpo lúteo produz esteróides (progesterona, estrogênio

e androgênio), inibina, relaxina, prostaglandina e derivados araquidônicos, neuro-hormônios, fatores de crescimento e citocinas, entre outras substâncias (GUERRA, 1995). Durante a gestação de ratos, o corpo lúteo aumenta rapidamente de tamanho, devido à hipertrofia das células lúteas, ao número aumentado de células endoteliais do corpo lúteo e o aumento do fluxo sanguíneo (BRUCE, MEYER E DHARMARAJAN, 1984; TAMURA E GREENWALD, 1987; GIBORI, 1993). Alta vascularização parece ser necessária para fornecer às células lúteas a grande quantidade de colesterol necessária à síntese de progesterona e também para que a progesterona produzida entre em circulação (SUGINO et al., 2001). O estradiol é necessário para o desenvolvimento do corpo lúteo e manutenção da função lútea durante a metade da gestação em ratos (TAMURA E GREENWALD, 1987; KASHIDA et al., 2001). Foi demonstrado que o estradiol é capaz de regular positivamente VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), importante proteína no processo de angiogênese (KASHIDA et al., 2001).

Embora inicialmente fosse considerado o papel da placenta na troca gasosa e transferência de nutrientes e resíduos, hoje já se sabe que os tecidos intra-uterinos (placenta, membranas fetais e decídua materna) estão envolvidas em atividades relacionadas à produção de hormônios e metabolismo, servindo como órgãos endócrinos. Estudos sobre a fisiologia placentária mostram que o modelo de interação da placenta se assemelha em muitos aspectos à organização do eixo hipotálamo-hipófise, no entanto, a placenta produz um número de hormônios que não são de outra forma sintetizados no organismo, o que sugere que um conjunto distinto de hormônios são necessários para a realização de alterações fisiológicas na gestação, em vez de simplesmente a produção de mais hormônios (PETRAGLIA, FLORIO E TORRICELLI, 2006).

A progesterona é um dos principais hormônios da gravidez, e é produzida pelo corpo lúteo, a partir do colesterol, até cerca de 10 semanas de gestação (em humanos), quando a placenta torna-se a principal fonte deste hormônio e os seus níveis aumentam durante a gestação. A placenta humana, por si só, não é capaz de diretamente produzir progesterona, então, converte o colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), vindo principalmente da circulação materna, primeiro em pregnenolona e em seguida, rapidamente em progesterona (ASPILLAGA ET AL., 1983; STRAUSS, MARTINEZ E KIRIAKIDOU, 1996). A

contribuição fetal é insignificante, já que a morte fetal não tem influência imediata sobre a sua produção (ASPILLAGA et al., 1983).

Estrógenos são também sintetizados pela placenta dependendo dos precursores de andrógenos circulantes (DHEA e DHEA-S), que são derivados tanto de andrógenos fetais quanto maternos (CHALLIS et al., 2000). DHEA-S fetal, produzida principalmente pelas adrenais fetais, é convertida pela sulfatase placentária a DHEA e, conseqüente em androsterona e testosterona, através de vias enzimáticas comuns para os tecidos produtores de esteróides. Esses andrógenos são aromatizados pela placenta em estrona e estradiol.

Pouco se sabe sobre os efeitos da radiação emitida por aparelhos celulares sobre os processos de implantação, organogênese e fetogênese e sua influência na concentração dos hormônios progesterona e estrogênio na gestação como um todo. Yuksel, Naziroglu e Ozkaya (2015) demonstraram que a concentração plasmática de estrogênio e progesterona apresenta-se diminuída em ratas prenhes expostas à radiação de aparelhos celulares, por outro lado, Shahin et al. (2013) demonstram aumento na concentração plasmática de estrogênio e alterações no número de implantes em estudo com camundongos, e Nakamura et al. (1997) apontam aumento de estrogênio tanto em ratas nulíparas quanto prenhes expostas à radiação. Há ainda um estudo realizado por Jin et al. (2013), no qual não foram encontradas alterações na concentração de estrogênio em ratas não prenhas.

Alterações no embrião e na nutrição fetal, bem como o estado do sistema endócrino durante a gestação, podem resultar em adaptações de desenvolvimento que produzem mudanças estruturais, fisiológicas e metabólicas permanentes e provocar a predisposição a doenças cardiovasculares, metabólicas e endócrinas na vida adulta (BARKER, 1992). A maioria dos estudos de teratologia existente na literatura centra-se em defeitos estruturais induzidos por um ambiente intra-uterino alterado durante a gestação. Enquanto evidentes defeitos estruturais são normalmente associados com deficiência funcional, o inverso não é necessariamente verdade. Alterações bioquímicas induzidas por insultos pré-natais que levam a déficits fisiológicos da função do órgão podem não ser sempre acompanhados por anormalidades anatômicas detectáveis (LAU E ROGERS, 2004). Assim, tem aumentado a atenção dada à teratologia funcional, uma extensão da

investigação para além de exames morfológicos para incluir as avaliações da integridade funcional dos órgãos e sistemas (KAVLOCK E GRABOWSKI, 1983; HERZYK et al., 2002; LAU E ROGERS, 2004).

Durante os períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação, lactação e adolescência, a prole é extremamente sensível a mudanças ambientais (tanto internas como alterações externas ao organismo), o que pode alterar a fisiologia de vários tecidos ao longo da vida (SIMMONS, 2005; BRENSEKE ET AL., 2013). Portanto, a exposição a mudanças ambientais no início da vida pode ser responsável por um fenótipo alterado na vida adulta. Este fenômeno é chamado de “programação” e sua origem está relacionada com modificações epigenéticas durante esses períodos críticos da vida (BURDGE et al., 2007). O feto em desenvolvimento tem a capacidade de desenvolver estratégias compensatórias para superar a programação através de alterações no ambiente uterino; estas compensações podem ser adaptativas, se eles suportam a sobrevivência ou perturbadoras, se comprometem a sobrevivência pós natal (GODFREY, GLUCKMAN E HANSON, 2010).

Enquanto algumas marcas epigenéticas são estáveis ao longo do tempo em tecidos particulares, outras demonstram plasticidade durante o desenvolvimento. Alterações epigenéticas ou “epimutações” que surgem através de um número diferente de mecanismos podem levar a uma variedade de doenças humanas. Tanto fatores genéticos quanto ambientais impactam marcas epigenéticas, gerando alterações fenotípicas dentro do padrão de normalidade a doenças.

Diversos fatores ambientais, como restrição alimentar materna (BEACHAMP E HARPER, 2015; VIEAU et al., 2016), desmame precoce (LIMA et al., 2011; YOUNES-RAPOZO et al., 2012, YOUNES-RAPOZO et al., 2015), exposição à nicotina (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011, LISBOA et al., 2015) entre outros (BEKDASH, ZHANG E SARKAR, 2014; CAROLAN-OLAH, DUARTE-GARDEA E LECHUGA, 2015; LANGLEY-EVANS, 2015; LEE, 2015; YOUNG, 2002); são capazes de programar o indivíduo em sua vida adulta, provavelmente contribuindo para doenças de início tardio, como doença cardiovascular, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica.

O sistema reprodutor também pode ser programado por fatores ambientais, sabe-se que o feto é extremamente sensível à exposição a hormônios esteróides durante seu desenvolvimento precoce. Os esteróides desempenham um papel crítico na trajetória dos tecidos e diferenciação de órgãos durante o desenvolvimento; compostos de desregulação endócrina que fazem sua sinalização por vias mediadas por esteróides durante os períodos críticos do desenvolvimento podem levar a consequências a longo prazo, como alterações comportamentais (JOST et al., 1973; GORSKI, 1986), alterações neuroendócrinas e disfunção do corpo lúteo culminando na falha reprodutiva precoce (PADMANABHAN E VEIGA-LOPEZ, 2014).

Neste contexto, pouco se sabe sobre o efeito da radiação do telefone celular sobre a programação da prole. Foi demonstrado que animais expostos à radiação emitida a partir de telefone móvel intra-uterina apresentaram desenvolvimento neuronal alterado na idade adulta (ALDAD et al., 2012) e que há o aumento da incidência de micronúcleos em eritrócitos na prole exposta durante a vida intra-uterina (FERREIRA et al., 2006). Estas são as poucas evidências experimentais de programação devido à exposição intra-uterina que temos conhecimento e mais experimentos são necessários para determinar o risco de exposição durante a gestação.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), também chamado de eixo de estresse, é uma parte do sistema endócrino que responde rapidamente a mudanças no ambiente ao longo da vida (GRACE, KIM E ROGERS, 2011). Estressores no período pré-natal aumentam as respostas do HPA ao estresse mais tarde na vida, aumentando o risco de distúrbios metabólicos. Da mesma forma, a atividade HPA na idade adulta é influenciada pela vida pós-natal, incluindo os cuidados maternos (MEANEY, SZYF E SECKL, 2007). Condições de estresse não só ativam o eixo HPA, mas também ativa o sistema simpatoadrenal, que resulta em altos níveis plasmáticos de corticosterona e catecolaminas (AXELROD E REISINE 1984; DE BOER, SLAGEN E VAN DER GUGTEN, 1988). Esses hormônios que regulam o metabolismo da glicose (HALTER, BERARD E PORTE, 1984) podem alterar a função do sistema nervoso central e potencializar o processo cognitivo e memória para estímulos associados com o estressor (MEANEY, SZYF E SECKL, 2007).

A epinefrina é liberada pela medula da glândula adrenal, quando o sistema nervoso simpático é estimulado. Consequentemente, uma das funções do sistema nervoso simpático (SNS) é a de aumentar a disponibilidade da glicose para o metabolismo energético rápido (GUYTON & HALL, 2011). O SNS e a medula adrenal também são afetados por fatores ambientais durante o desenvolvimento, podendo persistir na idade adulta, tornando uma permanente característica do indivíduo (YOUNG, 2002).

Um perfil alterado de catecolaminas e corticosterona, ambos importantes mediadores da reação de estresse e variações comportamentais, podem ser indicativos que o eixo HPA e o sistema simpatoadrenal tenham sido afetados pela radiação do telefone celular. Já foi demonstrado que a exposição à microondas emitidas por aparelhos celulares é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona materna (NAKAMURA et al., 1997) e também sabemos que a radiação emitida por aparelhos celulares é capaz de alterar perfil de catecolaminas (CAIRES, 2014) e comportamento (CAIRES et al., 2014), mas os estudos são escassos sobre os seus efeitos no período gestacional ou na prole exposta durante o período intra-uterino.

Embora tenha aumentado o conhecimento sobre os possíveis efeitos da radiação eletromagnética nos sistemas biológicos, as pesquisas encontradas na literatura são muito heterogêneas. Os estudos disponíveis aplicam diferentes metodologias de exposição à radiação, com duração de tempo de exposição que variam muito. E, muito importante, ainda não há, ao nosso entender, uma metodologia boa o suficiente que reproduza de maneira mais fidedigna a forma como as pessoas são expostas à radiação emitida por telefones móveis. Sendo assim, considerando a importância e a magnitude da contaminação com radiação eletromagnética, a falta de informações consistentes sobre os seus efeitos fisiológicos e os resultados obtidos previamente por nosso grupo (efeitos comportamentais, alteração do perfil de catecolaminas, fragmentação de DNA em espermatozoides e alterações na via de ERK), se torna necessário avaliar o efeito da radiação emitida por telefones celulares sobre o processo reprodutivo; o desenvolvimento embrionário e neonatal; e o possível efeito programador da radiação no sistema endócrino.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de ondas eletromagnéticas irradiadas por aparelhos celulares sobre o desenvolvimento embrionário e neonatal, e o parâmetros hormonais, reprodutores e comportamentais da prole de ratas Wistar submetidas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito tóxico da radiação sobre ratas prenhas.
- Estabelecer a interferência da radiação sobre o desenvolvimento embriofetal e neonatal da prole de ratas de Wistar.
- Avaliar o efeito da radiação sobre a secreção de hormônios nas mães expostas e na prole quando adulta (progesterona e estrogênio) e a sua relação com o desenvolvimento embrionário, neonatal e funções reprodutivas.
- Avaliar o efeito da radiação sobre catecolaminas, corticosterona e glicose em animais adultos expostos à radiação no período pré-natal.
- Avaliar o comportamento e a capacidade reprodutiva de animais na vida adulta que foram expostos à radiação no período pré-natal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFJF (Protocolos nº 52/2012, 76/2012 e 98/2012 – em anexo). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council U. S., 2011).

Ratas Wistar nulíparas com idade compreendida entre 90 e 100 dias, provenientes da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada, na proporção 3:1, na noite em que estavam na fase de proestro. Na manhã seguinte verificou-se o acasalamento através da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (dia 1 pós inseminação). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e com sistema de iluminação artificial em fotoperíodo de 12h claro/12h escuro. Todos os animais receberam ração comercial (Nuvital, Colombo, PR, BR) e água *ad libitum*.

3.2. PREPARAÇÃO DAS GAIOLAS PARA MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Gaiolas especiais (Figura 4) foram construídas para acomodar os animais durante os experimentos, as quais possibilitaram a exposição dos animais à radiação enquanto estes se movimentavam livremente, evitando assim alterações em consequência de estresse (CAIRES et al., 2014).



Figura 4. Gaiolas de experimento

As gaiolas medem 26 cm de altura, 44 cm de comprimento, 30 cm de largura, e nelas foi acomodada apenas uma fêmea de cada vez durante o período experimental. As gaiolas foram revestidas externamente com papel alumínio para evitar a dispersão da radiação emitida pelo aparelho celular aos animais controle bem como bloquear outras radiações. Os animais controles foram mantidos a uma distância de 3 m da gaiola contendo os animais expostos. As tampas das gaiolas têm vários furos com 0,5 cm de diâmetro para facilitar a ventilação dentro das gaiolas, e um largo furo no centro, no qual foi colocado um tubo de cloreto de polivinila (PVC). O tubo de PVC também tem furos de 0,5 cm e dentro dele foi mantido o telefone celular durante os experimentos, evitando assim o contato direto dos animais com o aparelho. A gaiola está esquematicamente representada na Figura 5.

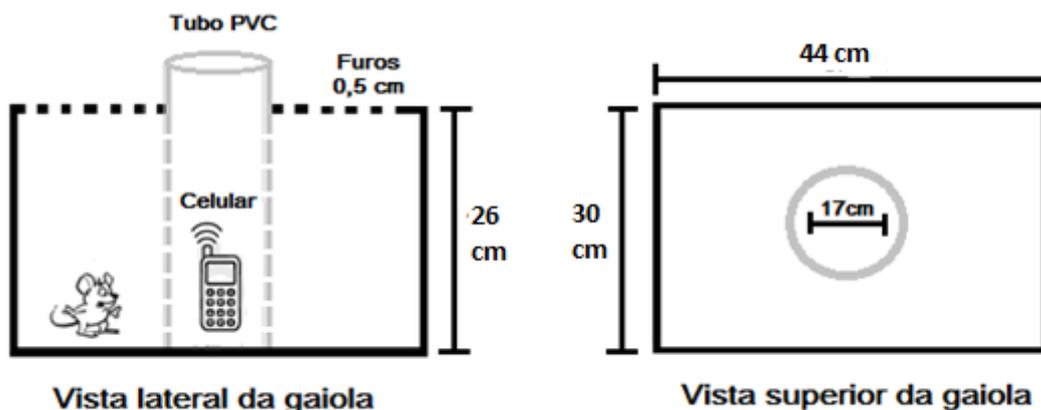


Figura 5. Representação esquemática da gaiola utilizada para acomodar os animais durante os experimentos.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mediram a intensidade do campo elétrico gerado pela radiação emitida pelo telefone celular dentro das gaiolas, sendo verificada a sua uniformidade, o que é importante porque os animais se movem livremente. Mensurações da intensidade do campo elétrico foram também feitas dentro das gaiolas dos grupos controles enquanto o aparelho celular estava funcionando dentro da gaiola dos animais expostos, com o objetivo de verificar se a radiação poderia afetar os animais controle.

A intensidade média do campo elétrico no interior da gaiola do grupo exposto foi $4,1 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$, enquanto a intensidade média do campo elétrico no interior da gaiola do grupo controle foi $0,45 \text{ V} \times \text{m}^{-1}$ (CAIRES, 2014), tal valor corresponde basicamente à radiação *background*, uma vez que permanece o mesmo após desligar o aparelho celular.

3.3. MECANISMO ACIONADOR DOS APARELHOS CELULARES

Para controlar o tempo de exposição à radiação dos animais foi utilizado um mecanismo acionador de telefone celular, já utilizado em outros trabalhos feitos em nosso laboratório. Esse mecanismo foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Ótica Aplicada, sob a coordenação do professor Dr. José Paulo Rodrigues Furtado de Mendonça do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF (Figura 6).

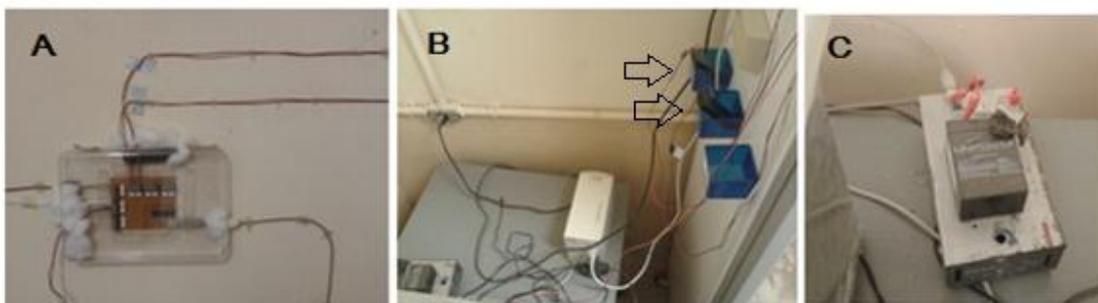


Figura 6. Mecanismo acionador dos aparelhos celulares A, dispositivo eletrônico micro-controlado; B, conexão com os telefones celulares; C, conexão com o no-break.

Os aparelhos celulares desse sistema operam a uma frequência de 1.8 GHz, o dispositivo eletrônico micro-controlado funciona como um timer e foi programado para ativar os aparelhos celulares para realizar ligações com duração de 25 segundos a cada 2 minutos durante os dias de experimento, das 19h às 07h. O horário foi estabelecido para que a exposição à radiação ocorra durante o período de maior atividade dos animais. Tanto o mecanismo acionador quanto os aparelhos celulares operam sem luz, som ou vibração.

3.4. CÁLCULO DA TAXA DE ABSORÇÃO ESPECÍFICA (SAR)

A taxa de absorção específica (SAR) fornece uma medida da energia absorvida a partir do campo elétrico por tempo por unidade de massa do tecido. A princípio, é possível obter o SAR por análise numérica e/ou medição experimental. A expressão mais simples para SAR (POLK E POSTOW, 1996) é dada por

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

onde σ é a condutividade elétrica (S / m) do tecido, ρ é a densidade da massa do tecido (kg / m³) e E é a intensidade do campo elétrico (V / m) do aparelho celular. A unidade da SAR é W / Kg.

Para calcular o valor de SAR, é necessário calcular o campo elétrico em cada camada. Neste estudo, foram considerados cinco meios ou camadas: ar, pele, músculo, gordura e ovário. O campo elétrico foi decomposto em duas polarizações: paralela (p) e perpendicular (s) para o plano de incidência do sistema. Assim, o SAR total é dado pela soma para cada polarização S e P. Outra questão importante a ser considerada foi o ângulo de incidência. Devemos considerar que o animal é livre para se mover dentro da gaiola e, conseqüentemente, não há um ângulo único de incidência. Para resolver isso, calculamos numericamente em três ângulos para saber a magnitude do SAR: 0°, 45° e 80°.

Os valores das propriedades físicas usados, considerando a frequência de 1.8 GHz, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de permissividade elétrica relativa, espessura e condutividade elétrica para as camadas ar, pele, músculo, gordura e ovário considerando a frequência de 1.8GHz.

Camadas	Propriedades físicas		
	Permissividade elétrica relativa	Espessura (mm)	Condutividade elétrica (S/m)
Ar	1	∞	0
Pele	29,4 ¹	0,77 ²	0,84 ¹
Músculo	46,7 ¹	2,07 ³	1,39 ¹
Gordura	5,35 ⁴	7,50 ³	0,078 ⁴
Ovário	46,39 ⁴	∞	1,82 ⁴

Fonte: ¹(PEYMAN, REZAZADESH E GABRIEL, 2001) ²(NGAWHIRUNPAT et al., 2002) ³Medidas realizadas no laboratório ⁴(FEDERAL COMMUNICATION COMMISSION – FCC, 2014)

Todos os cálculos do valor de SAR foram realizados em parceria com os professores Dr. José Paulo Rodrigues Furtado, da UFJF e Dr. Valmar Barbosa Carneiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.5. ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grandes experimentos: o estudo do efeito da radiação emitida por telefonia móvel (1.8 GHz) sobre 1) a pré-implantação e organogênese, 2) a fetogênese e 3) o período pós-natal até a vida adulta. O período de exposição à radiação foi do 1º dia de prenhez ao 15º para o estudo do período de pré-implantação e organogênese, do 16º ao 20º dia para o estudo de fetogênese e durante 21 dias de gestação para o estudo do desenvolvimento pós-natal até a vida adulta. Para cada grupo experimental houve um grupo controle que foi submetido às mesmas condições, porém sem exposição à radiação emitida pelo aparelho, cada um composto por 10 ratas prenhes.

3.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA

A toxicidade materna foi analisada através do ganho de massa corporal, hiper ou hipoatividade, piloereção, estereotipia, cromodaciorrêia, sangramento vaginal, diarreia e morte (CHRISTIAN, 2001). O consumo de ração foi estimado pela diferença de peso entre a quantidade colocada às 12 horas do dia anterior e o que restou na gaiola no dia seguinte.

Nas fêmeas dos experimentos 1 e 2 foi obtido sangue no momento da eutanásia para utilização em dosagens bioquímicas a fim de avaliar a possível toxicidade da radiação.

Foram feitas dosagens séricas da atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), gama GT e fosfatase alcalina utilizando kits específicos gentilmente cedidos pela empresa Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. As dosagens séricas de ALT e AST são indicadores específicos de lesão de hepatócitos. Enquanto a fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase (Gama GT) são enzimas que refletem colestase por obstrução intra ou extra hepática (PRATT E KAPLAN, 2000).

Uma das características mais evidentes de alterações patológicas de células do fígado é a alteração das enzimas ALT e AST no soro. Durante o dano celular, devido à alta permeabilidade da membrana do hepatócito, essas enzimas entram na circulação periférica e são observados aumento dos seus níveis (EL-BEDIWI et al., 2011). A enzima ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST encontra-se presente na mitocôndria. Em danos hepatocelulares leves a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto que em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT, para complementar o diagnóstico de possível lesão do fígado são feitas dosagens de fosfatase alcalina e gama GT que se elevam quando há lesão nas vias biliares (MESSIAS et al., 2010).

Também foram feitas dosagens séricas de peróxido de hidrogênio por colorimetria utilizando kit específico e de acordo com as orientações do fabricante (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

3.7. ESTUDO DO PERÍODO DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE (EXPERIMENTO 1)

Ratas no 1º dia de prenhez foram divididas aleatoriamente em um grupo experimental e um grupo controle, cada um contendo 10 animais. Foi feita a exposição à radiação até o 15º dia de prenhez, após esse período as ratas foram eutanasiadas por exsanguinação total sob anestesia (90mg/Kg de ketamina e 10mg/Kg de xilazina, via intraperitoneal), seguida de perfuração do diafragma. Após laparotomia foram removidos e pesados ovários, fígado, rins, adrenais e baço. Nos ovários foram contados, com o auxílio de microscópio estereoscópico, os corpos lúteos. Os cornos uterinos foram removidos e neles contados fetos vivos, mortos e reabsorvidos (inicial e tardiamente), para a determinação do índice de implantação, além das perdas pré- e pós-embriônicas. Fetos e placentas foram pesados. Os fetos foram fixados em Bouin e observados sob microscópio estereoscópico para a identificação de malformações em membros superiores e inferiores, fechamento de tubo neural e morfologia da face.

Foi retirado o sangue das mães através de punção cardíaca. O material foi mantido em banho-maria por 10 minutos e em seguida centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 1.811 G. O soro obtido foi separado, conservado em nitrogênio líquido para posteriores dosagens hormonal e bioquímica.

3.8. ESTUDO DO PERÍODO DE FETOGÊNESE (EXPERIMENTO 2)

Ratas no 15º dia de prenhez foram divididas aleatoriamente em um grupo experimental e um grupo controle, cada um contendo 10 animais. Foi feita a exposição à radiação do 16º até o 20º dia de prenhez, após esse período as ratas foram eutanasiadas como já descrito acima. Foram realizados os mesmos procedimentos de pesagem dos animais e órgãos, e mensuração do consumo alimentar.

Removido o sistema reprodutor, os ovários foram dissecados, pesados e seus corpos lúteos contados com auxílio de microscópio estereoscópico.

Os cornos uterinos foram seccionados, foram contados fetos vivos (os que se moveram espontaneamente ou sob o toque de uma pinça), mortos e reabsorções. Os fetos mortos e vivos foram pesados separadamente e sexados pela observação da distância anogenital. As placentas foram separadas do âmnio e do cordão umbilical e pesadas. Posteriormente, a ninhada foi eutanasiada por crioadestesia e, com o auxílio de microscópio estereoscópio, examinada para a verificação de malformações externas (fenda palatina, lábio leporino, polidactilia, extrofia cardíaca, celossomia, anoftalmia). Aleatoriamente dois fetos por ninhada (um macho e uma fêmea) foram necropsiados e o cérebro e fígado foram removidos e pesados.

Foi obtido o sangue para posteriores dosagens hormonal e bioquímica por métodos já descritos acima.

3.9. ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL DA PROLE (EXPERIMENTO 3)

Ratas no primeiro dia de prenhez foram aleatoriamente divididas em um grupo experimental e um controle, cada um contendo 10 animais. Os animais foram expostos durante 21 dias de gestação à radiação emitida por aparelho celular. Durante este período foi quantificado o consumo alimentar e o ganho de massa corporal materna. Foi registrado o dia de nascimento de cada ninhada e seu peso. Foi anotado o número de filhotes e proporção entre machos e fêmeas em cada ninhada, observando o estado físico de cada filhote.

Vinte e quatro horas após o nascimento da prole, as ninhadas foram padronizadas para ser compostas por três machos e três fêmeas. Aleatoriamente foram escolhidos um macho e uma fêmea para o acompanhamento do desenvolvimento físico (n= 10 por sexo, em cada grupo experimental) e esses filhotes foram identificados através de tatuagem feita na pele por nanquim (Figura 7).

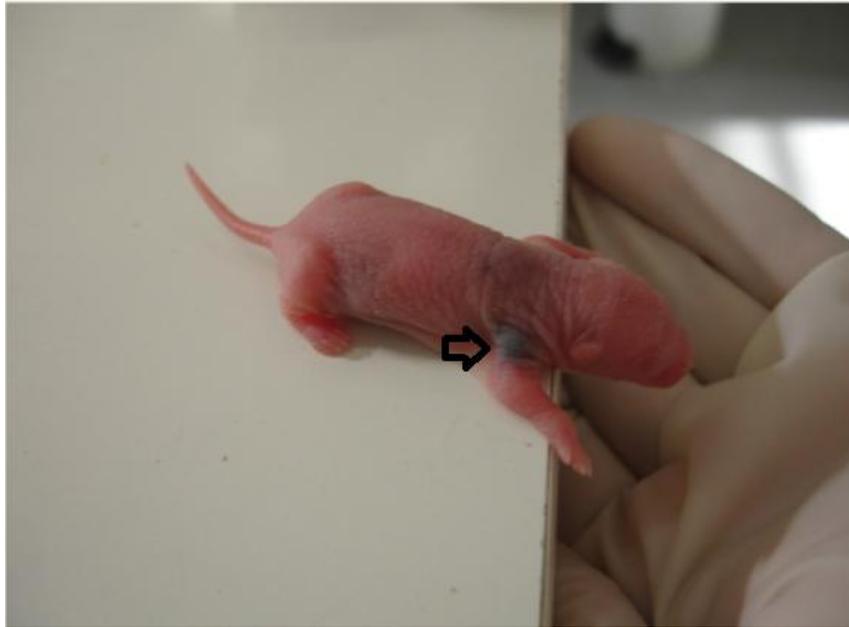


Figura 7. Identificação dos filhotes através de marcação com nanquim

A avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico da prole foram feitas anotando-se diariamente os seguintes dados:

3.9.1. Desenvolvimento físico

O desenvolvimento físico foi avaliado pelo ganho de massa corporal e sinais indicadores de desenvolvimento físico (SIDF).

Os filhotes marcados com nanquim foram pesados 24 horas após o nascimento, e no 4º, 7º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º, 45º, 60º, 75º e 90 dias após o parto (BAILEY et al., 2009). Como sinais indicadores do desenvolvimento físico da prole foram observados: abertura dos olhos, desdobramento das orelhas, aparecimento de lanugo e pêlos, erupção dos incisivos superiores e inferiores, a abertura vaginal. Foi considerada a data em que ocorreu em ambas as estruturas quando avaliadas estruturas pares (ALDER, 1983; SCHWARZ et al., 2003).

Para a observação do lanugo foi utilizada lupa de mão. O aparecimento dos pêlos foi considerado quando o animal estava todo coberto e na cor branca. A erupção dos dentes incisivos foi feita com a ajuda de um lápis atritando a gengiva. A

abertura vaginal foi considerada quando perfeitamente discernível. Nos machos não foi possível observar o aparecimento da separação do sulco balanoprepucial.

3.9.2. Desenvolvimento reflexológico

Foram feitos os testes de resposta postural e geotaxia negativa. No teste de resposta postural o filhote é colocado sobre uma mesa em decúbito dorsal e sua resposta é se voltar à posição de decúbito ventral (Figura 8).

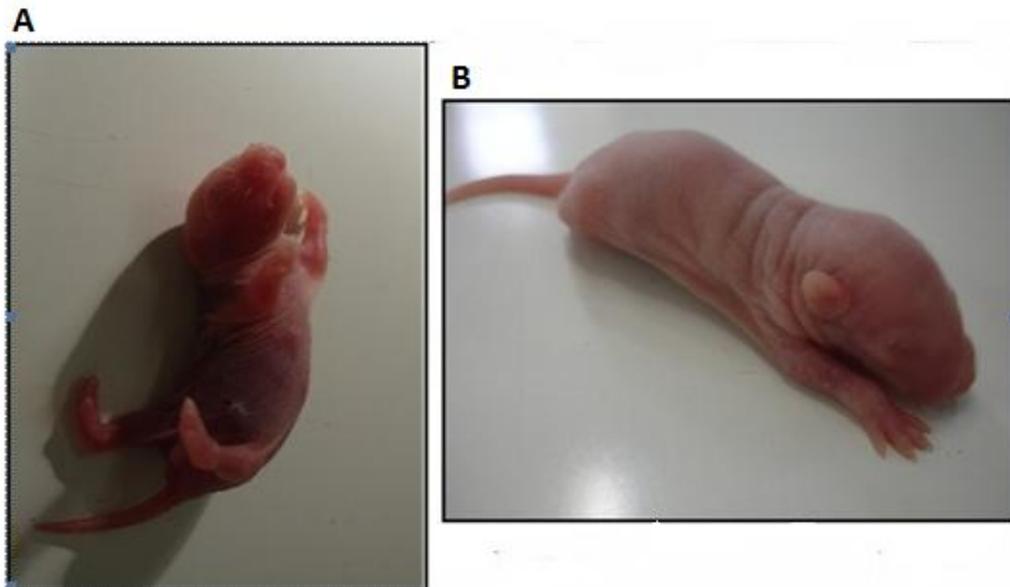


Figura 8. Teste de resposta postural. A, representação do filhote na posição de decúbito dorsal e B, resposta do filhote ao teste.

Já no teste de geotaxia negativa o animal é colocado sobre uma plataforma com uma inclinação de 30° posicionado com a cabeça voltada para baixo, observa-se o animal dar uma volta de 180° (Figura 9).

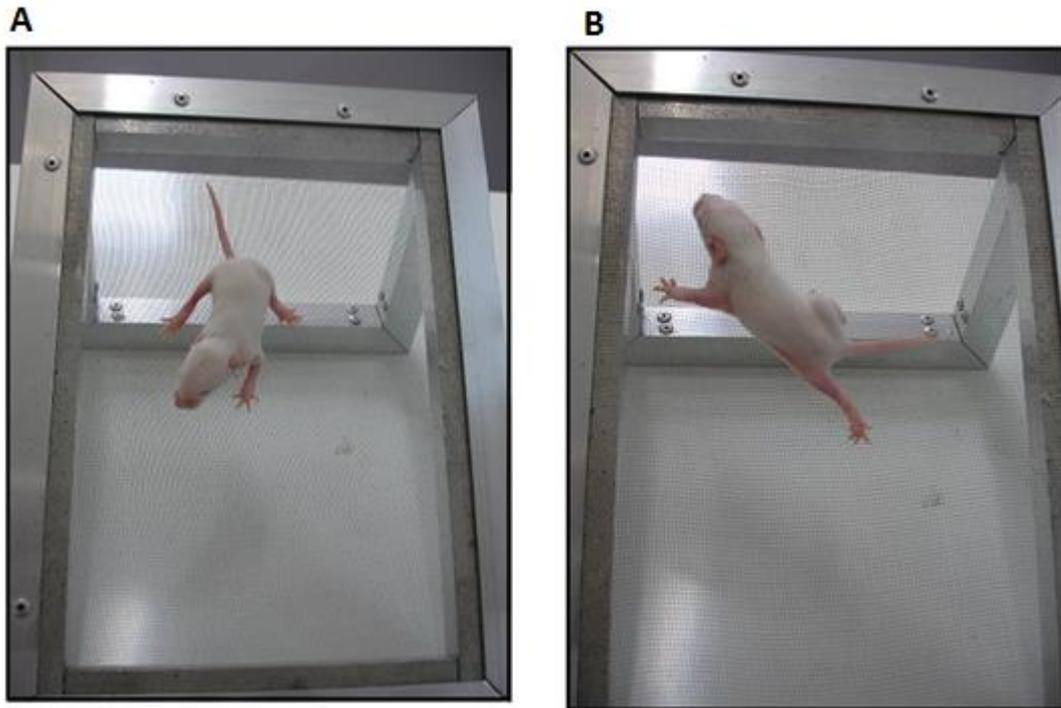


Figura 9. Teste de geotaxia negativa. A, representação do filhote sendo colocado na rampa com a cabeça voltada para baixo e B, resposta do filhote ao teste.

Os testes foram feitos diariamente, sempre no mesmo horário, até que todos os reflexos aparecessem, tendo duração de 15 segundos cada um (SILVA, 1991).

3.10. ESTUDO DOS ANIMAIS NA IDADE ADULTA

3.10.1. Testes comportamentais

A prole de machos quando completou 90 dias foi submetida ao teste comportamental de esquiva inibitória e teste de labirinto em cruz elevado. Esses testes foram feitos somente com os machos considerando que as variações hormonais das fêmeas de acordo com a sua fase do ciclo estral poderiam interferir nos resultados (JOHNSTON E FILE, 1990).

3.10.1.1. Teste de esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi utilizado para avaliar a memória a longo prazo dos animais, o modelo é um dos mais utilizados em relação a testes de memória e aprendizado (IZQUIERDO E MEDINA, 1977) e consiste em inibir a exploração do ambiente pelo animal através da aplicação de choques elétricos. O equipamento é constituído por uma caixa de metal com 50 cm de comprimento, 30 cm de largura e 30 cm de altura. Parte do chão é formada por barras paralelas de metal (2 mm de diâmetro) espaçadas por 0,5 cm. Outra parte compreende uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 de comprimento colocada junto à parede esquerda do aparelho, que proporciona aos ratos um abrigo do ataque eletrônico (Fig. 10). Na sessão de treino, o animal é colocado sobre a plataforma e se registra o tempo que o rato leva para descer da plataforma com os quatro membros. Imediatamente após a descida da plataforma, o animal recebe um breve choque elétrico suave (0,5 mA - 2 segundos). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, tempo necessário para que ocorra a consolidação de memória (aprendizado) pelos ratos (IZQUIERDO E GRAUDENZ, 1980), cada roedor foi, mais uma vez, posicionado na plataforma e o tempo gasto para posicionamento das 4 patas na grade do aparato foi medido - (período de latência), e este valor foi tratado como medida de memória de longo prazo; nenhum choque elétrico foi disparado nessa segunda etapa do teste. O tempo máximo de latência foi de 180 segundos, valor dado como memória de retenção. Por existir um teto de 180 segundos para latência nas sessões de treino e teste, os dados de esquiva inibitória foram analisados usando estatística não paramétrica (teste de Mann-Whitney), e foram apresentados como mediana e intervalo interquartil.



Figura 10. Equipamento utilizado para o teste de esquiva inibitória.

3.10.1.2. Teste de labirinto em cruz

O labirinto em cruz elevado é um método validado para explorar o comportamento de ansiedade (PELLOW et al., 1985). O equipamento consiste de estrutura de quatro braços, elevados 50 cm do chão, conectados por uma área central. Dois braços possuem paredes, sendo chamados de braços fechados (BF), e outros dois não possuem as paredes, correspondendo aos braços abertos (BA) (Fig. 11). Os animais foram colocados individualmente na área central, voltados para um dos braços abertos. Durante um período de teste de cinco minutos, o tempo gasto nos braços abertos e fechados foi medido por dois observadores sentados na mesma sala.

Em caso de estado de ansiedade, os roedores tendem a permanecer nos BF, evitando os BA, os quais seriam locais inseguros. Tal situação é apresentada pela diminuição na proporção do tempo gasto e do número de entradas nos BA (HOGG, 1996). A porcentagem do tempo gasto nos braços abertos (% tBA) foi determinado como: $\text{tempo nos BA} / (\text{tempo nos BA} + \text{tempo nos BF}) \times 100$. O uso de %BA, ao invés de considerar apenas as medidas de tempo gasto nos braços abertos é vantajoso considerando as possíveis variações de atividade locomotora de cada

indivíduo. As medidas dos graus de atividade nos braços abertos e fechados nos permitem corrigir os efeitos de maior ou menos atividade de exploração (RODGERS e DALVI, 1997).

Entre as observações de cada animal, a arena foi limpa com solução de álcool 70%.

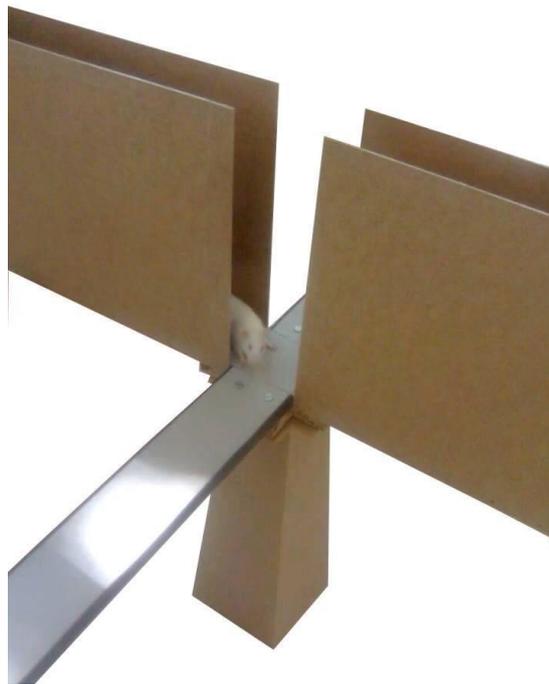


Figura 11. Aparato utilizado para realização do teste de cruz elevada.

Os dois testes, de esquiva e em labirinto, foram feitos no período noturno no qual os animais se encontram em maior atividade e foi usada como iluminação uma lâmpada vermelha. Os testes foram realizados com um intervalo de 2 dias afim de evitar que o manuseio dos animais interferisse no teste seguinte.

3.10.2. Avaliação de catecolaminas

No dia seguinte ao último teste comportamental os animais foram eutanasiados por exsanguinação total sob anestesia e imediatamente retiradas as glândulas adrenais.

3.10.2.1. Conteúdo total

Para a dosagem do conteúdo total de catecolaminas a glândula adrenal direita foi utilizada. As glândulas foram imediatamente congeladas em 500 µL de ácido acético 10% após sua retirada. Para extração de catecolaminas as adrenais foram homogenizadas no ácido acético e centrifugadas (5031 G por 5 min). Em seguida foi coletado o sobrenadante para posterior dosagem do conteúdo total de catecolaminas pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (KELNER et al., 1985).

A 50 µL de cada amostra foram adicionados 250 µL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e, a seguir, 25 µL de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi homogeneizada, incubada por 20 minutos e paralisada com 500 µL de ácido ascórbico (60mg/mL) / NaOH 5M, na proporção 1:19. Foram adicionados 2,0 mL de água destilada, sendo a solução novamente homogeneizada e submetida à leitura em espectrofluorímetro (Varioskan Flash, Thermo). Os comprimentos de onda para a leitura foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. Paralelamente à dosagem de catecolaminas foi feita uma curva padrão de adrenalina (Hipolabor) nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µM. Esta curva padrão foi utilizada para quantificar as catecolaminas dosadas. Todas as dosagens foram feitas em duplicata, com os tubos mantidos em banho de gelo durante todo o procedimento.

3.10.2.2. Secreção basal e estimulada de catecolaminas

Avaliamos a secreção de catecolaminas basal e estimulada por cafeína e potássio em medulas adrenais isoladas. Nestes experimentos, após a retirada das glândulas elas foram mantidas em tampão Krebs-Hepes, pH 7,2, até o momento da dissecação. Nos experimentos de estimulação da secreção de catecolaminas, foram avaliadas sob duas abordagens:

- 1- Em resposta á indução da despolarização da membrana plasmática com altas concentrações de potássio

2- Em consequência da mobilização de Ca^{2+} de *pools* intracelulares. Neste caso foi utilizada cafeína, um reconhecido mobilizador de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (ENDO, 1977).

As glândulas utilizadas nos estudos de secreção de catecolaminas tiveram as suas medulas dissecadas com o auxílio de microscópio estereoscópico, pinças e tesoura oftalmológica. Depois de dissecadas, as medulas foram mantidas em solução salina Krebs-Hepes com 0,5% de albumina. Esta solução salina foi composta por (em mM): Cl^- 154,26; Na^+ 143,4; Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,18; SO_2^{+4} 1,2; K^+ 5,9; glicose 11.1, HEPES 25.0; albumina de soro bovino – BSA 0,5%). O pH da solução salina foi de 7,2.

As estimulações foram feitas em placas Costar de 96 poços à temperatura ambiente. Para a medula de cada animal, foram utilizados seis poços consecutivos da placa. Os três primeiros poços continham solução salina Krebs-Hepes, o quarto, a solução estimuladora (solução Krebs-Hepes contendo 25 mM de cafeína ou 30 mM de potássio), e os dois últimos, também solução Krebs-Hepes salina. Em cada poço, o volume de solução foi de 200 μL e o tempo de incubação foi de 5 minutos.

Ao final da estimulação, as medulas foram colocadas em tubos *ependorf* com 220 μL de solução de ácido acético 10% (v / v), para posterior extração, por sonicação (60 MHz por 10 minutos), do conteúdo não secretado. A quantificação da secreção basal e estimulada (por cafeína ou potássio) e das catecolaminas remanescentes nas medulas adrenais foi realizada pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol, como descrito no item 3.10.2.1.

3.10.3. Avaliação da glicemia e corticosterona total sérica

Os machos adultos, os mesmos utilizados nos experimentos para avaliação de comportamento e catecolaminas, foram submetidos a jejum de 8 horas antes que se fizesse a avaliação da glicemia e corticosterona total. Como os animais são de atividade noturna o alimento foi retirado às 9h da manhã e as dosagens se iniciaram às 17h.

As amostras de sangue foram coletadas no momento da eutanásia por punção cardíaca e centrifugadas (1811 G; 5 minutos) para a obtenção do soro. Os níveis de glicose foram analisados por espectrofotometria, usando um kit de ensaio colorimétrico de glicose (Bioclin / Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Corticosterona total foi mensurada usando kit RIA para ratos (MP Biomedicals LLC, Orangeburg, NY, USA) com um ensaio de sensibilidade de 7,7 ng/ml e coeficiente de variação intra-ensaio de 4,4%.

3.10.4. Estudo da capacidade reprodutiva da prole – avaliação das fêmeas

No 90º dia de vida, uma fêmea proveniente de cada ninhada foi acasalada com machos de fertilidade previamente comprovada, na razão de 1:1. Foram considerados no máximo três ciclos estrais de coabitação com o macho, para isso foi feito esfregaço vaginal diariamente para acompanhamento do ciclo estral.

As fêmeas inseminadas foram pesadas no 15º dia de gestação quando foram eutanasiadas por exsanguinação total sob anestesia. Após laparotomia foram removidos e pesados ovários, fígado, adrenal direita e esquerda, rins e baço. Nos ovários foram contados os corpos lúteos. Os cornos uterinos foram removidos e neles foram contados fetos vivos, mortos e reabsorções para a determinação dos índices de implantação e taxas de reabsorção, além das perdas pré e pós-embrionárias. As ninhadas e as placentas também foram pesadas.

O soro obtido foi utilizado para a dosagem dos hormônios progesterona e 17 β -estradiol.

3.10.5. Estudo da capacidade reprodutiva da prole – avaliação dos machos

No 90º dia de vida os machos foram acasalados com fêmeas nulíparas. A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerada como o 1º dia de prenhez. No 15º dia de gestação as fêmeas inseminadas foram eutanasiadas por exsanguinação total sob anestesia. Os procedimentos após a eutanásia foram feitos como descrito no item anterior.

Após comprovado o acasalamento, os machos foram eutanasiados por exsanguinação total sob anestesia. Um pequeno corte foi feito na bolsa escrotal expondo o epidídimo do animal e com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, vários pequenos cortes foram feitos na cauda epididimal liberando o seu conteúdo. A quantidade referente a uma ponta de tesoura do conteúdo extravasado (~6 µL) foi coletada do epidídimo esquerdo. A amostra coletada foi usada para avaliar morfologia e concentração dos espermatozoides. Todas as análises foram realizadas sem o conhecimento prévio da origem do animal (grupo controle ou submetido à radiação).

Cada amostra de secreção coletada foi então transferida para 50 µl de salina isotônica (0,9 %, v / v, NaCl) em uma placa de Petri a 37 °C para dispersão dos espermatozoides. Uma diluição foi preparada transferindo 20 µl de cada amostra para 6 ml de água deionizada (1:300, v / v) para a determinação da concentração (número de espermatozoides por unidade de volume). As diluições foram feitas em duplicata e 10 µL de cada diluição foram transferidos para uma câmara de Neubauer (Improved Neubauer – 0,1 mm de profundidade). A contagem de espermatozoides foi realizada sob microscopia de luz (Olympus BX41) em um aumento de 400 x. As células foram contadas nos quatro quadrantes laterais em cada duplicata (MARQUES E OSHIO, 2009). A concentração de espermatozoides foi calculada segundo o *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* da seguinte forma:

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

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

Para análise da morfologia foram preparados esfregaços com dez µl de amostra. Os esfregaços foram secos ao ar, corados pelo método de coloração de Shorr de acordo com o *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (WHO, 2010) e armazenados para análise posterior. Todas as análises foram feitas sob um microscópio de luz em um aumento de 400 x (Olympus

BX41) pela mesma pessoa, 5 - 7 dias após a preparação de esfregaço. Ao menos 200 células foram avaliadas por lâmina para a determinação de anormalidades morfológicas.

3.11. DOSAGENS DE PROGESTERONA E 17 β -ESTRADIOL

Nas fêmeas expostas nos experimentos 1 e 2 e nas fêmeas (prole) no experimento 3, hormônios sexuais foram mensurados através do método de radioimunoensaio, usando kits comerciais para progesterona (Progesterone Double Antibody RIA Kit, 07170105 MP BIOMEDICALS), com um ensaio de sensibilidade de 0,11 ng/ml e um coeficiente de variação intra-ensaio de 4,9%; e estrogênio (17 β -ESTRADIOL (E2) Double Antibody RIA Kit, 07138102 MP BIOMEDICALS), com um ensaio de sensibilidade de 7,2 pg/ml e um coeficiente de variação intra-ensaio de 5,5% de acordo com instruções do fabricante. Essas dosagens foram feitas em parceria com o Laboratório de Fisiologia Endócrina da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

3.12. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Os ovários retirados das mães dos experimentos 1 e 2, e os ovários retirados da prole quando atingem a idade adulta (experimento 3) foram fixados em PBS + formol 10% e enviados para o Departamento de Histologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Todo o material foi emblocado e foram confeccionadas lâminas do material relativo aos experimentos 1 e 3, pois esses animais apresentaram alterações hormonais. Nesse material foram utilizados procedimentos de incorporação de parafina de rotina. As amostras de tecido previamente fixadas em formol a 10% tamponado foram desidratadas em uma série graduada de etanol, clarificadas em xilol e emblocadas em parafina. Secções de 4 μ m de espessura foram cortadas usando micrótomo deslizante (Leica Microsystems, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados utilizando microscópio (Primo Star,

Zeiss, Alemanha) e fotografados usando uma câmera acoplada (AxioCam, Zeiss, Alemanha).

A cada 20 secções histológicas em série obedecendo à posição anatômica do órgão, foram selecionadas cinco secções de cada ovário, totalizando 10 secções por animal e submetidas à análise morfológica e morfométrica. Na área total abrangida pela secção histológica, foi quantificado o número total de folículos primários, secundários e terciários. Para cada variável foi obtida a média das 10 secções.

A classificação histológica dos folículos ovarianos foi realizada segundo a preconizada por Freeman (1994), ou seja, folículo primário: oócito revestido por epitélio cúbico simples de células da granulosa; folículo secundário: oócito circundado por várias camadas de células da granulosa e células da teca e folículo terciário: oócito circundado por várias camadas de células da granulosa e com a presença do antro.

Foi analisado o tamanho dos folículos terciários, estes se repetiam em vários cortes sendo possível acompanhá-los e determinar seu maior diâmetro. Utilizou-se o software Zeiss. Após a obtenção do diâmetro médio de cada folículo terciário foi feita a somatória das medidas encontradas para os vários folículos terciários dos dois ovários. Obteve-se uma média desses valores que foi considerada o diâmetro médio dos folículos terciários por animal.

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), a menos que especificado de outra forma. Os dados foram analisados usando o teste “t” de Student não pareado. Os efeitos da exposição e as diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Apenas para análise dos parâmetros reprodutivos: número de corpos lúteos, implantes, fetos vivos e mortos, número de reabsorções e perdas pré e pós implantação foi utilizado o teste qui quadrado. O teste usado para avaliar os dados de esquia inibitória foi o Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prism 5.0 (GraphPad software, Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. TAXA DE ABSORÇÃO ESPECÍFICA (SAR)

Os valores encontrados para o SAR na frequência de 1,8 GHz e com intensidade incidente inicial do campo elétrico de 4,1 V / m são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Os valores de SAR para as duas polarizações (s e p) e o SAR total. Cada cálculo foi feito por três diferentes ângulos de incidência. O resultado representa o valor total de SAR dentro da camada de ovário.

F (Polarização)	θ (Ângulo)	SAR _p (mW/kg)	SAR _s (mW/kg)	SAR _{tot} (mW/kg)
0.00 (s)	0	0	0,244	0,244
	45	0	0,140	0,140
	80	0	0,0109	0,0109
0.50	0	0,122	0,122	0,244
	45	0,111	0,070	0,181
	80	0,0350	0,0055	0,0405
1.00 (p)	0	0,244	0	0,244
	45	0,222	0	0,222
	80	0,070	0	0,070

Assim, os resultados mostram que os valores do SAR para a camada de ovário estão bem abaixo dos valores da SAR para produzir um aumento significativo da temperatura. Na verdade, se for usada a equação:

$$\frac{DT}{Dt} = \frac{\langle SAR \rangle}{c}$$

e se utilizarmos o valor mais elevado de SAR obtido (ver Tabela 2) supondo que o calor específico do ovário é da ordem do calor específico da água, encontramos

$$\frac{DT}{Dt} = \frac{2.44 \times 10^{-4} \text{ W/kg}}{4200 \text{ J/kg}^{\circ}\text{C}} = 5.8 \times 10^{-8} \text{ }^{\circ}\text{C/s}$$

Estes resultados mostram que o efeito térmico não está presente ou pode ser considerado insignificante.

4.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna – piloereção, hipo ou hipermotilidade no interior da gaiola, estereotípias, cromodaciorréia, diarreia, perdas sanguíneas vaginais e mortes – em nenhum dos grupos estudados nos três experimentos. Também não foram observadas diferenças significativas da massa corporal materna (Figuras 12 a 17) ou consumo alimentar (Figuras 18, 19 e 20) entre o grupo não exposto e o exposto à radiação nos diferentes períodos gestacionais estudados.

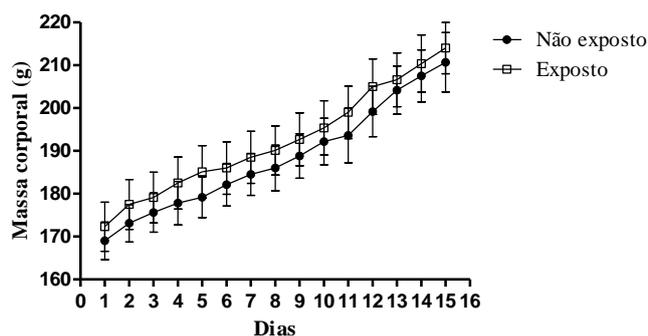


Figura 12. Variação da massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares ao longo dos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

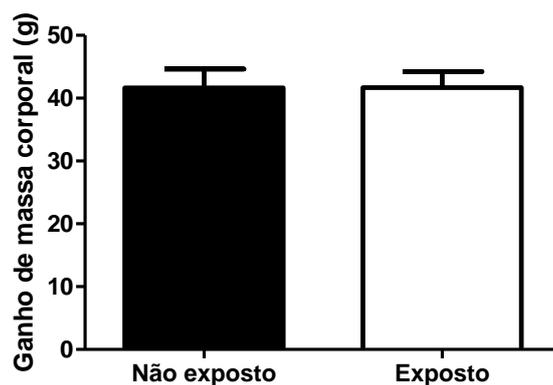


Figura 13. Ganho de massa corporal de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

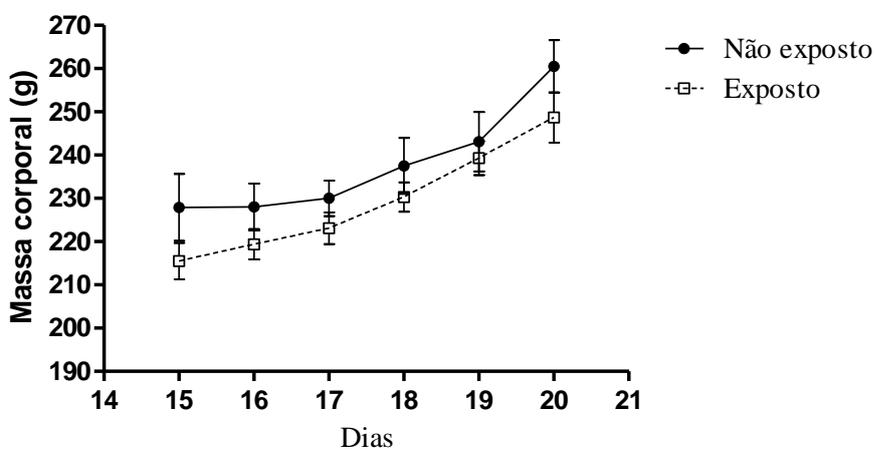


Figura 14. Variação da massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

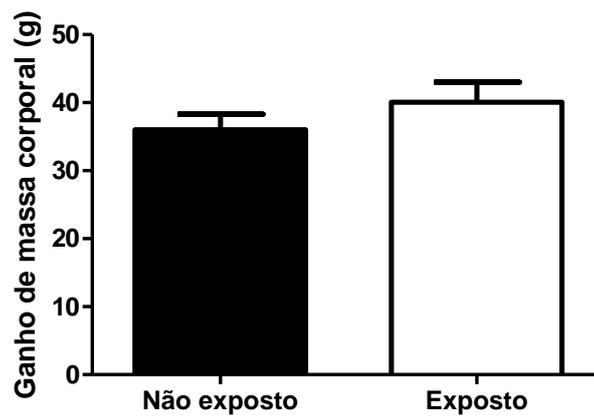


Figura 15. Ganho de massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16^o ao 20^o dia de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

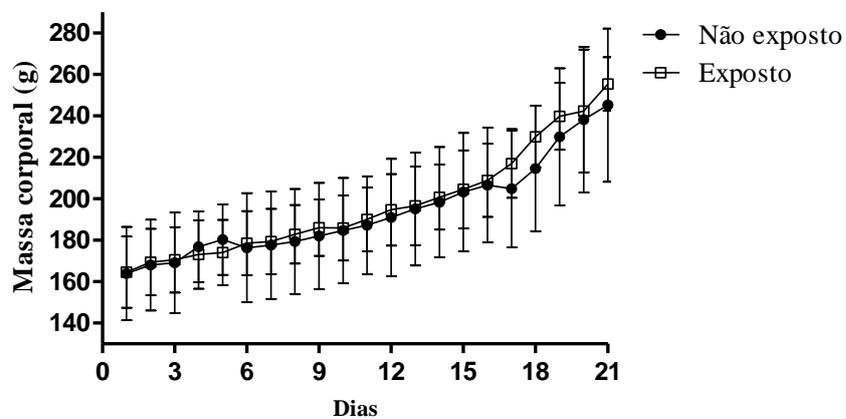


Figura 16. Variação da massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante os primeiros 21 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

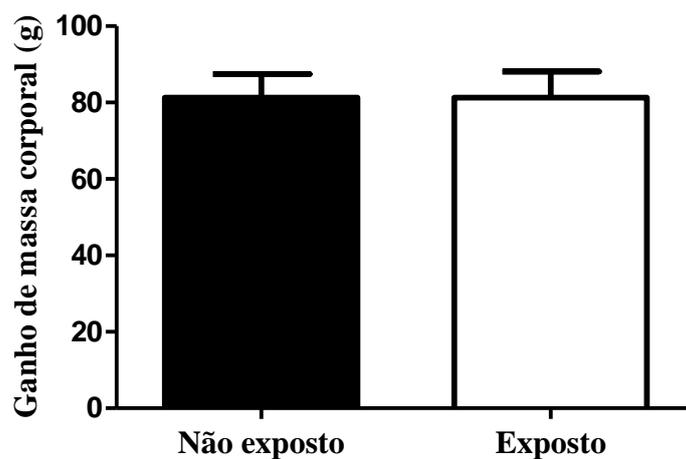


Figura 17. Ganho de massa corporal materna de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante os primeiros 21 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

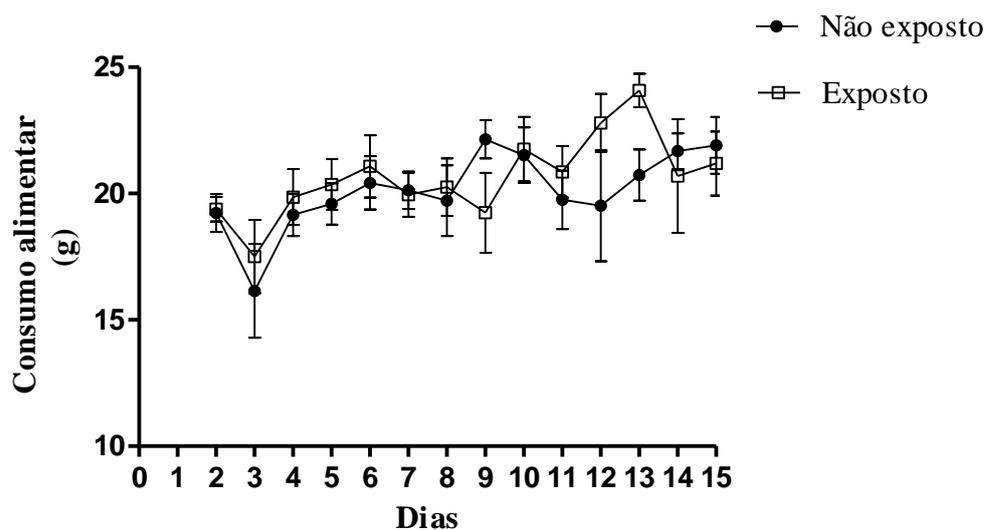


Figura 18. Consumo estimado de ração por ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2º ao 15º dia de gestação. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

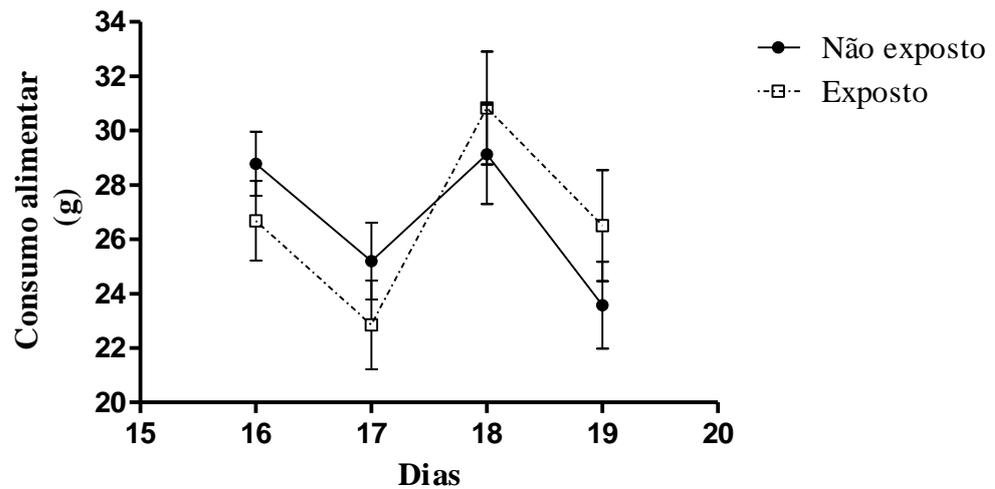


Figura 19. Consumo estimado de ração por ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares no período de fetogênese. Os resultados mostram o consumo médio diário do 16º ao 19º dia de gestação. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

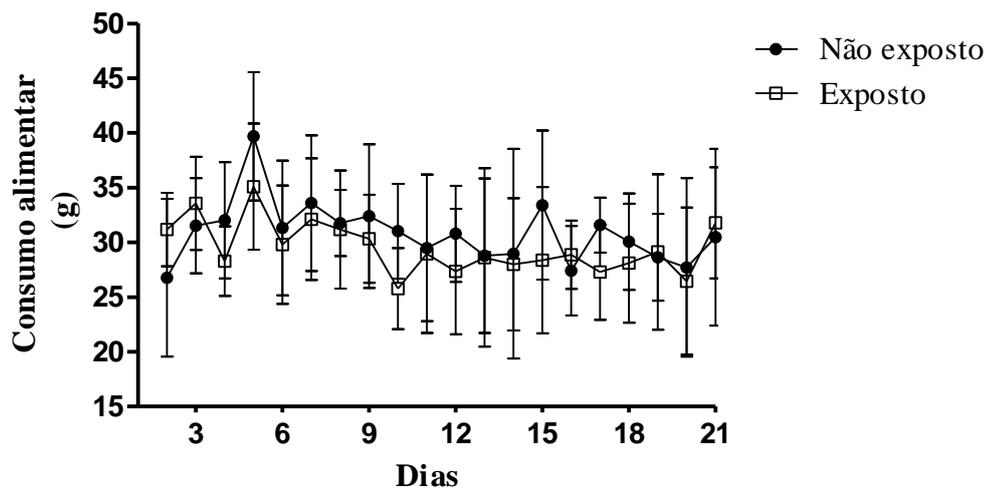


Figura 20. Consumo estimado de ração por ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares no período gestacional. Os resultados mostram o consumo médio diário do 2º ao 21º dia de gestação. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

Os resultados obtidos das análises bioquímicas das ratas eutanasiadas no 15º dia e no 20º dia de gestação estão expressos nas figuras 21 e 22, respectivamente. No experimento 1 (Figura 21) não houve variação significativa nas análises bioquímicas.

Já nas análises bioquímicas do experimento 2 (Figura 22) pode-se observar um aumento de 60,85% nos valores de fosfatase alcalina e um aumento de 26,25%

na transaminase ALT. Os demais valores encontrados não diferiram significativamente em relação ao grupo não exposto.

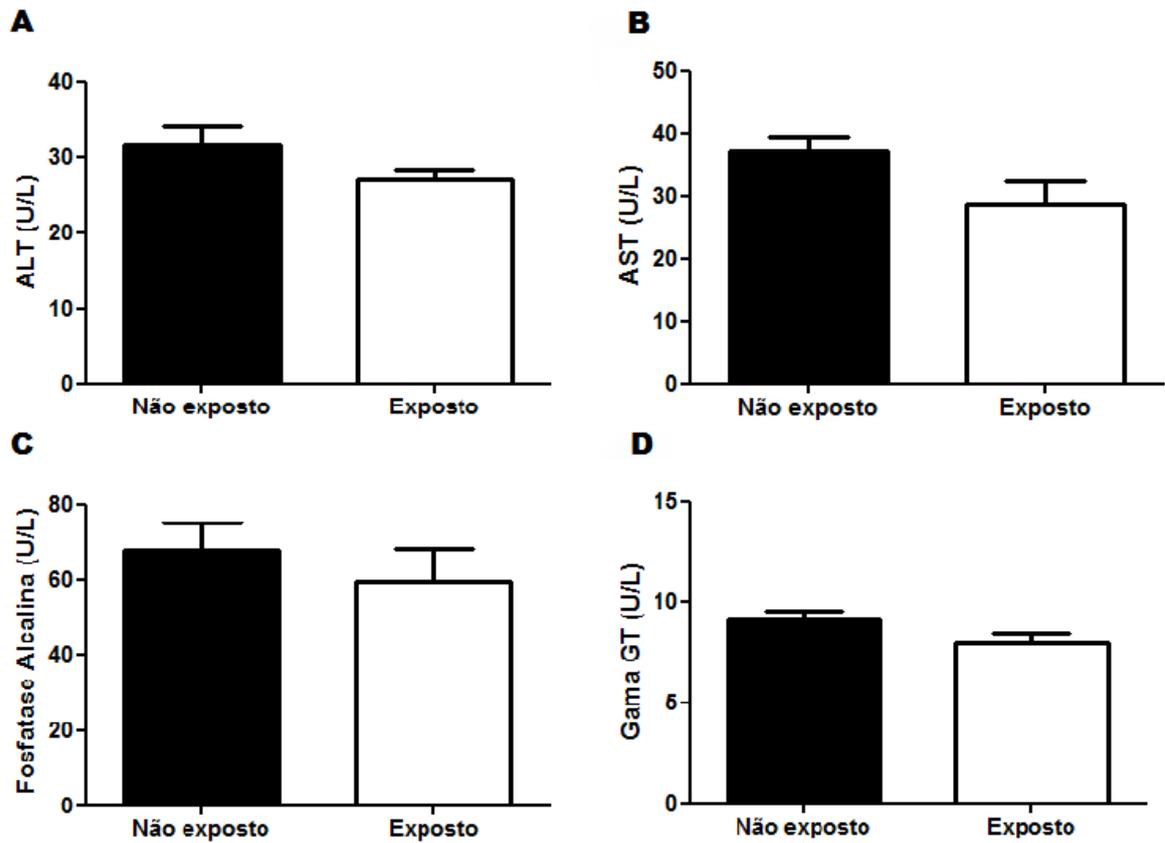


Figura 21. Dosagem sérica de ALT, AST, fosfatase alcalina e gama GT em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

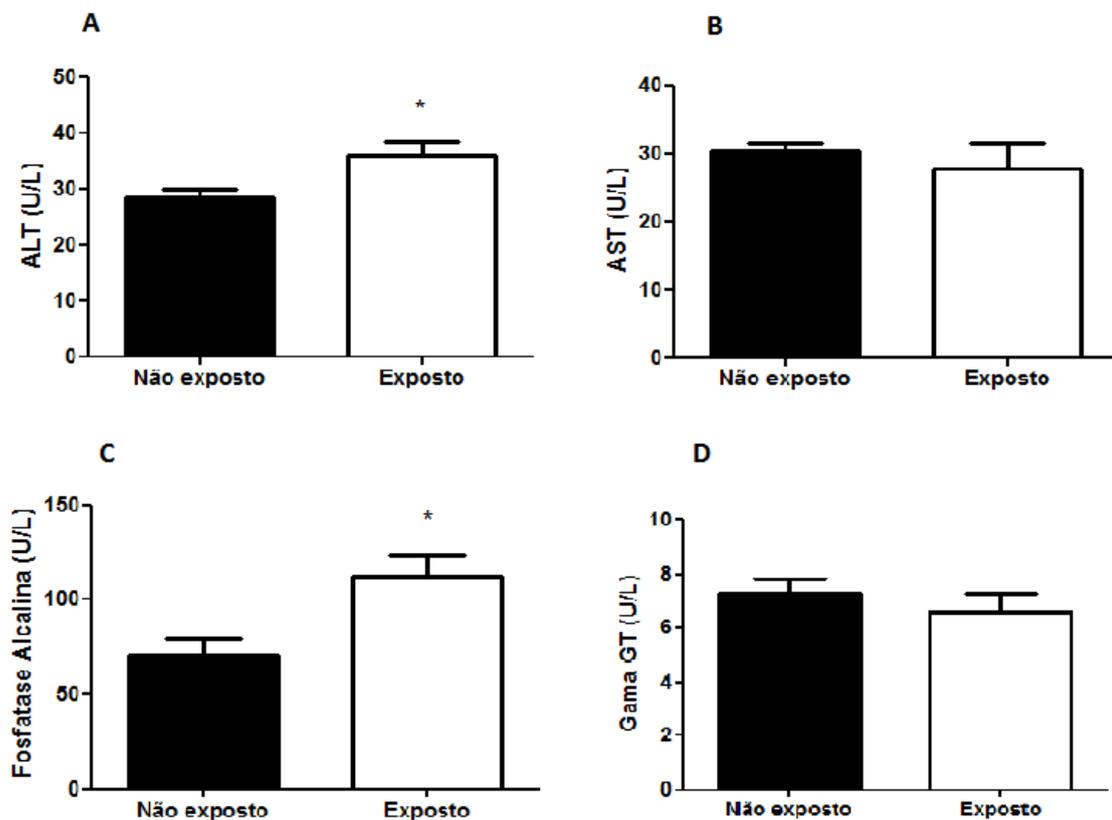


Figura 22. Dosagem sérica de ALT, AST, fosfatase alcalina e gama GT em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. *p < 0,05.

Os resultados obtidos nas dosagens de peróxido de hidrogênio das ratas eutanasiadas no 15º dia e no 20º dia de gestação estão expressos nas figuras 23 e 24, respectivamente. Nas mães que foram expostas durante os primeiros 15 dias de prenhez foi encontrado um aumento significativo de 60,93% no nível sérico de peróxido de hidrogênio quando comparados ao grupo não exposto. Já nos animais que foram expostos do 16º ao 20º dia de prenhez não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

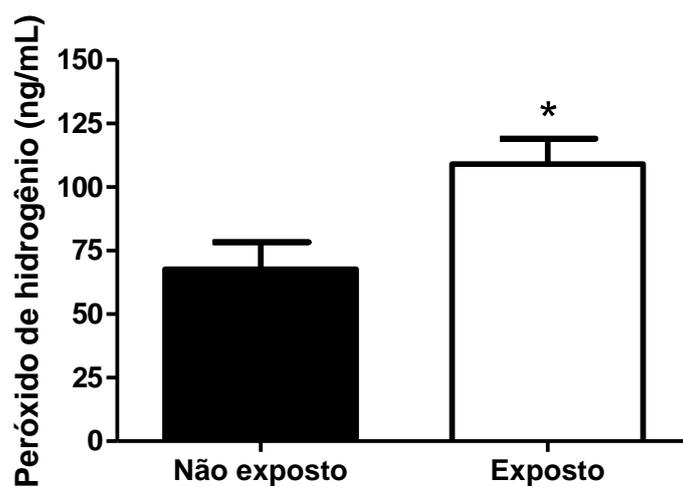


Figura 23. Dosagem sérica de peróxido de hidrogênio em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $*p < 0,05$.

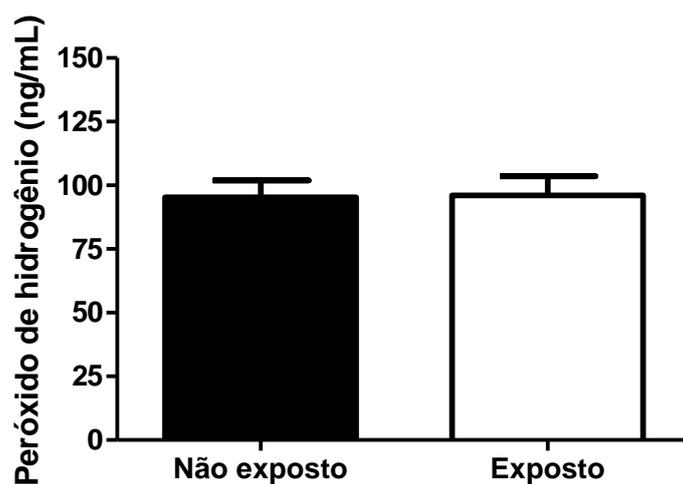


Figura 24. Dosagem sérica de peróxido de hidrogênio em ratas prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16^o ao 20^o dia de prenhez. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

4.3. ESTUDO DO PERÍODO DE PRÉ IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE (EXPERIMENTO 1) E ESTUDO DO PERÍODO DE FETOGÊNESE (EXPERIMENTO 2).

Nas variáveis maternas das ratas eutanasiadas no 15^o dia e 20^o não foi observada alteração significativa na massa dos órgãos analisados (Tabelas 3 e 4, respectivamente).

Tabela 3. Massa dos órgãos maternos de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez.

Órgãos maternos	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Fígado		
Massa absoluta (g)	9,456 ± 0,335	9,495 ± 0,325
Massa relativa (g)	0,04488 ± 0,00053	0,04412 ± 0,00118
Rins		
Massa absoluta (g)	1,665 ± 0,065	1,683 ± 0,056
Massa relativa (g)	0,00789 ± 0,00015	0,00781 ± 0,00018
Baço		
Massa absoluta (g)	0,495 ± 0,016	0,497 ± 0,013
Massa relativa (g)	0,00236 ± 0,00007	0,00231 ± 0,00007
Adrenais		
Massa absoluta (g)	0,068 ± 0,003	0,065 ± 0,001
Massa relativa (g)	0,00032 ± 0,00001	0,00030 ± 0,00001
Ovários		
Massa absoluta (g)	0,058 ± 0,002	0,053 ± 0,005
Massa relativa (g)	0,00028 ± 0,00001	0,00025 ± 0,00001

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

Tabela 4. Massa dos órgãos maternos de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16^o ao 20^o dia de prenhez.

Órgãos maternos	Grupos	
	Não exposto	Exposto

	Não exposto	Exposto
Fígado		
Massa absoluta (g)	10,72 ± 0,505	10,90 ± 0,225
Massa relativa (g)	0,04249 ± 0,00078	0,04444 ± 0,00055
Rins		
Massa absoluta (g)	1,56 ± 0,059	1,58 ± 0,036
Massa relativa (g)	0,00629 ± 0,00008	0,00636 ± 0,00019
Baço		
Massa absoluta (g)	0,466 ± 0,015	0,474 ± 0,016
Massa relativa (g)	0,00191 ± 0,00003	0,00192 ± 0,00008
Adrenais		
Massa absoluta (g)	0,063 ± 0,002	0,067 ± 0,003
Massa relativa (g)	0,00025 ± 0,000005	0,00028 ± 0,000012
Ovários		
Massa absoluta (g)	0,073 ± 0,003	0,076 ± 0,004
Massa relativa (g)	0,00028 ± 0,00001	0,00031 ± 0,00001

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

Os parâmetros reprodutivos analisados são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Considerando o experimento 1 o número de corpos lúteos apresentou uma redução significativa de 6,45% no grupo exposto (Tabela 5). Não houve diferença significativa no número de implantes, fetos vivos, fetos mortos, reabsorções, assim como não houve diferença nas perdas pré-implantação e pós-implantação. Também não houve diferença significativa na massa de fetos e ninhadas por grupo e nem na massa de fetos e ninhadas pesados individualmente. No experimento 2 (Tabela 6), não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis reprodutivas analisadas.

Tabela 5. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares nos primeiros 15 dias de prenhez.

Variáveis	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Corpos lúteos	124	116*
Implantes/grupo	111	108
Fetos vivos/grupo	106	97
Fetos mortos/grupo	0	0
Reabsorções/grupo	5	11
Perdas pré-implantação (%)	10,38	7,02
Perdas pós-implantação (%)	2,37	10,44
Massa fetos/ninhada (g)	1,558 ± 0,08	1,412 ± 0,12
Massa fetos/individual (g)	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Massa placentas/ninhada (g)	1,513 ± 0,08	1,426 ± 0,07
Massa placentas/individual (g)	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02

Dados expressos em números absolutos, porcentagem ou média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

Tabela 6. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez.

Variáveis	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Corpos lúteos	129	133

Implantes/grupo	120	116
Fetos vivos/grupo	112	103
Fetos mortos/grupo	0	0
Reabsorções/grupo	8	13
Perdas pré-implantação (%)	6,81	12,96
Perdas pós-implantação (%)	7,17	12,39
Massa fetos/ninhada (g)	21,420 ± 4,07	20,679 ± 5,66
Massa fetos/individual (g)	1,990 ± 0,52	2,182 ± 0,93
Massa placentas/ninhada (g)	4,729 ± 0,984	4,323 ± 1,178
Massa placentas/individual (g)	0,438 ± 0,114	0,455 ± 0,194

Dados expressos em números absolutos, porcentagem ou média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

As variáveis fetais do experimento 2 (proporção de machos e fêmeas, massa do fígado e massa do cérebro) são apresentadas na Tabela 7. Não houve diferença significativa nessas variáveis. Também não foram observadas alterações morfológicas nos fetos analisados com 15 dias (dados não mostrados), porém dois fetos com 20 dias provenientes de diferentes mães do grupo exposto apresentaram alterações na formação da pata anterior e tamanho reduzido quando comparado com fetos dos grupos não expostos (Figura 25). Porém, como os membros são formados na fase gestacional anterior à que foram expostas as mães, esses dados foram considerados não relacionados à exposição à radiação. As placentas (Figura 26) provenientes de uma rata do grupo tratado do experimento 2 apresentaram morfologia diferente quando comparada com o grupo controle, porém a massa dessas placentas não apresentou alteração significativa.

Tabela 7. Variáveis fetais de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares do 16º ao 20º dia de prenhez.

Variáveis fetais	Grupos	
------------------	--------	--

	Não exposto	Exposto
Número de machos/ninhada	5,00 ± 0,462	5,22 ± 0,493
Número de fêmeas/ninhada	4,75 ± 0,674	5,00 ± 0,600
Massa cérebro ♂ (g)	0,127 ± 0,010	0,106 ± 0,006
Massa cérebro ♀ (g)	0,120 ± 0,003	0,117 ± 0,003
Massa fígado ♂ (g)	0,150 ± 0,010	0,141 ± 0,011
Massa fígado ♀ (g)	0,138 ± 0,006	0,149 ± 0,009

Dados expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.



Figura 25. Fetos de ratas expostas durante o período de fetogênese que apresentam membros mal formados. As flechas indicam membros mal formados.

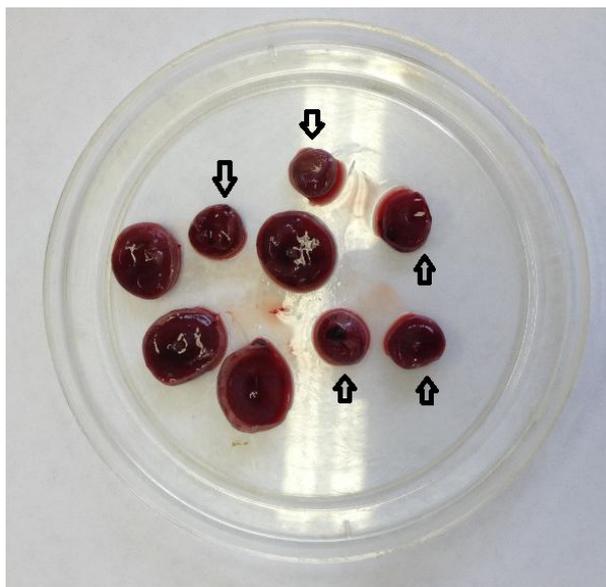


Figura 26. Placentas com morfologia alterada proveniente de rata exposta à radiação do 16º ao 20º dia de gestação. As flechas indicam as placentas alteradas.

4.4. DESENVOLVIMENTO NEONATAL

Para avaliação do desenvolvimento neonatal as ratas prenhes foram expostas durante os primeiros 21 dias de gestação ou até o nascimento dos filhotes no caso de gestações que tiveram o período inferior a 21 dias. Foi observado que 100% dos animais pertencentes ao grupo não exposto apresentaram 22 dias de gestação considerando o primeiro dia como aquele que foi encontrado espermatozóides no esfregaço vaginal. Já as ratas pertencentes ao grupo exposto apresentaram variação no tempo de gestação, que foi desde 20 dias até 24 dias (Tabela 8). A Tabela 9 apresenta as variáveis relacionadas às ninhadas no momento do nascimento. Não foram observadas diferenças significativas no número de filhotes, massa da ninhada e proporção de machos e fêmeas por ninhada.

Tabela 8. Variação do tempo gestacional de ratas Wistar não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante o período gestacional.

Dias de gestação	Grupos	
	Não exposto	Exposto
20	-	20%
21	-	-
22	100%	20%
23	-	40%
24	-	20%

Dados expressos em porcentagem. n = 10.

Tabela 9. Variáveis fetais logo após o nascimento de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante todo o período gestacional.

Variáveis fetais	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Número de filhotes	9,90 ± 0,86	10,30 ± 0,83
Massa da ninhada (g)	54,47 ± 4,66	58,66 ± 3,96
Proporção machos e fêmeas	1,04 ± 0,25	1,16 ± 0,26

Dados expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

A prole teve seu crescimento acompanhado do primeiro até o 90º dia, a figura 27 representa o ganho de massa corporal dos filhotes do sexo feminino e a figura 28 representa o ganho de massa corporal dos filhotes do sexo masculino. Não houve diferença significativa no ganho de massa corporal da prole no período estudado.

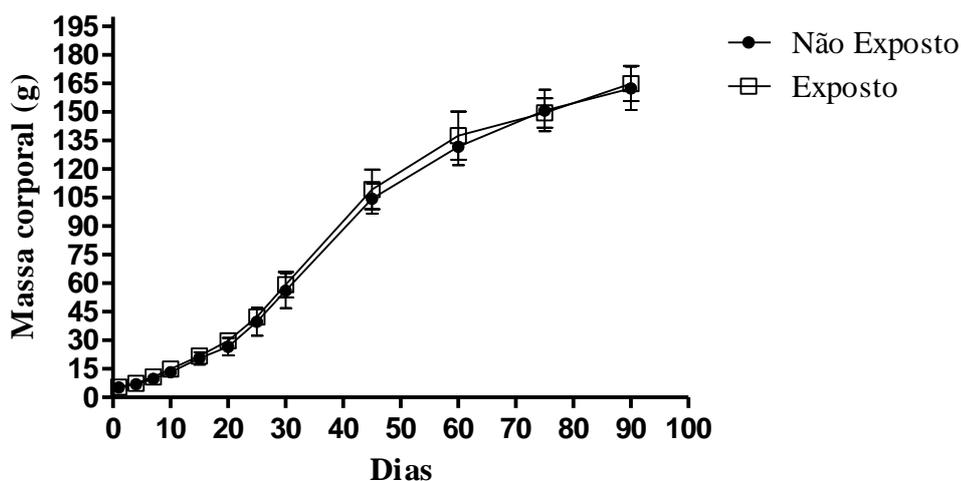


Figura 27. Ganho de massa corporal dos filhotes do sexo feminino do primeiro ao 90º dia de vida expostos ou não à radiação eletromagnética emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média \pm EPM. $n = 30$, $p > 0,05$.

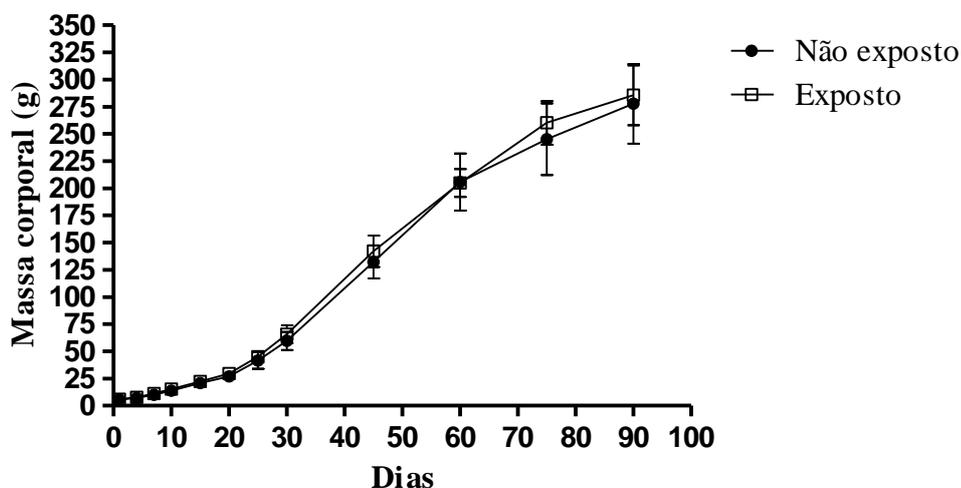


Figura 28. Ganho de massa corporal dos filhotes do sexo masculino do primeiro ao 90º dia de vida expostos ou não à radiação eletromagnética emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média \pm EPM. $n = 30$, $p > 0,05$.

Os indicadores de desenvolvimento físico analisados estão apresentados na Tabela 10, não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros analisados. Os indicadores de desenvolvimento reflexológico estão apresentados na Tabela 11, não foram encontradas diferenças significativas nos testes de endireitamento postural e geotaxia negativa.

Tabela 10. Desenvolvimento físico (em dia de aparecimento) dos filhotes do sexo feminino e masculino de ratas expostas ou não à radiação durante a gestação.

Parâmetro físico	Sexo	Grupos	
		Não exposto	Exposto
Aparecimento lanugo			
	F	3,40 ± 0,16	3,22 ± 0,14
	M	3,60 ± 0,22	3,40 ± 0,22
Aparecimento pelos			
	F	9,60 ± 0,33	9,30 ± 0,33
	M	9,50 ± 0,37	9,40 ± 0,37
Abertura olhos			
	F	16,00 ± 0,29	16,00 ± 0,21
	M	16,20 ± 0,35	15,80 ± 0,38
Desdobramento orelhas			
	F	4,80 ± 0,13	4,30 ± 0,21
	M	4,60 ± 0,22	4,50 ± 0,22
Erupção incisivos superiores			
	F	9,20 ± 0,35	9,00 ± 0,36
	M	9,60 ± 0,45	9,20 ± 0,48
Erupção incisivos inferiores			
	F	10,70 ± 0,42	10,20 ± 0,38
	M	10,80 ± 0,35	10,00 ± 0,36
Abertura vaginal			
	F	36,80 ± 0,64	36,70 ± 0,66

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

Tabela 11. Desenvolvimento reflexológico (em dia de aparecimento) dos filhotes do sexo feminino e masculino de ratas expostas ou não à radiação durante a gestação.

Parâmetro reflexológico	Sexo	Grupos	
		Não exposto	Exposto
Resposta postural	F	2,70 ± 0,33	2,80 ± 0,30
	M	2,80 ± 0,38	2,60 ± 0,26
Geotaxia negativa	F	8,10 ± 0,91	8,30 ± 0,86
	M	8,60 ± 0,60	8,20 ± 0,75

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

4.5. ESTUDO DOS ANIMAIS NA IDADE ADULTA

Aos 90 dias todos os machos foram submetidos aos testes comportamentais de esquivas inibitória e labirinto em cruz elevado. Dois representantes de cada ninhada foram escolhidos aleatoriamente para os experimentos relacionados à dosagem de catecolaminas, glicose e corticosterona. E para os experimentos relacionados à capacidade reprodutiva foi utilizado um macho proveniente de cada ninhada, os resultados são apresentados abaixo.

4.5.1. Testes comportamentais

O tempo gasto na plataforma, que é considerado como a retenção da memória, apresentou aumento de 173,07% no grupo exposto porém esse resultado não foi significativo (Figura 29). A percentagem de tempo gasto nos braços abertos, que está relacionada com o estado de ansiedade, também não diferiu entre animais não expostos e expostos (Figura 30).

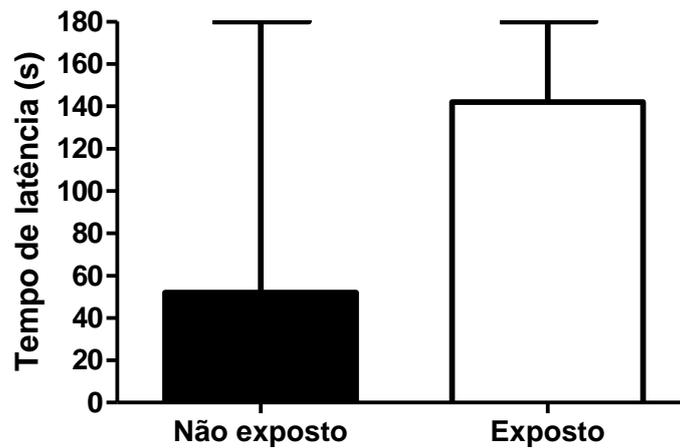


Figura 29. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o estabelecimento de memória de longo prazo em animais expostos ou não à radiação durante a vida intra-uterina. Dados expressos em mediana e intervalo interquartilico. $n = 30$, $p > 0,05$.

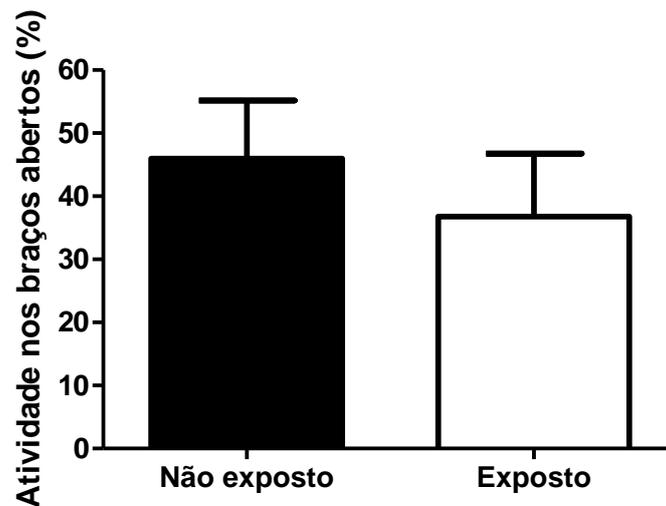


Figura 30. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o desenvolvimento de ansiedade em animais expostos ou não à radiação durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média \pm EPM. $n = 30$, $p > 0,05$.

4.5.2. Avaliação das catecolaminas

Após coletadas as glândulas adrenais dos animais foram feitas as dosagens de conteúdo total de catecolaminas e estimulação da secreção de catecolaminas. O conteúdo total de catecolaminas foi significativamente reduzido em 41,45% nos

animais expostos à radiação (Figura 31). A secreção basal e a estimulada por cafeína e por altas concentrações de potássio não foi afetada pela exposição à radiação (figuras 32 e 33, respectivamente).

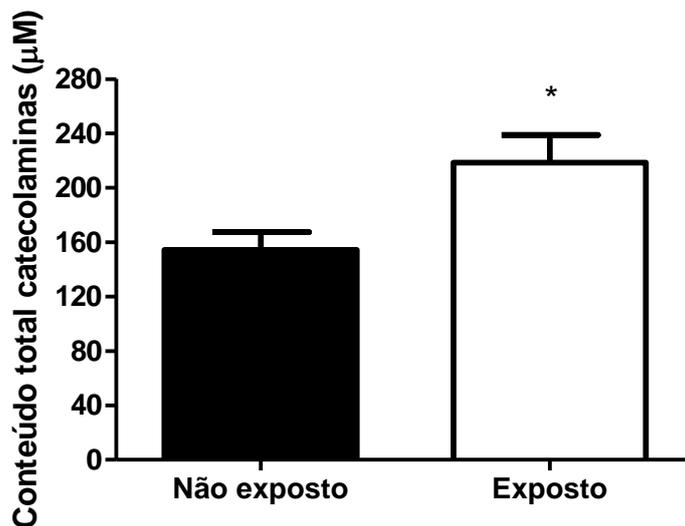


Figura 31. Concentração do conteúdo total de catecolaminas (μM) de animais não exposto e expostos à radiação emitida por telefones celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p < 0,05$.

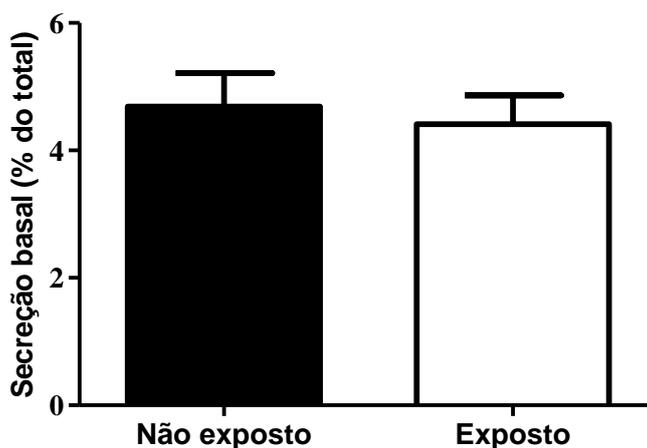


Figura 32. Secreção basal de catecolaminas de animais não exposto e expostos à radiação emitida por telefones celulares durante a vida intra-uterina. Dados expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

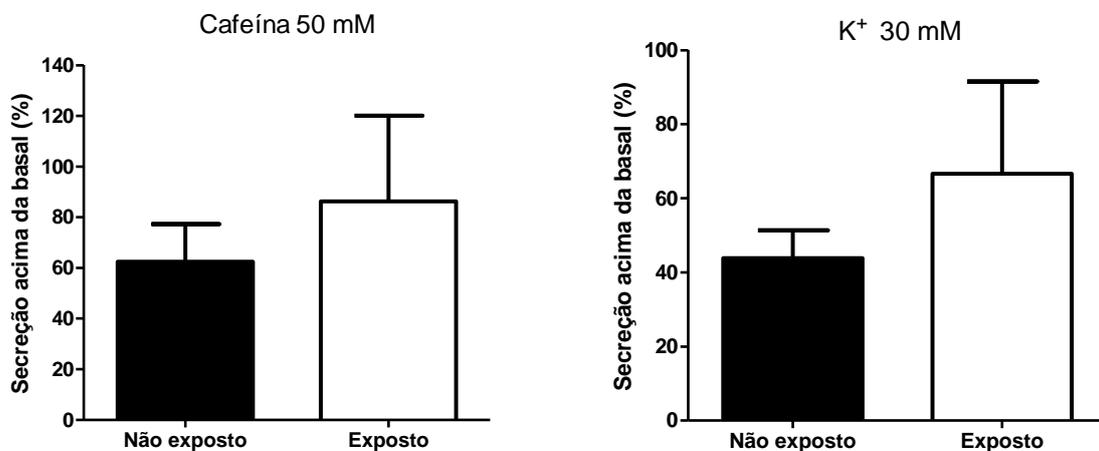


Figura 33. Secreção de catecolaminas adrenal em animais não expostos e expostos a radiação eletromagnética emitida por telefones celulares durante o período embrionário. Dados expressos como média \pm EPM. $n = 10$, $p > 0,05$.

4.5.3. Nível de glicose e corticosterona total sérica

A figura 34 representa o nível de glicose sérica nos animais em jejum expostos e não expostos à radiação. Os animais expostos apresentaram uma redução significativa de 15,45% da glicose sérica em relação aos animais em que suas mães não foram expostas à radiação. A figura 35 representa a dosagem da corticosterona total sérica, não foi observada diferença significativa.

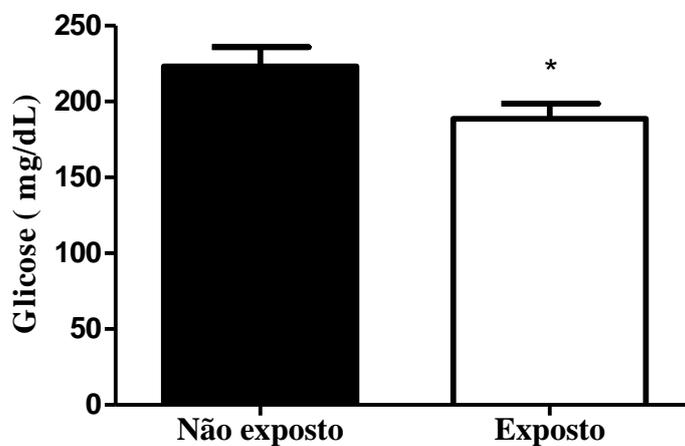


Figura 34. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o nível de glicose sérica em animais não expostos (n = 19) e expostos (n = 16) a radiação eletromagnética emitida por telefones celulares durante o período perinatal. Dados são expressos como média \pm EPM. $p < 0.05$.

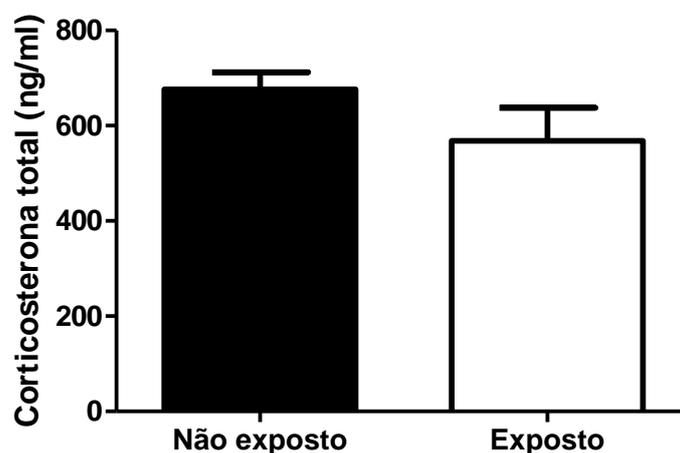


Figura 35. Efeito da exposição gestacional de ratas Wistar a RF-EMF sobre o nível de corticosterona total sérica em animais não expostos e expostos a radiação eletromagnética emitida por telefones celulares durante o período perinatal. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$. $p > 0,05$.

4.5.4. Capacidade reprodutiva das fêmeas

As fêmeas programadas ao atingirem 90 dias foram acasaladas com machos de fertilidade previamente comprovada para o estudo da capacidade reprodutiva. Foram utilizadas 20 fêmeas nesse experimento, todos os animais acasalaram dentro do limite de tempo determinado que foi de três ciclos estrais de coabitação com o macho. Durante o período gestacional não foram observados possíveis sinais clínicos de toxicidade materna. No 15^o dia de gestação as fêmeas foram eutanasiadas e analisados os seus órgãos maternos e variáveis reprodutivas. Nas variáveis maternas não foi observada alteração significativa na massa dos órgãos analisados (Tabela 12). Também não foram observadas diferenças significativas nas variáveis reprodutivas analisadas (Tabela 13), assim como também não foram observadas alterações morfológicas nos fetos analisados com 15 dias.

Tabela 12. Massa dos órgãos maternos de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina.

Órgãos maternos	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Fígado		
Massa absoluta (g)	9,228 ± 0,315	9,389 ± 0,275
Massa relativa (g)	0,04549 ± 0,00090	0,04642 ± 0,00065
Rins		
Massa absoluta (g)	1,767 ± 0,053	1,731 ± 0,095
Massa relativa (g)	0,00858 ± 0,00022	0,00670 ± 0,00191
Baço		
Massa absoluta (g)	0,503 ± 0,015	0,529 ± 0,038
Massa relativa (g)	0,00231 ± 0,00005	0,00280 ± 0,00002
Adrenais		
Massa absoluta (g)	0,062 ± 0,002	0,054 ± 0,004
Massa relativa (g)	0,00029 ± 0,00001	0,00027 ± 0,00001
Ovários		
Massa absoluta (g)	0,056 ± 0,002	0,055 ± 0,006
Massa relativa (g)	0,00026 ± 0,00008	0,00029 ± 0,00003

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

Tabela 13. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes não expostas e expostas à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina.

Variáveis	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Corpos lúteos	127	123
Implantes/grupo	118	114
Fetos vivos/grupo	113	107
Fetos mortos/grupo	0	0
Reabsorções/grupo	5	7
Perdas pré-implantação (%)	7,26	6,83
Perdas pós-implantação (%)	4,06	5,88
Massa fetos/ninhada (g)	1,869 ± 0,12	2,042 ± 0,16
Massa fetos/individual (g)	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Massa placentas/ninhada (g)	1,610 ± 0,09	1,706 ± 0,12
Massa placentas/individual (g)	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01

Dados expressos em números absolutos, porcentagem ou média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

4.5.5. Capacidade reprodutiva dos machos

Os machos programados ao atingirem 90 dias foram acasalados com fêmeas nulíparas para o estudo da capacidade reprodutiva. Foram utilizados 20 machos nesse experimento, todos os animais acasalaram dentro do limite de tempo determinado que foi de três ciclos estrais de coabitação com a fêmea. Durante o período gestacional não foram observados possíveis sinais clínicos de toxicidade materna. No 15º dia de gestação as fêmeas foram eutanasiadas e analisadas as variáveis reprodutivas, não houve diferenças significativas nas variáveis reprodutivas analisadas (Tabela 14), assim como também não foram observadas alterações morfológicas nos fetos analisados com 15 dias.

Tabela 14. Variáveis reprodutivas de ratas Wistar prenhes acasaladas com machos não expostos e expostos à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina.

Variáveis	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Corpos lúteos	131	135
Implantes/grupo	113	118
Fetos vivos/grupo	109	108
Fetos mortos/grupo	0	0
Reabsorções/grupo	4	10
Perdas pré-implantação (%)	12,99	12,67
Perdas pós-implantação (%)	4,10	10,97
Massa fetos/ninhada (g)	2,520 ± 0,26	2,398 ± 0,30
Massa fetos/individual (g)	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Massa placentas/ninhada (g)	2,002 ± 0,16	2,042 ± 0,23
Massa placentas/individual (g)	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01

Dados expressos em números absolutos, porcentagem ou média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

Após detecção do acasalamento através de esfregaço vaginal, os machos foram eutanasiados e tiveram uma amostra da secreção epididimária para análise de concentração e morfologia dos espermatozóides.

A concentração dos espermatozóides é apresentada na figura 36. Não houve diferença significativa entre o grupo não exposto e exposto. Os resultados da análise morfológica dos espermatozóides é apresentada na Tabela 15, também não houve diferença significativa entre o grupo não exposto e exposto.

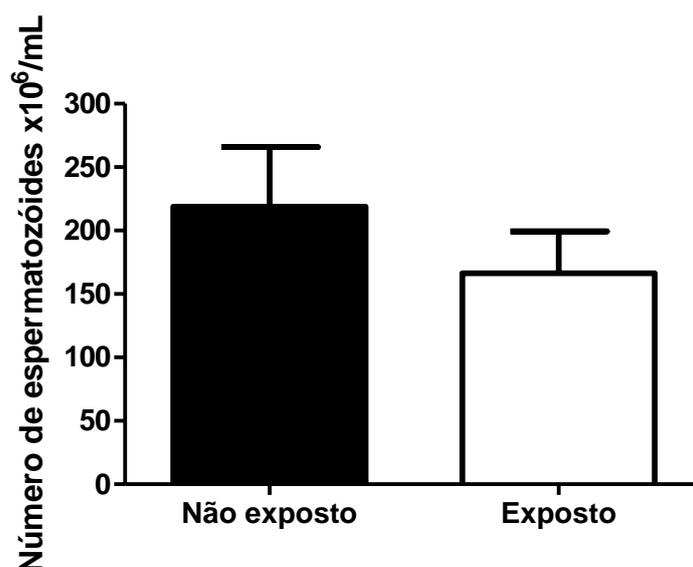


Figura 36. Número de espermatozoides de machos não expostos e expostos à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina. Dados são expressos como média \pm EPM. n = 10. p > 0,05.

Tabela 15. Percentual de espermatozoides morfologicamente normais e anormais de machos programados não expostos e expostos à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra-uterina

Morfologia espermatozoides	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Morfologicamente normais (%)	92,50	92,45
Morfologicamente anormais (%)	7,50	7,55
Anormalidades na cabeça (%)	4,75	4,90
Anormalidades na cauda (%)	2,75	2,65

4.6. DOSAGEM DE PROGESTERONA E 17 B -ESTRADIOL

Foi feita dosagem sérica dos hormônios progesterona e 17 β -estradiol das ratas prenhes dos experimentos 1 e 2, e nas fêmeas expostas durante a vida embrionária quando atingiram a idade e se encontravam prenhes. As figuras 37, 38

e 39 mostram os valores encontrados para o hormônio progesterona nesses três experimentos, não foi observada diferença significativa.

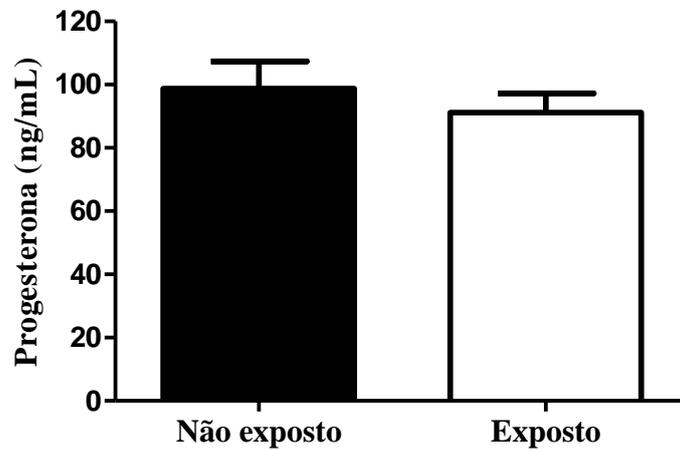


Figura 37. Efeito da exposição de ratas prenhes durante os primeiros 15 dias de prenhez sobre o nível sérico de progesterona. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$. $p > 0,05$.

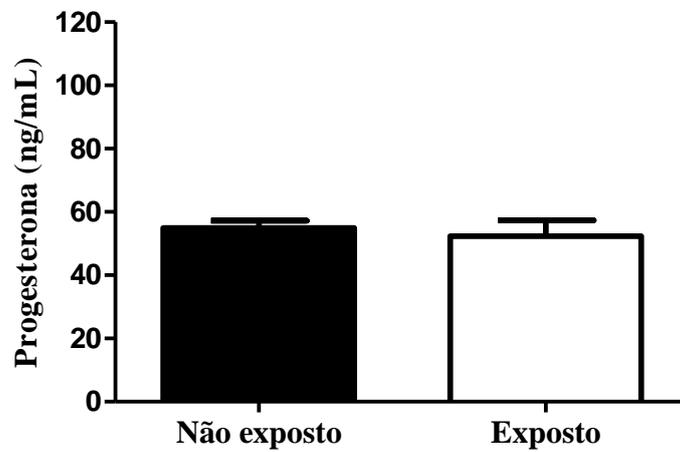


Figura 38. Efeito da exposição de ratas prenhes do 16º ao 20º dia de prenhez sobre o nível sérico de progesterona. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$. $p > 0,05$.

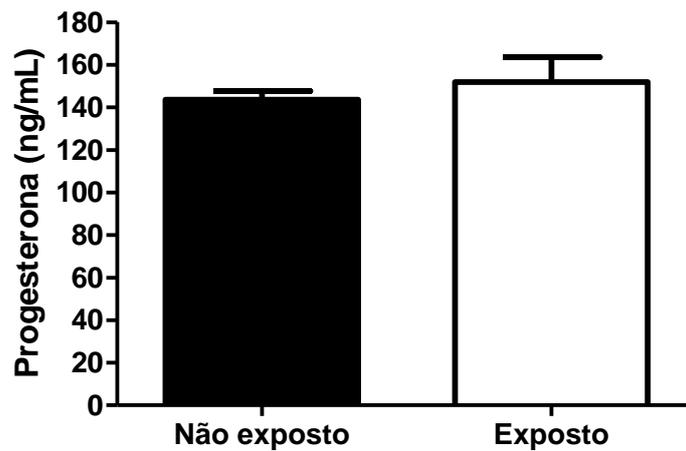


Figura 39. Efeito da radiação em ratas prenhes expostas ou não à radiação durante a vida intra-uterina sobre o nível sérico de progesterona. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$. $p > 0,05$.

Os resultados da dosagem sérica do hormônio 17 β -estradiol mostra que no experimento 1 (figura 40) houve um aumento significativo de 8,69% no nível sérico desse hormônio, enquanto que no experimento 2 (figura 41) não foi observada diferença significativa. Foi observado um aumento significativo de 18,73% nas fêmeas (expostas durante a vida embrionária) prenhes (experimento 3).

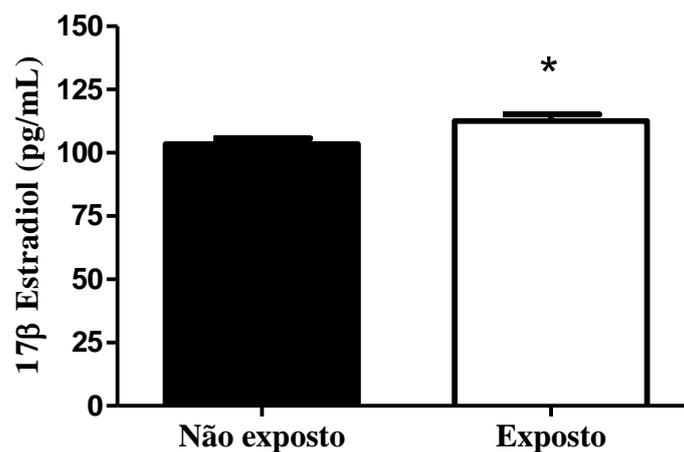


Figura 40. Efeito da exposição de ratas prenhes durante os primeiros 15 dias de prenhez sobre o nível sérico de 17 β -estradiol. Dados são expressos como média \pm EPM. $n = 10$. * $p < 0,05$.

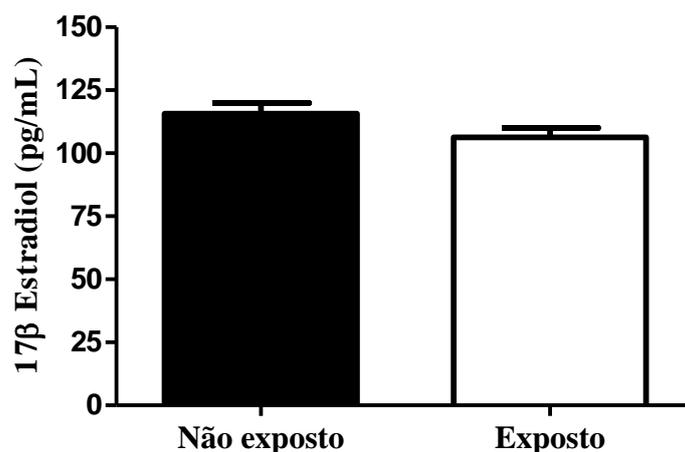


Figura 41. Efeito da exposição de ratas prenhes do 16^o ao 20^o dia de prenhez sobre o nível sérico de 17 β-estradiol. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10. p > 0,05.

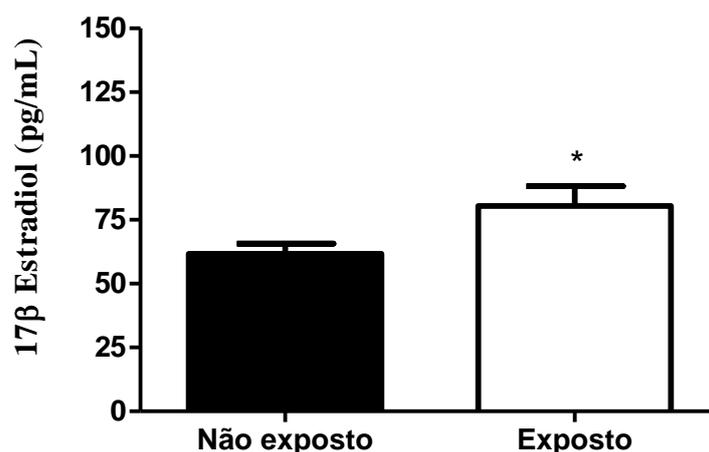


Figura 42. Efeito da radiação em ratas prenhes expostas ou não à radiação durante a vida intra-uterina sobre o nível sérico de 17 β-estradiol. Dados são expressos como média ± EPM. n = 10. *p < 0,05.

4.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA

As fêmeas prenhes do experimento 1 e a prole apresentaram alterações hormonais significativas, então as lâminas histológicas dos ovários desses animais foram analisadas. As Tabelas 16 e 17 apresentam a população folicular: número de folículos primários, secundários e terciários, diâmetro dos folículos terciários dos experimentos 1 e 3 respectivamente. Foi observada diminuição significativa no diâmetro dos folículos terciários do grupo exposto no experimento 1. No experimento

3, não foram observadas alterações na contagem da população folicular e no diâmetro do folículos terciários.

Tabela 16. População folicular de óvarios de ratas prenhes não expostas e exposta à radiação durante os primeiros 15 dias de prenhez.

População folicular	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Número de folículos primários	21,14 ± 4,44	15,14 ± 3,08
Número de folículos secundários	6,14 ± 1,03	5,14 ± 0,91
Número de folículos terciários	13,86 ± 1,42	15,00 ± 2,99
Diâmetro dos folículos terciários (µm)	365,3 ± 22,73	311,8 ± 8,05*

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, *p < 0,05.

Tabela 17. População folicular de ovários de ratas prenhes não expostas e expostas à radiação durante a vida intra-uterina.

População folicular	Grupos	
	Não exposto	Exposto
Número de folículos primários	7,12 ± 1,35	7,80 ± 1,24
Número de folículos secundários	3,37 ± 1,14	1,60 ± 0,40
Número de folículos terciários	12,63 ± 1,88	16,60 ± 2,40
Diâmetro dos folículos terciários (µm)	734,0 ± 46,87	746,3 ± 71,24

Dados são expressos como média ± EPM. n = 10, p > 0,05.

4.8. RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 18. Resultados obtidos no experimento 1

Variáveis analisadas	Resultado obtido em comparação ao grupo não exposto
Sinais clínicos de toxicidade materna	Ausente nos dois grupos experimentais
Consumo de ração	=
Ganho de massa corporal	=
ALT	=
AST	=
Gama GT	=
Fosfatase alcalina	=
Peróxido de hidrogênio	↑
Massa dos órgãos (fígado, rins, adrenais, baço, ovários)	=
Nº de corpos lúteos	↓
Nº de implantes	=
Nº de fetos vivos	=
Nº de fetos mortos	=
Nº de reabsorções	=
Massa placentas	=
Massa fetos	=
Malformações fetais	Ausente nos dois grupos experimentais
Progesterona sérica	=
17 β-estradiol sérico	↑
Nº de folículos ovarianos primários	=
Nº de folículos ovarianos secundários	=
Nº de folículos ovarianos terciários	=
Diâmetro dos folículos terciários	↓

Tabela 19. Resultados obtidos no experimento 2

Variáveis analisadas	Resultado obtido em comparação ao grupo não exposto
Sinais clínicos de toxicidade materna	Ausente nos dois grupos experimentais
Consumo de ração	=
Ganho de massa corporal	=
ALT	↑
AST	=
Gama GT	=
Fosfatase alcalina	↑
Peróxido de hidrogênio	=
Massa dos órgãos (fígado, rins, adrenais, baço, ovários)	=
Nº de corpos lúteos	=
Nº de implantes	=
Nº de fetos vivos	=
Nº de fetos mortos	=
Nº de reabsorções	=
Massa placentas	=
Massa fetos	=
Malformações fetais	Ausente nos dois grupos experimentais
Nº ♂/ninhada	=
Nº ♀/ninhada	=
Massa cérebro ♂	=
Massa cérebro ♀	=
Massa fígado ♂	=
Massa fígado ♀	=
Progesterona sérica	=
17 β-estradiol sérico	=

Tabela 20. Resultados obtidos no experimento 3

Variáveis analisadas	Resultado obtido em comparação ao grupo não exposto
Sinais clínicos de toxicidade materna	Ausente nos dois grupos experimentais
Consumo de ração materna	=
Ganho de massa corporal materna	=
Tempo de gestação	≠
Nº de filhotes	=
Massa corporal da ninhada no nascimento	=
Sinais desenvolvimento físico ♂	=
Ganho de massa corporal ♂	=
Sinais desenvolvimento físico ♀	=
Ganho de massa corporal ♀	=
Sinais desenvolvimento reflexológico ♂	=
Sinais desenvolvimento reflexológico ♀	=
Teste de esQUIVA inibitória	=
Teste labirinto em cruz	=
Conteúdo total catecolaminas	↑
Conteúdo basal de catecolaminas	=
Estimulação por cafeína	=
Estimulação por potássio	=
Glicemia	↓
Corticosterona total	=
Massa órgãos ♀	=
Variáveis reprodutivas ♀	=
Progesterona sérica	=
17 β-estradiol	↑
Capacidade reprodutiva ♂	=
Concentração espermatozoides	=
Morfologia espermatozoides	=

5. DISCUSSÃO

Devido à susceptibilidade do embrião, neonatos e crianças a qualquer efeito embriotóxico causado por campos eletromagnéticos a OMS tem recomendado que se dê alta prioridade a investigações experimentais dos efeitos de EMF em mulheres grávidas e crianças.

Neste trabalho, primeiramente foi calculada a taxa de absorção específica no qual as ratas prenhes estariam sendo expostas. O valor obtido mostra que os efeitos encontrados em nosso estudo se tratam de conseqüências de efeitos não térmicos. Embora a maioria dos estudos utilize como forma de exposição um gerador de EMF tradicional, é importante ressaltar que no nosso estudo foi empregado o próprio aparelho móvel e não uma antena transmissora e a exposição foi feita utilizando animais sem restrição de movimento nas gaiolas. As razões para adotar esta metodologia foram: 1) Diferentemente de um emissor de onda, em um telefone real a transmissão é feita por pulsos curtos e rápidos em vez de pulsos contínuos como antenas emissoras; 2) Está bem estabelecido que a contenção mecânica de animais tem efeito estressor (IBRAHIM et al., 2015) e que o estresse durante o desenvolvimento fetal pode modificar a estrutura e fisiologia do sistema simpatoadrenal com efeitos sobre a vida adulta de ratos, um dos focos do nosso estudo (YOUNG, 2002); 3) Testes anteriores realizados no nosso laboratório mostrou que a radiação emitida pelo telefone móvel chega a toda a gaiola de maneira semelhante (dados não mostrados). Uma possível desvantagem desta metodologia poderia ser a falta de controle da radiação emitida, mas os dispositivos comerciais típicos têm uma pequena largura de banda, cerca de 20 MHz.

A todo o momento temos acesso aos nossos celulares e é difícil mensurar o tempo de uso diário. Para muitos, telefones celulares são utilizados como um despertador de cabeceira e organizador pessoal. O uso do telefone celular pode chegar a 24 horas / dia, deixando os usuários cada vez mais expostos aos efeitos potencialmente nocivos da exposição à radiação de radiofrequência. Assim, nesse estudo determinamos que a exposição ocorreria no período de maior atividade dos animais, à noite, e de forma padronizada, porém em diferentes fases gestacionais e

isso nos possibilitou estudar a interferência dos aparelhos celulares em todo o ciclo de vida de um indivíduo.

O comportamento materno em mamíferos é responsável por assegurar a sobrevivência da prole (MARCHLEWSKA-KOJ, KAPUSTA E OLEJNICZA, 1999) e promover um desenvolvimento adequado a médio e longo prazo (POINDRON, 2005). Mudanças na interação da mãe com seus filhotes podem interferir na maturação neurológica e comportamental da prole (SPEAR E FILE, 1996). Além disso, o estado de saúde materno é essencial para o adequado desenvolvimento físico da prole (CHAHOUUD *et al.*, 1999) e ambos podem ser afetados por substâncias endógenas ou exógenas que possam causar toxicidade materna.

A toxicidade materna pode ser observada através de alterações no peso corporal e consumo de alimento; além da presença de sinais clínicos indicativos de estresse (STUMP *et al.*, 2011). No presente trabalho não foram observadas sinais clínicos de toxicidade materna, alterações no consumo alimentar nem no ganho de massa corporal das mães quando expostas à radiação em diferentes períodos gestacionais. Além disso, também não observamos alterações macroscópicas e nem diferenças na massa dos órgãos analisados. Estes resultados corroboram estudo também realizado com ratas prenhes expostas a radiação emitida por aparelhos móveis em que não foram encontradas alterações em variáveis maternas (OGAWA *et al.*, 2009).

Porém quando feita análise bioquímica do soro, as ratas prenhes do experimento 2, que foram expostas à radiação entre o 16º e o 20º dia de prenhez, apresentaram aumento significativo na concentração sérica das enzimas ALT e fosfatase alcalina sugerindo uma possível toxicidade hepática no período de fetogênese. Nos nossos experimentos não houve modificação na concentração plasmática de AST e gama GT, sugerimos que possivelmente há um dano no fígado desses animais e seria interessante análise histológica complementar. Tem sido descrito na literatura danos hepáticos causados por radiação emitida por aparelhos celulares, e demonstrado a indução de stress oxidativo e mudanças na atividade de enzimas antioxidantes do fígado, levando a um dano tecidual (OZGUR, GULER E SEYHAN, 2010). Porém não foram encontrados estudos demonstrando dano hepático causado por radiação em gestantes, mas alterações no metabolismo

materno por doença, estresse ou toxicidade podem ter reflexos sobre o desenvolvimento da cria.

O período de organogênese é considerado mais sensível aos fatores tóxicos, e é caracterizado pela formação das principais estruturas corporais. Já no período de fetogênese há o crescimento das estruturas já formadas. As manifestações de defeitos no desenvolvimento esperadas incluem: morte, malformação, crescimento retardado e déficits funcionais (OGAWA et al., 2009).

Como dito anteriormente, ao ocorrer uma gestação, o concepto produz gonadotrofina coriônica que mantém o funcionamento do corpo lúteo pelo tempo inicial da gestação, até que a placenta ocupe seu lugar. No experimento 1 estudamos o período pré implantação e de organogênese e observamos durante esse período uma diminuição do número de corpos lúteos o que poderia acarretar numa diminuição dos hormônios progesterona e estrogênio. Porém nessa etapa do nosso estudo encontramos um aumento significativo nos níveis séricos de 17β -estradiol acompanhado por uma ligeira, mas não significativa, diminuição do hormônio progesterona. Resultado semelhante também foi encontrado por Shahin et al. (2013). Sabe-se que a progesterona produzida pelo corpo lúteo pode regular negativamente o estrogênio (LEAVITT, 1985) que está sendo produzido pelos folículos em desenvolvimento (SHAHIN et al., 2013), e o aumento do estrogênio poderia comprometer o processo de implantação ocasionando perdas pré-implantação e afetar a secreção de progesterona durante o período de gestação comprometendo a manutenção da gestação após a implantação (SHAHIN et al., 2013), porém nesse estudo não observamos diferenças significativas tanto nas perdas pré-implantação quanto nas perdas pós, além de não ter sido observada malformações. Em relação à histologia dos ovários, fizemos a contagem folicular a fim de investigar a causa do aumento de estrogênio sérico encontrado, porém observamos uma diminuição no diâmetro dos folículos terciários, estudos complementares como contagem das células da granulosa seriam interessantes porque mesmo esses folículos estando com o diâmetro diminuído podem apresentar uma quantidade maior de células. Outro fato que deve ser considerado, é que há uma contribuição fetal na produção de estrógenos (CHALLIS et al., 2000) e estudos futuros seriam necessários a fim de investigar se de alguma forma eles estão contribuindo para esse aumento de estrogênio encontrado.

Espécies reativas de oxigênio, ROS, desempenham um papel na modulação de toda uma gama de funções fisiológicas reprodutivas como maturação do oócito, esteroidogênese ovariana, funções do corpo lúteo, fertilização, desenvolvimento embrionário e gestação (AGARWAL, GRUPTA E SHARMA, 2005). Shahin et al. (2013) sugerem que os efeitos hormonais encontrados em seu estudo semelhantes ao que aqui encontramos seja consequência do aumento de ROS encontrado no seu estudo em animais expostos à radiação. Nós só fizemos a dosagem de peróxido de hidrogênio sérico e encontramos um aumento significativo de 60,93% no grupo exposto, porém especulamos que esse aumento seja consequência do aumento encontrado nas concentrações de 17 β -estradiol, já que é sabido que as concentrações de estradiol influenciam a formação endógena de peróxido de hidrogênio no tecido uterino durante a gestação (JHORI E DASGUPTA, 1980).

No experimento 2 fizemos o estudo da exposição à radiação no período de fetogênese. Diferente do que foi encontrado no experimento anterior, não foram observadas diferenças significativas na concentração sérica de progesterona e 17 β -estradiol e nem diferença nos níveis séricos de peróxido de hidrogênio. Também não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros reprodutivos analisados. Como apresentado, encontramos apenas alterações na morfologia das placentas de uma das mães e membros malformados em fetos de duas crias do grupo tratado, fatos esses que foram considerados pontuais. Mas é forçoso considerar que, a despeito de trabalhar com reprodução em roedores há oito anos, nunca foi observado este tipo de malformação o que, nos parece, sugere que este assunto deva ser mais explorado.

No experimento 3 avaliamos o desenvolvimento neonatal até a vida adulta da prole que foi exposta à radiação durante os 21 dias do período gestacional. Foi observada alteração no tempo gestacional em 80% das mães expostas e embora elas não tenham apresentado sinais indicativos de toxicidade materna, nem alterações de ganho de massa corporal e consumo alimentar durante o tempo de gestacional, essa mudança pode de alguma forma influenciar no desenvolvimento embrionário e pós natal. O número de filhotes ao nascimento não sofreu diferença no momento do nascimento, corroborando o estudo de Ferreira et al. (2006). Não foram observadas anormalidades nem alterações de massa corporal da prole no momento do nascimento até a vida adulta, resultado também encontrado por Odaci,

Bas e Kaplan (2008). O peso da prole ao nascer tem sido considerado importante preditor de doenças na vida adulta. O baixo peso ao nascer está associado com um risco aumentado de hipertensão, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (BARKER et al., 1993a; BARKER et al., 1993b; RICH-EDWARDS et al., 1997). No entanto, o peso ao nascimento e outros índices antropométricos são pouco sofisticados, e provavelmente muitos fatores que afetam a biologia da prole não alteram o peso ao nascer (MEANEY, SZYF E SECKL, 2007). Em relação ao desenvolvimento físico e reflexológico não foram encontradas alterações significativas.

Na idade adulta, devido a possíveis influências hormonais devido ao ciclo estral, foram feitos testes de comportamento, secreção de catecolaminas e dosagens de corticosterona e glicose somente com os machos ao atingirem 90 dias de idade. Foi observado nos animais expostos à radiação durante a vida intra-uterina um aumento do conteúdo total de catecolaminas adrenais. Essa relação nos sugere, a princípio, que poderia haver uma maior produção de catecolaminas ou maior acúmulo das catecolaminas na adrenal devido a falhas na secreção, o que já foi relatado na literatura (ANDREAZZI et al., 2011). Neste estudo, os autores observaram que no modelo de obesidade MSG, os ratos apresentaram redução na secreção basal de catecolaminas da medula adrenal *in vitro*, o que poderia justificar um maior acúmulo desses hormônios na glândula, mesmo com a depressão da expressão de tirosina hidroxilase, enzima limitadora da via de síntese de catecolaminas. No presente estudo também foi observado acúmulo de catecolaminas na adrenal dos animais expostos à radiação; no entanto, não observamos falha na secreção de catecolaminas durante os experimentos *in vitro*; o que não nos faz descartar a possibilidade de sobre regulação da via de síntese de catecolaminas, hipótese apoiada pelo aumento da síntese de catecolaminas e seu acúmulo em ratos submetidos a estresse (STALLKNECHT, 2004). A menor glicemia dos animais expostos é um indício de que a secreção e/ou ação de hormônios reguladores da concentração de glicose no plasma (insulina, corticosterona, adrenalina, glucagon dentre outros) podem ter sido afetadas pela radiação. A associação entre o aumento do conteúdo de catecolaminas nas adrenais e modificações do nível de glicose pode denotar um efeito programador sobre a fisiologia do metabolismo de energia, tal como anteriormente descrito (FAGUNDES

et al., 2007). Nosso trabalho mostrou que não houve alteração plasmática da concentração de corticosterona; porém, mais trabalhos são necessários para investigar as vias metabólicas dos hormônios citados acima, a variação dos níveis glicêmicos e suas conseqüências para o metabolismo energético.

Glicocorticóides e catecolaminas também alteram a função do SNC e potencializam o processo cognitivo e de memória por estímulo associado ao estressor (MEANEY, SZYF E SECKL, 2007). Um efeito clássico da epinefrina é sua ação no fígado para quebrar os estoques de glicogênio, resultando em aumento dos níveis de glicose no sangue. O aumento da glicose no sangue fornece substratos adicionais de energia para que o cérebro reforce os processos necessários para uma experiência de aprendizado e memória (MCCARTY E GOLD, 1981). Muitas das manifestações de reforço da memória com epinefrina usaram tarefas de esquila inibitória (GOLD, 2014). Porém no nosso estudo embora tenhamos observado uma diminuição na concentração sérica de glicose, não observamos nem diferença na secreção de catecolaminas e nem da memória nessa idade, talvez porque a redução dos níveis glicêmicos nos animais expostos não alcance valor que possa ser considerado como situação de hipoglicemia. Não há parâmetros bem estabelecidos e aceitos sobre a glicemia em ratos e os animais não apresentaram qualquer sinal característico de hipoglicemia como taquicardia e tremores (CRYER, 2007) ou qualquer modificação de comportamento. Além disso, em trabalhos prévios desenvolvidos no laboratório, estudando situações de hipoglicemia de ratos machos de 70 dias de idade, observamos que é necessária uma variação glicêmica maior para que apareçam sintomas de hipoglicemia (dados não mostrados), condição necessária para afetar os processos de memorização. Os déficits no comportamento e função cortical foram demonstrados em modelos animais, ratas prenhes que receberam glicocorticóides sintéticos para imitar a exposição ao estresse materno apresentaram alterações na tolerância à glicose, efeito sobre eixo HPA e comportamento do tipo ansiedade na segunda geração de descendentes (DRAKE, WALKER E SECKL, 2005; IQBAL et al., 2012). Ratos estressados durante o período perinatal mostram comportamento depressivos incluindo ansiedade no labirinto em cruz elevado (FRIDE E WEINSTOCK, 1988). No presente estudo não observamos alterações na concentração sérica de corticosterona e assim alterações no comportamento de ansiedade desses animais também não foram observadas.

Mas é importante que sejam feitas futuras pesquisas focando nos mecanismos metabólicos envolvidos e de comportamento com os efeitos da radiação emitida por aparelhos moveis na programação desses animais em diferentes idades, já que existem outras janelas de programação. Neste trabalho mostramos pela primeira vez que além de alterar o tempo gestacional, a exposição à radiação emitida por aparelhos celulares durante a vida intra uterina pode programar os indivíduos em sua vida adulta alterando a função da medula adrenal.

A prole (considerando machos e fêmeas) teve sua função reprodutiva avaliada quando na fase adulta. Primeiramente considerando os machos, todos acasalaram no tempo estipulado de 3 ciclos de coabitação com a fêmea, e não apresentaram alterações na concentração e morfologia dos espermatozoides. Vários efeitos da radiação emitida por aparelhos celulares relacionados à fertilidade masculina tem sido descritos na literatura, inclusive em estudos anteriores realizado em nosso laboratório com esse mesmo modelo experimental, foi observado em animais expostos por 3 ou por 10 noites apenas, um aumento da mortalidade e diminuição da concentração de espermatozoides, além de aumento da incidência de fragmentação do DNA, o que é um indicativo de apoptose (MUSSO, 2014). Além desses efeitos tem sido reportado mudanças estruturais em órgãos reprodutores como diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos e peso dos testículos e destruição de células Leydig (BEHARI E KESARI, 2006; KHILLARE E BEHARI, 2009). O ciclo do epitélio seminífero leva 13,3 dias em ratos Wistar pós-púberes e a duração de todo o processo de espermatogênese leva mais de 50 dias (HUCKINS, 1965), assim era de se esperar que o período de exposição desse estudo não provocasse quaisquer alterações morfológicas nos espermatozoides. Não foi encontrado nenhum estudo na literatura relacionado ao efeito programador de radiação emitida por aparelhos celulares relacionado à reprodução de machos, achamos importante destacar que mesmo sendo necessário aprofundar esses estudos sabemos que não há alterações na capacidade reprodutiva desses animais nesse modelo experimental.

As gônadas indiferenciadas são primeiramente detectadas como parte do sistema urogenital por volta do 10º dia de vida intra-uterina, e por volta do 13º dia células germinativas femininas em meiose fornece a base inicial para o dimorfismo sexual (DEAN, 2002). A foliculogênese em ratas se inicia precocemente na vida

intra-uterina, e envolve programas orquestrados de desenvolvimento em células germinativas e somáticas e a interação entre elas. Durante a gestação de roedores as células germinativas se dividem mitoticamente em aproximadamente 26000 células, mas devido a ondas apoptóticas que acontecem no final da gestação, não mais que 10000 - 15000 células estão presentes no ovário do recém nascido (DEAN, 2002). No período perinatal, os oócitos se tornam rodeados por camadas simples de células da granulosa achatadas para formar os folículos primordiais que representam o complemento total de células germinativas disponíveis para a fêmea ao longo de sua vida reprodutiva (DEAN, 2002). Gul et al (2009) sugerem que microondas de telefones celulares são responsáveis por diminuir o número de folículos em ratas com 21 dias de idade que foram expostas durante o período gestacional. No nosso estudo avaliamos a população folicular somente quanto essas ratas atingiram a idade adulta e não observamos diferenças no número de folículos e nem no diâmetro dos folículos terciários, porém observamos um aumento significativo do 17β -estradiol quando essas ratas foram acasalados e se encontravam no 15º dia de prenhez. Interessante notar que ratas prenhes expostas à radiação durante os 15 dias de prenhes também apresentaram aumento na concentração sérica desse hormônio. Assim, parece que a radiação emitida por aparelhos celulares tem efeito sobre estrogênios durante a gestação tanto na situação da rata prenhe exposta durante a gestação quanto na situação da exposição ter sido durante o seu desenvolvimento embrionário, já que nos dois casos ocorre aumento significativo dos níveis de β -estradiol durante a prenhez. Porém mesmo apresentando alteração em um importante hormônio da reprodução, as funções reprodutivas analisadas não foram alteradas no nosso estudo. Sugerimos que a radiação emitida por aparelhos celulares possui um efeito programador sobre a reprodução de fêmeas, o que necessita de estudos adicionais para compreender quais mecanismos estão envolvidos nessa programação e suas possíveis conseqüências.

6. CONCLUSÕES

Os nossos resultados permitem afirmar que, em nossas condições experimentais, a radiação emitida por telefones móveis não tem efeitos dramáticos sobre a gestação e desenvolvimento de ratos Wistar, um reconhecido modelo animal para o estudo da fisiologia e patologias humanas. Mas, como contraponto, os resultados também mostram que a radiação não é totalmente desprovida de efeitos, em especial sobre alguns hormônios aqui analisados, toxidez hepática, o tempo de gestação e a regulação dos níveis glicêmicos. Isto exige, além de mais estudos para entender as causas e consequências das alterações aqui apresentadas, cautela no trato deste tipo de tecnologia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RASSOUL, G.; EL-FATEH, O.A.; SALEM, M.A.; MICHAEL, A.; FARAHAT, F.; EL BATANOUNY, M.; SALEM, E. 2007. Neurobehavioral effects among inhabitants around mobile phone base stations. **Neurotoxicology**, **28** (2): 434-440.

ACOSTA, A.A. 1994. Implantación humana del pre-embrión: aspectos básicos clínicos e investigación futura. **Revista Latino Americana Esterilidade e Fertilidade** **8**: 4-20.

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

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology Endocrinology** **3**: 28.

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

ALDER, S. 1983. Behavioral teratology. IN: Application of behavioral pharmacology in toxicology. E. R. Press. New York: 57-66.

ALEXANDER, C.M.; HANSELL, E.J.; BEHRENDTSEN, O.; FLANNERY, M.L.; KISHNANI, N.S.; HAWKES, S.P.; WERB, Z. 1996. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. **Development** **122** (6): 1723-1736.

ANATEL 2002. Resolução nº 303. Disponível em: <http://www.anatel.gov.br/legislacao/resolucoes/17-2002/128-resolucao-303>. Acesso em: 26/02/2016.

ANATEL 2014. Qual a frequência utilizada para o 4G no Brasil? Disponível em: <http://www.anatel.gov.br/consumidor/index.php/perguntas-frequentes?catid=1>. Acesso em: 22/11/2015.

ANATEL 2015. Agência Nacional de Telecomunicações. Disponível em: http://www.anatel.gov.br/institucional/index.php?option=com_content&view=article&id=582:junho-de-2015-fecha-com-282-45-milhoes-de-acessos-moveis&catid=48&Itemid=433. Acesso em: 11/09/2015.

Andreazzi, A.E.; Grassioli, S.; Marangon, P.B.; Martins, A.G.; de Oliveira, J.C.;Torrezan, R.; Gravena, C.; Garcia, R.M.; Mathias, P.C. 2011. Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. **Experimental Diabetes Research** **2011**: 947917.

ASPILLAGA, M.O.; WHITTAKER, P.G.; GREY, C.E.; LIND, T. 1983. Endocrinologic events in early pregnancy failure. **American Journal Obstetrics & Gynecology** **147** (8): 903-908.

AXELROD, J. E T. D. REISINE. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science** **224**(4648): 452-459.

BAILEY, G.P.; WISE, L.D.; BUSCHMANN, J.; HURTT, M.; FISHER, J.E. 2009. Pre- and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals. **Birth Defects Research B Developmental Reproductive Toxicology** **86**(6): 437-445.

BALAKRISHNAN, K.; MURALI, V.; RATHIKA, C.; MANIKANDAN, T.; MALINI, R. P.; KUMAR, R. A. KRISHNAN, M. 2014. Hsp70 is an independent stress marker among frequent users of mobile phones. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology** **33**(4): 339-347.

BARKER, D.J.; GLUCKMAN, P.D.; GODFREY, K.M.; HARDING, J.E.; OWENS, J.A.; ROBINSON, J. S. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet** **341**(8850): 938-941.

BARKER, D.J.; HALES, C.N.; FALL, C.H.; OSMOND, C.; PHIPPS, K.; CLARK, P.M. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia** **36**(1): 62-67.

BARKER, D.J.P. 1992. Fetal and infant origins of adult disease. London, BNJ Publishing.

BEAUCHAMP, B. E M. E. HARPER 2015. In utero Undernutrition Programs Skeletal and Cardiac Muscle Metabolism. **Frontiers in Physiology** **6**: 401.

BEDIR, R.; TUMKAYA, L.; ŞEHITOĞLU, İ.; KALKAN, Y.; YILMAZ, A.; ŞAHIN, O. Z. 2015. The effect of exposure of rats during prenatal period to radiation spreading from mobile phones on renal development. **Renal Failure** **37**(2): 305-309.

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

BEKDASH, R.; ZHANG, C.; SARKAR, D. 2014. Fetal alcohol programming of hypothalamic proopiomelanocortin system by epigenetic mechanisms and later life vulnerability to stress. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research** **38**(9): 2323-2330.

BERNARDI, M.M. 2002. Exposição a medicamentos durante o período perinatal. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. G. E. KOOGAN. Rio de Janeiro: 691-699.

BRENSEKE, B.; PRATER, M.R.; BAHAMONDE, J.; GUTIERREZ, J.C. 2013. Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. **Journal of Pregnancy** **2013**: 368461.

BRUCE, N.W.; MEYER, G.T.; DHARMARAJAN, A.M. 1984. Rate of blood flow and growth of the corpora lutea of pregnancy and of previous cycles throughout pregnancy in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility** **71**(2): 445-452.

BUCHNER, K. E EGER, H. 2011. Changes of Clinically Important Neurotransmitters under the Influence of Modulated RF Fields—A Long-term Study under Real-life Conditions. **Umwelt-Medizin-Gesellschaft** **24**: 44-57.

BURDGE, G.C.; HANSON, M.A.; SLATER-JEFFERIES, J.; LILLYCROP, K.A. 2007. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? **British Journal of Nutrition** **97**(6): 1036-1046.

CAIRES, L.C. 2014. O efeito da radiação emitida por telefones móveis sobre a via das MAPK's, o hipotálamo, hipófise e adrenal, memória e ansiedade em ratos Wistar (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, 1769). Tese de doutorado apresentada a Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Juiz de Fora, Universidade Federal de Juiz de Fora.

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

CAIRES, L.C. 2011. Efeito da radiação emitida por telefones móveis sobre os processos de sinalização intracelular das células hipofisárias. Dissertação de mestrado apresentada a Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Juiz de Fora, Universidade Federal de Juiz de Fora.

CAROLAN-OLAH, M.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. 2015. A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease. **Journal of Clinical Nursing** **24**(23-24): 3716-3729.

CARSON, D.D.; BAGCHI, I.; DEY, S.K.; ENDERS, A.C.; FAZLEABAS, A.T.; LESSEY, B.A.; YOSHINAGA, K. 2000. Embryo implantation. **Dev Biol** **223**(2): 217-237.

CHAHOU, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L.; FAQI, A. S. 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology** **13**(5): 375-381.

CHALLIS, J.R.G.; MATTHEWS, S.G.; GIBB, W.; LYE, S.J. 2000. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. **Endocrine Reviews** **21**(5): 514-550.

CHRISTIAN, M.S. 2001. Test Methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. **Method of Toxicology**. W. H. Taylor & Francis, Editor. Philadelphia: 1301-1381.

CHU, M.K.; SONG, H.G.; KIM, C.; LEE, B.C. 2011. Clinical features of headache associated with mobile phone use: a cross-sectional study in university students. **BMC Neurology**. **11**: 115.

COSTA, C.P. E G. FONTGALLAND 2011. SAR evaluation from various mobile phones disposed asymmetrically. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica** **27**(E).

CROSS, J.C.; WERB, Z.; FISHER, S. 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science** **266**(5190): 1508-1518.

CROXATTO, H.; ORTIZ, M.E.; FORCELEDO, M.L.; FUENTEALBA, B.; NOÉ, G.; MOORE, G.; MORAN, F.; CARDENAS, H. 1991. Hormonal control of ovum transport through the rat oviduct. **Archivos de Biología Y Medicina Experimentales** **24**(3): 403-410.

CRYER, P. E. 2007. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. **Journal of Clinical Investigation** **117**: 868-870.

DE BOER, S.F.; SLANGEN, J.L.; VAN DER GUGTEN, J. 1988. Adaptation of plasma catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats. **Physiology & Behavior** **44**(2): 273-280.

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

DE OLIVEIRA, E.; MOURA, E.G.; SANTOS-SILVA, A.P.; PINHEIRO, C.R.; LIMA, N.S.; NOGUEIRA-NETO, J.F.; NUNES-FREITAS, A.L.; ABREU-VILLACA, Y.; PASSOS, M.C.; LISBOA, P.C.C. 2010. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. **Journal of Endocrinology** **206**(1): 55-63.

DEAN, J. 2002. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. **Journal of Reproductive Immunology** **53**(1-2): 171-180.

EL-BEDIWI, A.B.; ATTALL, F.; EL-KOTT, M.S.; EID, E. 2011. Effects of Electromagnetic Radiation Produced by Mobile Phone on Some Visceral Organs of Rat. **Journal of Medical Sciences** **6**: 256-260.

EL-SAYED, A.; BADR, H.S.; YAHIA, R.; SALEM, S.M.; KANDIL, A.M. 2011. Effects of thirty minute mobile phone irradiation on morphological and physiological parameters and gene expression in pregnant rats and their fetuses. **African Journal of Biotechnology** **10**(26): 19670-19680.

ENDO, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. **Physiological Reviews** **57**(1): 71-108.

FAGUNDES, A.T.; MOURA, E.G.; PASSOS, M.C.; OLIVEIRA, E.; TOSTE, F.P.; BONOMO, I.T.; TREVENZOLI, I.H.; GARCIA, R.M.; LISBOA, P.C. 2007. Maternal

low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. **British Journal of Nutrition** **98**(5): 922-928.

FCC. 2014. Federal Communications Commission. Disponível em: http://transition.fcc.gov/fcc-bin/dielec_file. Acesso em: 14/10/2014.

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

FERREIRA, A.R.; KNAKIEVICZ, T.; PASQUALI, M.A.; GELAIN, D.P.; DAL-PIZZOL, F.; FERNANDEZ, C.E.; DE SALLES, A.A.; FERREIRA, H.B.; MOREIRA, J.C. 2006. Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring. **Life Science** **80**: 43-50.

FREEMAN, M. E. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. **The Physiology of Reproduction**. N. J. Knobil E, eds. New York, Raven Press: 613-658.

FRIDE, E. E. M. WEINSTOCK 1988. Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. **Life Science** **42**(10): 1059-1065.

GIBORI, G. 1993. The corpus luteum of pregnancy. **The Ovary**. E. Y. Adashi and P. K. C. Leung. New York, Raven Press: 261-317.

GODFREY, K.M.; GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. 2010. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. **Trends in Endocrinology & Metabolism** **21**: 199-205.

GOLD, P.E. 2014. Regulation of memory - from the adrenal medulla to liver to astrocytes to neurons. **Brain Research Bulletin** **105**: 25-35.

GORSKI, R.A. 1986. Sexual differentiation of the brain: a model for drug-induced alterations of the reproductive system. **Environmental Health Perspectives** **70**: 163-175.

GRACE, C.E.; KIM, S.J.; ROGERS, J.M. 2011. Maternal influences on epigenetic programming of the developing hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology** **91**(8): 797-805.

GUERRA, M.O. 1995. Corpus luteum: origin, function and destination. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução** **14**: 7-18.

GUL, A.; CELEBI, H.; UĞRAŞ, S. 2009. The effects of microwave emitted by cellular phones on ovarian follicles in rats. **Archives of Gynecology and Obstetrics** **280**(5): 729-733.

GUYTON, A. & HALL, J.E. 2011. Tratado de fisiologia média. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

HAGHANI, M.; SHABANI, M.; MOAZZAMI, K. 2013. Maternal mobile phone exposure adversely affects the electrophysiological properties of Purkinje neurons in rat offspring. **Neuroscience** **250**: 588-598.

HALTER, J.B.; BEARD, J.C.; PORTE, D. 1984. Islet function and stress hyperglycemia: plasma glucose and epinephrine interaction. **American Journal of Physiology** **247**(1 Pt 1): E47-52.

HARDELL, L. E M. CARLBERG 2009. Mobile phones, cordless phones and the risk for brain tumours. **International Journal of Oncology** **35**(1): 5-17.

HARDELL, LN., CARLBERG, M., HANSSON MILD, K. 2005. Case-control study on cellular and cordless telephones and the risk for acoustic neuroma or meningioma in patients diagnosed 2000–2003. **Neuroepidemiology** **25**: 120-128.

HARDELL, L.; CARLBERG, M.; HANSSON MILD, K.; ERIKSSON, M. 2011. Case-control study on the use of mobile and cordless phones and the risk for malignant melanoma in the head and neck region. **Pathophysiology** **18**(4): 325-333.

HARDELL, L.; CARLBERG, M.; OHLSON, C.G.; WESTBERG, H.; ERIKSSON, M.; HANSSON MILD, K. 2007. Use of cellular and cordless telephones and risk of testicular cancer. **International Journal of Andrology** **30**(2): 115-122.

HARDELL, L.; CARLBERG, M.; SODERQVIST, F.; MILD, K.H.; MORGAN, L.L. 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. **Occupational and Environmental Medicine** **64**(9): 626-632.

HERZYK, D.J.; BUGELSKI, P.J.; HART, T.K.; WIER, P.J. 2002. Practical aspects of including functional endpoints in developmental toxicity studies. Case study: immune function in HuCD4 transgenic mice exposed to anti-CD4 MAb in utero. **Human & Experimental Toxicology** **21**: 507-512.

HOGG, S. 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** **54**(1): 21-30.

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

IBGE (2015). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2011-2012. Disponível em: <http://tecnologia.uol.com.br/noticias/redacao/2013/09/27/brasileiros-passam-a-usar-celular-como-unico-meio-telefonico-diz-pnad.htm>. Acesso em: 11/09/2015

IBRAHIM, I.Y.; ABDEL-HAKIM, S.M.; NAZMY, W.H.; SAAD, A. H.; ALI, F.F. 2015. Biological variations in adrenal gland response to immobilization and glucoprivation stressors in rats. **Endocrine Regulations** **49**(4): 217-226.

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

ICNIRP (2015). INTERNATIONAL COMMISSIONS ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION. Disponível em: <http://www.icnirp.org/en/applications/mobile-phones/index.html>. Acesso em: 04/09/2015.

IEEE (2005). INSTITUTE OF ELECTRICAL AND ELECTRONICS ENGINEERS. IEEE Standard for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 kHz to 300 GHz. **C95.1**.

ITU (2015). INTERNATIONAL TELECOMMUNICATION UNION. Disponível em: <http://www.itu.int/ict/statistics> Acesso em: 11/09/2015.

IZQUIERDO, I. E M. GRAUDENZ 1980. Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. **Psychopharmacology (Berl) 67**(3): 265-268.

IZQUIERDO, I. E J. H. MEDINA 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory 68**(3): 285-316.

JAUCHEM J, R. 2008. Effects of low-level radio-frequency (3kHz to 300GHz) energy on human cardiovascular, reproductive, immune, and other systems: a review of the recent literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health 211**(1-2): 1-29.

JHORI, R. K. E P. R. DASGUPTA 1980. Hydrogen peroxide formation in the rat uterus under hormone-induced conditions. **Journal of Endocrinology 86**: 477-481.

JIN, Y.B.; HYUNG-DO, C.; BYUNG, C.K.; JEONG-KI, P.; NAM, K.; YUN-SIL, L. 2013. Effects of simultaneous combined exposure to CDMA and WCDMA electromagnetic fields on serum hormone levels in rats. **Journal of Radiation Research 54**(3): 430-437.

JING, J.; YUHUA, Z.; XIAO-QIAN, Y.; RONGPING, J.; DONG-MEI, G.; XI, C. 2012. The influence of microwave radiation from cellular phone on fetal rat brain. **Electromagnetic Biology and Medicine 31**(1): 57-66.

JOHANSSON, O. 2006. Electrohypersensitivity: state-of-the-art of a functional impairment. **Electromagnetic Biology and Medicine 25**(4): 245-258.

JOHNSTON, A.L. E FILE, S.E. 1990. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior 49**: 245-250.

JOST, A.; VIGIER, B.; PREPIN, J.; PERCHELLET, J. P. 1973. Studies on sex differentiation in mammals. **Recent Progress in Hormone Research 29**: 1-41.

KASHIDA, S.; SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE, A.; TAKAYAMA, H.; YAMAGATA, Y.; NAKAMURA, Y.; KATO, H. 2001. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. **Biology of Reproduction** **64**: 317-323.

KAVLOCK, R. J. E C. T. GRABOWSKI 1983. Abnormal functional development of the heart, lungs, and kidneys. Approaches to functional teratology. Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina, May 11-13, 1983. **Progress in Clinical and Biological Research** **140**: 1-387.

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

KESARI, K.K.; MEENA, R.; NIRALA, J.; KUMAR, J.; VERMA, H. N. 2014. Effect of 3G cell phone exposure with computer controlled 2-D stepper motor on non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway in rat brain. **Cell Biochemistry Biophysics** **68**(2): 347-358.

KHILLARE, B. E J. BEHARI 2009. Effect of Amplitude-Modulated Radiofrequency Radiation on Reproduction Pattern in Rats. **Electromagnetic Biology and Medicine** **17**(1): 43-55.

LANGLEY-EVANS, S.C. 2015. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. **Journal of Human Nutrition and Dietetics** **28 Suppl 1**: 1-14.

LAU, C. E J. M. ROGERS 2004. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today** **72**(4): 300-312.

LEAVITT, W.W. 1985. Hormonal Regulation of Myometrial Estrogen, Progesterone, and Oxytocin Receptors in the Pregnant and Pseudopregnant Hamster. **Endocrinology** **116**: 1079-1084.

LEE, H.S. 2015. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. **Nutrients** **7**(11): 9492-9507.

LIMA, N.S.; DE MOURA, E.G.; PASSOS, M.C.; NOGUEIRA NETO, F.J.; REIS, A.M.; DE OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C. 2011. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition** **105**(9): 1405-1413.

LISBOA, P.C.; DE OLIVEIRA, E.; MANHAES, A.C.; SANTOS-SILVA, A.P.; PINHEIRO, C.R.; YOUNES-RAPOZO, V.; FAUSTINO, L.C.; ORTIGA-CARVALHO, T.M.; MOURA, E.G. 2015. Effects of maternal nicotine exposure on thyroid hormone metabolism and function in adult rat progeny. **Journal of Endocrinology** **224**(3): 315-325.

LIU, H.; ZHANG, C.; ZENG, W. 2006. Estrogenic and antioxidant effects of a phytoestrogen daidzein on ovarian germ cells in embryonic chickens. **Domestic Animals Endocrinology** 31(3): 258-268.

MAES, W. 2005. Stress Caused by Electromagnetic fields and radiation. **Neubeuern, Germany: IBN.**

MAGANHA, J.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. 2002. Fisiologia da implantação do blastocisto. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução** 21: 5-24.

MARCHLEWSKA-KOJ, A.; KAPUSTA, J.; OLEJNICZAK, P. 1999. Ultrasonic response of CBA newborn mice to bedding odour. **Behaviour** 136(3): 269-278.

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

MCCARTY, R. E P. E. GOLD 1981. Plasma catecholamines: effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. **Hormones and Behavior** 15(2): 168-182.

MEANEY, M.J.; SZYF, M.; SECKL, J.R. 2007. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. **Trends in Molecular Medicine** 13(7): 269-277.

MESSIAS, J.B.; CARACIOLO, M.C.; OLIVEIRA, I.M.; MONTARROYOS, U.R.; BASTOS, I.V.G.A.; GUERRA, M.O.; SOUZA, I.A. 2010. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru D.C.*, Cactacea. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20 (4): 478-483.

MOTAWI, T.K.; DARWISH, H.A.; MOUSTAFA, Y.M.; LABIB, M.M. 2014. Biochemical modifications and neuronal damage in brain of young and adult rats after long-term exposure to mobile phone radiations. **Cell Biochemistry Biophysics** 70(2): 845-855.

MUSSO, C.M. (2014). Avaliação da qualidade dos espermatozoides em ratos Wistar após a exposição à radiação eletromagnética de radiofrequência emitida por telefones móveis. Dissertação de mestrado apresentada a Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Juiz de Fora, Universidade Federal de Juiz de Fora.

NAKAMURA, H.; SETO, T.; NAGASE, H.; YOSHIDA, M.; DAN, S.; OGINO, K. 1997. Effects of exposure to microwaves on cellular immunity and placental steroids in pregnant rats. **Occupational and Environmental Medicine** 54(9): 676-680.

National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., I. f. L. A. R. U. S. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C., National Academies Press. xxv, .

NGAWHIRUNPAT, T.; HATANAKA, T.; KATAYAMA, K.; YOSHIKAWA, H.; KAWAKAMI, J.; ADACHI, I. 2002. Changes in electrophysiological properties of rat skin with age. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** **25**(9): 1192-1196.

ODACI, E.; BAS, O.; KAPLAN, S. 2008. Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study. **Brain Research** **1238**: 224-229.

OGAWA, K.; NABAE, K.; WANG, J.; WAKE, K.; WATANABE, S.; KAWABE, M.; FUJIWARA, O.; TAKAHASHI, S.; ICHIHARA, T.; TAMANO, S.; SHIRAI, T. 2009. Effects of gestational exposure to 1.95-GHz W-CDMA signals for IMT-2000 cellular phones: Lack of embryotoxicity and teratogenicity in rats. **Bioelectromagnetics** **30**(3): 205-212.

OLIVEIRA, E.; MOURA, E.G.; SANTOS-SILVA, A P.; FAGUNDES, A.T.; RIOS, A.S.; ABREU-VILLACA, Y.; NOGUEIRA NETO, J.F.; PASSOS, M.C.; LISBOA, P.C. 2009. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. **Journal of Endocrinology** **202**(3): 397-405.

OLIVEIRA, E.; MOURA, E.G.; SANTOS-SILVA, A.P.; PINHEIRO, C.R.; CLAUDIO-NETO, S.; PASSOS, M.C.; LISBOA, P.C. 2011. Neonatal hypothyroidism caused by maternal nicotine exposure is reversed by higher T3 transfer by milk after nicotine withdraw. **Food and Chemical Toxicology** **49**(9): 2068-2073.

OZGUR, E.; GULER, G.; SEYHAN, N. 2010. Mobile phone radiation-induced free radical damage in the liver is inhibited by the antioxidants N-acetyl cysteine and epigallocatechin-gallate. **International Journal of Radiation Biology** **86**(11): 935-945.

PACHECO, G.G. 2004. A difusão de telefonia celular no Brasil: uma investigação empírica. **PUC, Departamento de administração**.

PADMANABHAN, V. E A. VEIGA-LOPEZ 2014. Reproduction Symposium: developmental programming of reproductive and metabolic health. **Journal of Animal Science** **92**(8): 3199-3210.

PALACIO, J.R.; IBORRA, A.; ULCOVA-GALLOVA, Z.; BADIA, R.; MARTINEZ, P. 2006. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. **Clinical & Experimental Immunology** **144**(2): 217-222.

PARIA, B.C.; SONG, H.; DEY, S.K. 2001. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. **International Journal of Developmental Biology** **45**(3): 597-605.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. 1985. Validation of open: closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods** **14**(3): 149-167.

PETRAGLIA, F.; FLORIO, P.; TORRICELLI, M. 2006. Placental Endocrine Function. **Physiology of Reproduction**. J. D. Neill, Elsevier: 2847-2897.

PETRAGLIA, F.; SANTUZ, M.; FLORIO, P.; SIMONCINI, T.; LUISI, S.; PLAINO, L.; GENAZZANI, A. R.; GENAZZANI, A. D.; VOLPE, A. 1998. Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. **Journal of Reproductive Immunology** **39**(1-2): 221-233.

PEYMAN, A.; REZAZADEH, A.A.; GABRIEL, C. 2001. Changes in the dielectric properties of rat tissue as a function of age at microwave frequencies. **Physics in Medicine and Biology** **46**(6): 1617-1629.

POINDRON, P. 2005. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. **Reproduction Nutrition Development** **45**(3): 341-351.

POLK, C. E. E. POSTOW 1996. Biological Effects of Electromagnetic Fields, CRC Press.

PRATT, D. S. E. M. M. KAPLAN 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **New England Journal of Medicine** **342**(17): 1266-1271.

PSYCHOYOS, A. 1986. Uterine receptivity for implantation. **Annals of New York Academy of Sciences** **476**(36-42).

PSYCHOYOS, A. 1996. Recent research on egg implantation. Egg implantation. G. WOLSTENHOLME, O'CONNOR, R. Boston: 4-15.

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. 1991. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto, São Paulo.

RICH-EDWARDS, J.W.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; ROSNER, B.; HANKINSON, S.E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C.; HENNEKENS, C. H. 1997. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. **BMJ** **315**(7105): 396-400.

ROBERTS, R.M.; EALY, A.D.; ALEXENKO, A.P.; HAN, C. S.; EZASHI, T. 1999. Trophoblast interferons. **Placenta** **20**: 259-264.

RODGERS, R.J. & DALVI, A. 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** **21** (6): 801-810.

SADETZKI, S.; CHETRIT, A.V.; JARUS-HAKAK, A.; CARDIS, E.; DEUTCH, Y.; DUVDEVAN, S.; ZULTAN, A.; NOVIKOV, I.; FREEDMAN, L.; WOLF, M. 2008. Cellular Phone Use and Risk of Benign and Malignant Parotid Gland Tumors — A Nationwide Case-Control Study. **American Journal of Epidemiology** **167**(4): 457-467.

SANTINI, R.; SANTINI, P.; DANZE, J.M.; LE RUZ, P.; SEIGNE, M. 2002. Investigation on the health of people living near mobile telephone relay stations:

Incidence according to distance and sex. **Pathologie Biologie (Paris)** 50(6): 369-373.

SATO, Y.; AKIBA, S.; KUBO, O.; YAMAGUCHI, N. 2011. A case-case study of mobile phone use and acoustic neuroma risk in Japan. **Bioelectromagnetics** 32: 85-93.

SCHWARZ, A.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.; DAGLI, M.L.; SPINOSA, H.S. 2003. Effects of Ipomoea carnea aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. **Neurotoxicology and Teratology** 25(5): 615-626.

SHAHIN, S.; SINGH, V.P.; SHUKLA, R.K.; DHAWAN, A.; GANGWAR, R.K.; SINGH, S.P.; CHATURVEDI, C.M. 2013. 2.45 GHz microwave irradiation-induced oxidative stress affects implantation or pregnancy in mice, *Mus musculus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 169(5): 1727-1751.

SILVA, V.A. 1991. Métodos experimentais utilizados na avaliação de efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese (métodos e critérios de avaliação). M. N. RABELO-GAY. São Paulo: 219-241.

SIMMONS, R. 2005. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 16(8): 390-394.

SPEAR, L.P. E S.E. FILE 1996. Methodological considerations in neurobehavioral teratology. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 55(4): 455-457.

STALLKNECHT, B. 2004. Influence of physical training on a adipose tissue metabolism – with special focus on effects of insulin and epinephrine. **Danish Medical Bulletin** 51(1): 1-33.

STRAUSS, J. E. C. COUTIFARIS 1999. The endometrium and myometrium: regulation and dysfunction. *Reproduction endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management*. S. S. C. Yen, R. B. Affe and R. L. Barbieri. Philadelphia: EB Saunders.

STRAUSS, J.F.; MARTINEZ, F.; KIRIAKIDOU, M. 1996. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. **Biology of Reproduction** 54(2): 303-311.

STUMP, D.G.; NEMEC, M.D.; PARKER, G.A.; CODER, P.S.; SLOTER, E.D.; VARSHO, B.J. 2011. Significance, Reliability, and Interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*. H. RD, CRC Press: 229-301.

SUGINO, N.; KASHIDA, S.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE-HARADA, A.; KATO, H. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in rat corpus luteum: regulation by oestradiol during mid-pregnancy. **Reproduction** 122(6): 875-881.

SUN, W.; SHEN, X.; LU, D.; FU, Y.; LU, D.; CHIANG, H. 2012. A 1.8-GHz radiofrequency radiation induces EGF receptor clustering and phosphorylation in cultured human amniotic (FL) cells. **International Journal of Radiation Biology** **88**(3): 239-244.

TAKAHASHI, S.; IMAI, N.; NABAE, K.; WAKE, K.; KAWAI, H.; WANG, J.; WATANABE, S.; KAWABE, M.; FUJIWARA, O.; OGAWA, K.; TAMANO, S.; SHIRAI T. 2010. Lack of adverse effects of whole-body exposure to a mobile telecommunication electromagnetic field on the rat fetus. **Radiation Research** **173**(3): 362-372.

TAMURA, H. E. G. S. GREENWALD 1987. Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. **Biology of Reproduction** **36**(5): 1149-1154.

TELECO (2016). Estações Rádio Base no Brasil por Operadora. Disponível em: <http://www.teleco.com.br/erb.asp>. Acesso em: 26/02/2016.

TORRES, C. E. M. D. ESCARABAJAL 2002. Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. **Life Science** **70**(15): 1751-1762.

VIEAU, D.; LABORIE, C.; EBERLÉ, D.; LESAGE, J.; BRETON, C. 2016. Maternal nutritional manipulations: is the adipose tissue a key target of programming? **Médecine Sciences (Paris)** **32**(1): 81-84.

VIJAYALAXMI E T. J. PRIHODA 2012. Genetic damage in human cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields: a meta-analysis of the data from 88 publications (1990-2011). **Mutation Research** **749**(1-2): 1-16.

VINIJSANUN, A.; MARTIN, L.; WANG, D. Y.; FANTL, V. E. 1990. Effects of a monoclonal antibody against progesterone, on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. **Reproduction, Fertility and Development** **2**(4): 395-405.

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

WHO (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.

WHO (2015). World Health Organization. Non-ionizing radiation part 2 Radiofrequency electromagnetic fields volume 102. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol102/>. Acesso em: 11/09/2015.

YAKYMENKO, I.; TSYBULIN, O.; SIDORIK, E.; HENSHEL, D.; KYRYLENKO, O.; KYRYLENKO, S. 2015. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation. **Electromagnetic Biology and Medicine**: 1-16.

YOSHINAGA, K. 1988. Uterine receptivity for blastocyst implantation. **Annals of the New York Academy of Sciences** **541**: 424-431.

YOUNES-RAPOZO, V.; DE MOURA, E.G.; DA SILVA LIMA, N.; BARRADAS, P.C.; MANHAES, A.C.; DE OLIVEIRA, E.; LISBOA, P.C. 2012. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. **British Journal of Nutrition** **108**(12): 2286-2295.

YOUNES-RAPOZO, V.; MOURA, E.G.; MANHAES, A.C.; PEIXOTO-SILVA, N.; DE OLIVEIRA, E.; LISBOA, P.C. 2015. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. **British Journal of Nutrition** **113**(3): 536-545.

YOUNG, J.B. 2002. Programming of sympathoadrenal function. **Trends in Endocrinology and Metabolism** **13**(9): 381-385.

YU, A.; LI, P.; TANG, T.; WANG, J.; CHEN, Y.; LIU, L. 2015. Roles of Hsp70s in Stress Responses of Microorganisms, Plants, and Animals. **BioMed Research International** **2015**: 510319.

YUKSEL, M.; NAZIROGLU, M.; OZKAYA, M. O. 2015. Long-term exposure to electromagnetic radiation from mobile phones and Wi-Fi devices decreases plasma prolactin, progesterone, and estrogen levels but increases uterine oxidative stress in pregnant rats and their offspring. **Endocrine**.

ZALATA, A.; EL-SAMANOUDY, A.Z.; SHAALAN, D.; EL-BAIOMY, Y.; MOSTAFA, T. 2015. In vitro effect of cell phone radiation on motility, DNA fragmentation and clusterin gene expression in human sperm. **International Journal Fertility and Sterility** **9**(1): 129-136.

8. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 076/2012– CEEA sobre “EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FETAL E SISTEMA ENDÓCRINO DE RATAS WISTAR (RATTUS NORVEGICUS BERKENHOUT,1769)”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de RAÚL MARCEL GONZÁLEZ GARCIA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 48 animais (36 fêmeas e 12 machos) da linhagem Wistar, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 076/2012- CEEA about “EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FETAL E SISTEMA ENDÓCRINO DE RATAS WISTAR (RATTUS NORVEGICUS BERKENHOUT,1769)”, under responsibility of RAÚL MARCEL GONZÁLEZ GARCIA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/10/2012. For the development of this research 48 animals (36 female and 12 male) lineage Wistar were released, as requested.

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.



Presidente/ CEEA



p/ Secretário/CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 076/2012- CEEA sobre “EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FETAL E SISTEMA ENDÓCRINO DE RATAS WISTAR (RATTUS NORVEGICUS BERKENHOUT,1769)”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de RAÚL MARCEL GONZÁLEZ GARCIA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 48 animais (36 fêmeas e 12 machos) da linhagem Wistar, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 076/2012- CEEA about “EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FETAL E SISTEMA ENDÓCRINO DE RATAS WISTAR (RATTUS NORVEGICUS BERKENHOUT,1769)”, under responsibility of RAÚL MARCEL GONZÁLEZ GARCIA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/10/2012. For the development of this research 48 animals (36 female and 12 male) lineage Wistar were released, as requested.

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.



Presidente/ CEEA



p/ Secretário/CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais

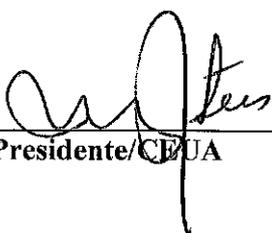
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 098/2012 – CEUA sobre “EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO DE SUAS CRIAS E O SISTEMA ENDÓCRINO”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de RAÚL MARCEL GONZÁLEZ GARCIA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/06/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 54 ratos (18 machos e 36 fêmeas) da linhagem Wistar, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/07/2013 a 01/03/2014.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 098/2012- CEUA about “EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA A APARELHO DE TELEFONIA MÓVEL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO DE SUAS CRIAS E O SISTEMA ENDÓCRINO”, under responsibility of RAÚL MARCEL GONZÁLEZ GARCIA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 04/06/2013. For the development of this research 54 rats (18 males and 36 females) of Wistar lineage, were released, as requested and they will be delivered in the period of 01/07/2013 to 01/03/2014.

Juiz de Fora, 06 de Junho de 2013.



Presidente/CEUA



Secretário/CEUA