

# Integridade de DNA e morfologia espermática de ratos submetidos a campos eletromagnéticos de baixa frequência durante diferentes períodos do desenvolvimento

Bruno Mendes Tenorio<sup>1</sup>, George Chaves Jimenez<sup>1</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>, Romildo de Albuquerque Nogueira<sup>1</sup> e Valdemiro Amaro da Silva Junior<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Área de Reprodução, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: vajunior@dmfa.ufpe.br

**RESUMO.** A exposição da sociedade a Campos Eletromagnéticos (CEM) vem aumentando vertiginosamente em virtude da ampla expansão tecnológica observada nos últimos anos. Tanto a geração, como a distribuição e a utilização de energia elétrica podem gerar Campos Eletromagnéticos de baixa frequência (50 e 60 Hz). Pesquisas vêm demonstrando que a exposição a estes CEM podem proporcionar alterações fisiológicas significativas, apesar disto, ainda não estão totalmente esclarecidos a extensão destes efeitos, nem os mecanismos de ação que envolve a interação dos CEM com os organismos biológicos. O presente trabalho teve como principal objetivo verificar os efeitos dos CEM (60 Hz e 1 mT) sobre a integridade de DNA e morfologia espermática de ratos sexualmente maduros, que foram expostos ao CEM durante diferentes períodos do seu desenvolvimento. Os resultados obtidos neste trabalho não encontraram indícios de alterações no DNA dos espermatozoides, porém, foram observadas alterações significativas na morfologia dos espermatozoides após a exposição ao CEM. Estas alterações na morfologia espermática podem reduzir o potencial reprodutivo. Portanto, devemos considerar o CEM como um potencial risco a saúde pública, recomendando-se a realização de mais pesquisas buscando estabelecer níveis seguros de exposição aos CEM.

**Palavras-chave:** ondas eletromagnéticas, radiação não-ionizante, espermatozóide, lesões de DNA, patologias espermáticas.

**ABSTRACT.** DNA integrity and sperm morphology of Wistar rats exposed to low frequency electromagnetic fields during different periods of development. The society's exposure to electromagnetic fields (EMF) has been growing considerable due to the great technological expansion observed in the last few years. Generation as well as distribution and use of electric energy can generate low frequency electromagnetic fields (50 and 60 Hz). Issues have been demonstrating that EMF exposure could provoke significantly physiological changes, however, the extension of EMF effects weren't totally clarified. The major objective of this issue was to evaluate the EMF (60 Hz and 1 mT) effects on DNA integrity and sperm morphology in Wistar rats with mature sexuality that were exposed during different stages of testicular development. According to our results, EMF did not change DNA integrity, but we could observe morphological changes in sperm after exposure to EMF. These changes in sperm morphology may reduce the reproductive potential. Therefore, we should consider the EMF as a potential risk to public health, recommending the implementation of further research seeking to establish safe levels of exposure to EMF.

**Keywords:** electromagnetic wave, non-ionizing radiation, spermatozoa, DNA damage, sperm pathologies.

## Introdução

Nas últimas décadas, pode-se observar uma ampla expansão tecnológica e o desenvolvimento de novos equipamentos, entre eles os aparelhos eletroeletrônicos. A geração, a distribuição e a utilização de energia elétrica podem gerar Campos Eletromagnéticos (CEM) de baixa frequência (50 e

60 Hz), de diferentes intensidades e por períodos de tempos variáveis, ao qual se encontra diariamente exposta grande parte da população. Estas exposições variam em função do tipo de trabalho exercido, da sua moradia, bem como dos hábitos diários de cada indivíduo, tornando-se difícil estipular um padrão de exposição a estes CEM.

A possibilidade de que os CEM possam interagir com os sistemas biológicos despertou o interesse da comunidade científica sobre os efeitos dos CEM em diferentes sistemas biológicos (KLIUKIENE et al., 2004; KHEIFETS et al., 2005; RAJKOVIC et al., 2006; GARCÍA et al., 2008).

Estudos epidemiológicos correlacionando os CEM de baixa frequência com possíveis efeitos adversos na reprodução tem sido relatados (SHAW; CROEN, 1993; AHLBOM et al., 2001; BLAASAAS et al., 2002). Com base nas observações epidemiológicas, diversos estudos *in-vitro* vêm sendo conduzidos para elucidar a extensão destes efeitos, bem como os possíveis mecanismos de ação dos CEM no sistema reprodutivo de machos e fêmeas.

Al-Akhras et al. (2001), observaram redução de fertilidade em ratos machos e fêmeas expostos a campos magnéticos de baixa frequência. Também foi observado um aumento no número de reabsorções fetais, redução de implantações uterinas e de fetos vivos ao término da gestação.

A maioria dos estudos envolvendo campos elétricos e magnéticos abordam aspectos reprodutivos em fêmeas e a gestação, sendo em menor quantidade os estudos publicados a respeito das alterações que os CEM podem promover na estrutura tecidual do trato reprodutor masculino (TABLADO et al., 1998). Alguns autores, no entanto, observaram possíveis efeitos adversos no sistema reprodutivo masculino em decorrência da exposição aos campos elétricos e magnéticos.

Ramadan et al. (2002) observaram alterações na contagem, motilidade e produção diária de espermatozoides, além de alterações no exame histopatológico dos testículos em ratos expostos a campos magnéticos de baixa frequência com intensidade de 20 mT. Aydin et al. (2007) estudaram os efeitos de CEM de 50 Hz e 48,21 mG irradiados continuamente em ratos durante 1, 2 e 3 meses. A biópsia testicular revelou menores escores nos animais expostos aos CEM e o exame histopatológico do testículo demonstrou que houve uma desaceleração da espermatogênese e degeneração de células germinativas. Lee et al. (2004) observaram que a exposição de ratos adultos a CEM de baixa frequência (60 Hz) e intensidade de 0,5 mT, durante oito semanas, aumentou a incidência de morte das células germinativas induzidas por apoptose e promoveu decréscimo na quantidade de células vivas nos testículos. Kim et al. (2009) observaram que campos magnéticos de 60 Hz e 14  $\mu$ T irradiados continuamente em camundongos também induzem o aumento na incidência de apoptose nas células germinativas, principalmente em espermatogônias. De Vita et al.

(1995) também observaram possíveis efeitos citotóxicos ou citoestáticos dos campos magnéticos de 50 Hz e intensidade de 1,7 mT sobre espermatogônias em diferenciação.

Tendo em vista a necessidade de novos estudos para se averiguar a possibilidade de interação dos CEM de baixa frequência com o sistema reprodutivo masculino, foi proposto no presente trabalho investigar a integridade de DNA e morfologia de espermatozoides provenientes de *Rattus norvegicus* sexualmente maduros expostos a CEM de baixa frequência (60 Hz) e 1 mT de densidade de fluxo magnético em diferentes fases do desenvolvimento testicular.

## Material e métodos

### Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-DMFA da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Estado de Pernambuco. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), e em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação à vontade.

### Delineamento experimental

Fêmeas foram acasaladas com machos da mesma linhagem. Após a confirmação do acasalamento, da prenhez e a previsão da data do parto, estes animais foram alojados em gaiolas individuais. As fêmeas destinadas à exposição às ondas eletromagnéticas foram tratadas a partir do 13º dia de gestação. Ao nascimento, os filhotes machos foram separados e constituíram os seguintes grupos: I) animais expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias após o nascimento; II) animais expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 90 dias pós-natal; III) animais controle analisados aos 90 dias após o nascimento, estes animais foram submetidos às mesmas condições experimentais e manipulações dos grupos tratados, com a exceção da presença do CEM; IV) animais falso controle, analisados aos 90 dias pós-natal, estes animais não sofreram nenhum tipo de manipulação, apenas receberam os cuidados padrão de manejo para criação de animais de laboratório. Este grupo foi formado para excluir a possibilidade de que a manipulação dos animais interfira nos parâmetros analisados.

Os espermatozoides dos animais de todos os grupos foram coletados no 90º dia de vida após o nascimento.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEEAD-DMFA/UFRPE N° 06587/2006).

#### Exposição aos campos eletromagnéticos

Os grupos experimentais foram expostos a CEM com frequência de 60 Hz e intensidade de fluxo magnético de 1 mT. Os CEM foram irradiados por uma série de bobinas de Helmholtz (PHYWE / GERMANY) ligadas em paralelo a uma fonte geradora de ondas senoidais (STUFENTRAFO POWER SUPPLY 14V/AC – PHYWE / GERMANY). Os animais foram posicionados em um compartimento cilíndrico de Poli Cloreto de Vinila (PVC), localizado espacialmente na região central da bobina de Helmholtz. Esta é caracterizada por pares de bobinas circulares planas, contendo determinado número de espiras e correntes elétricas fluindo no mesmo sentido, a separação entre estas bobinas deve ser igual ao raio comum a ambas (ROBERT, 2003). A região central da bobina de Helmholtz fornece um campo eletromagnético uniforme e permite que as linhas do campo elétrico e magnético incidam transversalmente nos animais.

Para monitorar a variação do CEM nas áreas de exposição foi utilizado um Teslômetro (PHYWE-GERMANY) para aferir a densidade de fluxo magnético e um osciloscópio (MIMIPA MO-125 OS de 50 MHz - TRIEFIELD BROADBAND METER-EUA) para monitorar a frequência das ondas emitidas pelas bobinas. A exposição ao CEM de baixa frequência foi realizada durante os períodos experimentais em três aplicações diárias de 30 minutos, pois a aplicação em doses fracionadas parece ter resultado mais pronunciado que a aplicação constante ao CEM (RAMADAN et al., 2002).

#### Análise da morfologia espermática

Amostras de espermatozoides coletadas por punção da cauda do epidídimo foram diluídas em formol citrato na concentração de 2,9% para a análise da morfologia espermática. Após a diluição, foi colocada uma gota da amostra diluída em lâmina, sendo coberta por lamínula e posteriormente selada, como descrito no método de Câmara Úmida, de acordo com Mies Filho et al. (1986), foram avaliados 100 espermatozoides por animal, utilizando-se microscópio de contraste de fase (OLYMPUS BX41TF – JAPAN). Para as análises da morfologia espermática foram utilizados 7 animais no grupo falso controle, 10 animais no grupo controle e 10 animais nos grupos tratados com o CEM.

#### Análise da integridade de DNA

A coleta das amostras de espermatozoides foi realizada mediante a punção na cauda do epidídimo. Na análise da integridade de DNA foi utilizada a técnica de Orange Acridina adaptada de Evenson et al. (1999). As amostras foram diluídas em solução tampão (0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA e 0,01 M Tris, pH 7.4) e acondicionadas em tubos Eppendorf. Posteriormente, as amostras diluídas foram criopreservadas em nitrogênio líquido e armazenadas à -20°C. Após o processamento das amostras, foram retiradas alíquotas de 5  $\mu$ L, que foram colocadas em lâmina e cobertas por lamínula, prosseguindo-se com a observação em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro “B” (OLYMPUS BX41TF/U-KPA – JAPAN).

Foi realizada a contagem de 100 espermatozoides por animal, sendo a extensão da desnaturação do DNA quantificada pelo parâmetro de fluorescência  $\alpha$ t, onde  $\alpha$ t = vermelho/vermelho + verde. Em animais com pequena desnaturação de DNA, a cromatina apresenta uma distribuição estreita de  $\alpha$ t. Espermatozoides com o DNA em condições fisiológicas apresentam fluorescência verde, enquanto que o DNA de espermatozoides com estruturas de cromatina anormais geralmente apresentam a fluorescência vermelha aumentada e uma distribuição de  $\alpha$ t mais extensa. Estes apresentam um canal médio maior de  $\alpha$ t e uma maior porcentagem de células fora da população de células principais COMP $\alpha$ t que possuem o DNA íntegro. O desvio padrão de  $\alpha$ t (SD $\alpha$ t) descreve a extensão de anormalidade da estrutura de cromatina em uma população. A fluorescência verde média reflete o conteúdo de DNA e/ou o grau de condensação da cromatina espermática. Para as análises da integridade de DNA foram utilizados 8 animais nos grupos tratados com o CEM e 6 animais no grupo controle.

#### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional STATISTICA 6.0 (Copyright® StarSoft, Inc., 2001), através do teste não paramétrico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão). As análises do parâmetro  $\alpha$ t foram realizadas no programa computacional InStat (GraphPad Software, Inc., 2000). Inicialmente realizou-se o teste de Kolmogorov e Smirnov para verificar a tendência de normalidade dos dados obtidos, como os dados apresentaram-se normais, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) complementado

com o teste Tukey. O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para  $p < 0,05$ .

## Resultados e discussão

Em relação à morfologia espermática, observou-se maior frequência de alterações nos espermatozoides dos animais expostos ao CEM em relação ao grupo controle e falso controle (Tabelas 1 e 2). O número de espermatozoides morfologicamente anormais foi 64 e 63% maior nos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias em relação, respectivamente, ao grupo falso controle e controle, enquanto que nos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal este aumento foi de 41 e 38% em relação, respectivamente, ao grupo falso controle e ao controle. Entre os animais expostos ao CEM o número de espermatozoides morfologicamente anormais foi 39% maior nos animais expostos até os 90 dias em relação aqueles expostos até os 21 dias.

Os resultados demonstraram que o número de células morfologicamente anormais e normais foi estatisticamente diferente entre os animais expostos ao CEM tanto por 21 quanto por 90 dias em relação aos grupos falso controle e controle. Também foi observada diferença estatisticamente significativa entre os animais expostos até 21 dias pós-natal em relação aos expostos até os 90 dias pós-natal.

As alterações espermáticas mais observadas foram as do tipo gota citoplasmática distal, pseudo-gota, cauda quebrada, cauda enrolada e cabeça isolada. Estes defeitos espermáticos podem ocorrer devido a alterações primárias (falha na espermatogênese no testículo), secundárias (durante a passagem dos espermatozoides no epidídimo) ou ainda terciárias, que neste caso pode ocorrer devido à manipulação em laboratório (HAFEZ, 1995). Contudo, esta última alternativa pode ser descartada em virtude de que todas as amostras analisadas foram processadas utilizando-se a mesma equipe, metodologia, equipamentos e materiais. Defeitos espermáticos

como presença de gota citoplasmática distal, podem estar associados a alterações no epidídimo, pois a descida e a liberação da gota citoplasmática ocorrem durante a passagem do espermatozoide no epidídimo (RUSSELL et al., 1990).

**Tabela 2.** Análise estatística da morfologia espermática, demonstrando os grupos experimentais em que células morfologicamente anormais e normais foram significativamente diferentes. Utilizou-se nível de significância de 5%.

|  | Grupo Controle<br>(n = 10)      | Grupo Exposto 21<br>dos 90 dias<br>(n = 10) | Exposto até os 90<br>dias (n = 10)   |
|--|---------------------------------|---|--------------------------------------|
| Grupo Falso<br>Controle<br>(n = 7)       | $\chi^2 = 0,04 /$<br>$p = 0,83$ | $\chi^2 = 6,57 /$<br>$p = 0,01^*$           | $\chi^2 = 25,71 /$<br>$p < 0,0001^*$ |
| Grupo Controle<br>(n = 10)               | -                               | $\chi^2 = 7,06 /$<br>$p = 0,007^*$          | $\chi^2 = 31,03 /$<br>$p < 0,0001^*$ |
| Grupo Exposto 21<br>dos 90 dias (n = 10) | -                               | -   | $\chi^2 = 9,06 /$<br>$p = 0,002^*$   |

\*Estatisticamente diferentes para  $p < 0,05$ .

Segundo Nascimento e Santos (2003), dependendo da extensão e do número de túbulos seminíferos afetados por alterações na espermatogênese, podem ocorrer alta porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos. Ramadan et al. (2002) observaram que camundongos adultos expostos a campos magnéticos de 20 mT em doses fracionadas de 30 minutos por dia, 3 vezes por semana, durante 2 semanas, sofreram redução na produção diária de espermatozoides, alterações no diâmetro dos túbulos seminíferos e redução da espermatogênese nos túbulos seminíferos. Aydin et al. (2007) estudou os efeitos de CEM de 50 Hz e 48,21 mG irradiados continuamente em ratos durante 1, 2 e 3 meses, foi observado menores escores na biópsia testicular dos animais expostos aos CEM, o exame histopatológico do testículo também demonstrou que houve uma desaceleração da espermatogênese e degeneração de células germinativas. Portanto, os defeitos espermáticos observados no presente trabalho podem estar relacionados a alterações nos testículos ou epidídimos, quando estes estiveram sob a influência do CEM.

**Tabela 1.** Morfologia espermática de ratos Wistar submetidos a diferentes períodos de exposição a Campos Eletromagnéticos de 60 Hz de frequência e 1 mT de densidade de fluxo magnético (Média  $\pm$  Desvio Padrão).

|  | Falso Controle<br>(n = 7) | Controle<br>(n = 10) | Exposto 21 dos 90 dias<br>(n = 10) | Exposto até os 90 dias<br>(n = 10) |
|--|---------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Total de espermatozoides normais               | 95,72 $\pm$ 1,25          | 95,50 $\pm$ 3,75     | 92,70 $\pm$ 4,37                   | 88,00 $\pm$ 7,87                   |
| Total de espermatozoides com patologias        | 4,28 $\pm$ 1,26           | 4,50 $\pm$ 3,74      | 7,30 $\pm$ 4,38                    | 12,00 $\pm$ 7,87                   |
| Espermatozoides com gota citoplasmática distal | -                         | 2,70 $\pm$ 3,37      | 3,90 $\pm$ 4,28                    | 7,20 $\pm$ 7,00                    |
| Espermatozoides com pseudo-gota distal         | -                         | 0,50 $\pm$ 0,70      | 0,60 $\pm$ 1,07                    | 0,80 $\pm$ 1,16                    |
| Espermatozoides com cauda enrolada             | 2,75 $\pm$ 0,9            | 0,30 $\pm$ 0,42      | 0,70 $\pm$ 1,05                    | 1,0 $\pm$ 1,22                     |
| Espermatozoides com cauda quebrada             | 0,49 $\pm$ 0,48           | 0,70 $\pm$ 0,48      | 0,90 $\pm$ 0,99                    | 1,10 $\pm$ 0,99                    |
| Espermatozoides com cabeça isolada             | 0,34 $\pm$ 0,4            | 0,20 $\pm$ 0,42      | 0,50 $\pm$ 1,26                    | 0,80 $\pm$ 0,94                    |
| Espermatozoides com cabeça estraçalhada        | 0,42 $\pm$ 0,5            | -                    | 0,40 $\pm$ 0,69                    | 0,50 $\pm$ 0,85                    |
| Outras   | -                         | 0,2 $\pm$ 0,62       | 0,30 $\pm$ 0,93                    | 0,6 $\pm$ 1,41                     |

Os resultados estão expressos em porcentagem do total de espermatozoides analisados.

A análise da morfologia espermática pode ser considerada um método simples e relativamente rápido, que é amplamente utilizado para demonstrar o potencial tóxico de agentes que podem interferir na espermatogênese (TABLADO et al., 1998). Os resultados observados no presente estudo sugerem que os CEM podem interferir no processo espermatogênico ou na maturação espermática, resultando na produção de espermatozoides morfológicamente anormais. Pode-se observar ainda que o aumento do tempo de exposição dos animais ao CEM elevou o número de patologias espermáticas, sugerindo que os CEM possuem uma ação acumulativa no organismo.

Heredia-Rojas et al. (2004) não observaram alterações na morfologia espermática de animais expostos a CEM de baixa frequência e 2 mT por um período contínuo de 72 horas ou por períodos de 8h dia<sup>-1</sup> durante 10 dias. Tablado et al. (1998) verificou o efeito do campo magnético de baixa frequência com intensidade de 0,7 T em ratos, durante 35 dias (um grupo irradiado somente 1h dia<sup>-1</sup> e outro durante 24h dia<sup>-1</sup>) sob a morfologia e morfometria espermática. Os autores observaram diferença estatística significativa apenas na diminuição da angulação da cabeça dos espermatozoides, o que sugere a possibilidade da interação deste campo com o processo espermatogênico. Contudo, enfatizaram que estas alterações teriam pouca importância na fertilidade.

Em ambos os trabalhos citados anteriormente foram realizadas exposições a campos elétricos e/ou magnéticos em animais sexualmente maduros. Por outro lado, em nosso estudo a exposição ao CEM foi realizada desde o terço final da gestação até o amadurecimento do sistema reprodutivo. A variação na fase do desenvolvimento dos animais expostos e a intensidade do campo utilizado nos experimentos podem justificar a diferença entre os nossos resultados e os dos autores citados.

Não houve diferença estatisticamente significativa na análise da integridade do DNA entre os animais expostos ao CEM nos diferentes períodos do desenvolvimento. Esta diferença também não foi significativa quando comparamos este parâmetro entre os grupos expostos ao CEM e o grupo controle. Também não houve diferença significativa em relação à extensão da desnaturação do DNA ( $\alpha$ ) nos espermatozoides dos animais expostos ao CEM (Tabela 3).

Diversos genes estão envolvidos no processo de formação dos espermatozoides e na manutenção da sua morfologia normal, Heredia-Rojas et al. (2004)

não observaram alterações em cromossomos meióticos de espermatócitos quando expostos a campos magnéticos de 2 mT e 60 Hz. Nossos resultados também não evidenciaram alterações significativas na integridade de DNA de espermatozoides originados da cauda do epidídimo de animais expostos a CEM de 60 Hz e 1 mT.

**Tabela 3.** Análise da integridade do DNA em espermatozoides de ratos Wistar submetidos a diferentes períodos de exposição a Campos Eletromagnéticos de 60 Hz de frequência e 1 mT de densidade de fluxo magnético (média  $\pm$  desvio padrão).

|                 | Grupo Controle<br>(n = 06)                          | Grupo Exposto<br>21 dos 90 dias<br>(n = 08)         | Exposto até os<br>90 dias<br>(n = 08)               | F / p                 |
|-----------------|---|---|---|-----------------------|
| DNA íntegro (%) | 99,99 $\pm$ 0,40                                    | 99,75 $\pm$ 0,46                                    | 99,62 $\pm$ 0,51                                    | F = 0,35/<br>p = 0,70 |
| $\alpha$        | 1,66 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 4,08 x 10 <sup>3</sup> | 2,50 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 4,62 x 10 <sup>3</sup> | 3,75 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 5,17 x 10 <sup>3</sup> | F = 0,35/<br>p = 0,70 |

\*Estatisticamente diferentes para p < 0,05.

Os efeitos deletérios dos CEM em mamíferos ainda são contraditórios (LUO et al., 2006). Tem sido demonstrado que campos elétricos e magnéticos podem causar efeitos genotóxicos em diversos tipos celulares, tais como células progenitoras neurais de camundongo, células nervosas cerebrais e células da granulosa em ratos, linfócitos, fibroblastos e melanócitos humanos e embriões de camundongo (ESTÉCIO; SILVA, 2002; LAI; SINGH, 2004; IVANCSITS et al., 2005; NIKOLOVA et al., 2005; LUO et al., 2006). Possivelmente estes campos elétricos e magnéticos atuam influenciando a susceptibilidade a danos no DNA (WOLF et al., 2005). Nossos resultados não mostraram diferenças significativas em relação à integridade de DNA dos espermatozoides de animais expostos ou não ao CEM. Estes estão em concordância com os resultados encontrados por McCann et al. (1998), que também não observaram efeitos genotóxicos em animais submetidos a campos elétricos e magnéticos. No entanto, a maioria dos estudos desenvolvidos fazem ressalvas sobre o real significado biológico destes resultados, bem como da necessidade de se investigar futuramente estas áreas de pesquisa.

Ivancsits et al. (2005) observaram que os efeitos genotóxicos causados pelos CEM podem variar em virtude do tipo celular analisado. Por exemplo, foram observados efeitos genotóxicos em fibroblastos humanos, melanócitos humanos e células da granulosa de ratos, porém nenhuma modificação genotóxica foi observada em linfócitos humanos, monócitos humanos e células musculares esqueléticas humanas. Não observamos neste trabalho alterações significativas na integridade de

DNA dos espermatozoides quando expostos a CEM de baixa frequência *in-vivo*. Existe a possibilidade de que este tipo celular não responda ao estímulo causado pelo CEM, bem como a metodologia utilizada para avaliar o nível da integridade do DNA pode não ser sensível ao tipo de alteração cromossomal existente. Nikolova et al. (2005) sugeriram que respostas do organismo em nível de transcrição de genes podem não estar associadas com alterações detectáveis na fisiologia celular em virtude de mecanismos compensatórios pré ou pós-tradução. Portanto, sugere-se que as respostas celulares podem ter sido diferentes em virtude da variação entre as situações *in vivo* e *in vitro*, pois *in vivo* diversos mecanismos de regulação e adaptação são utilizados em resposta a estímulos nocivos ao material genético do animal. Diante desta constatação, e em acordo com Estécio e Silva (2002), fazem-se necessárias mais pesquisas com diferentes técnicas que visem investigar a atuação genotóxica dos campos elétricos e magnéticos.

Lai e Singh (2004) demonstraram que campos magnéticos podem interferir no mecanismo de apoptose celular. O aumento na incidência de morte por apoptose das células germinativas de animais expostos a campos elétricos e magnéticos também foi observado por Lee et al. (2004) e Kim et al. (2009). Esta via de destruição celular pode atuar como mecanismo compensatório / regulatório do organismo para reduzir possíveis efeitos tóxicos dos CEM nas células da linhagem espermatogênica e evitar a formação de espermatozoides inviáveis.

Várias metodologias têm sido utilizadas para a exposição a campos elétricos e magnéticos, com diferenças na frequência, intensidade e no tempo de exposição. Os efeitos contraditórios encontrados como resposta nos diferentes estudos acerca da exposição dos sistemas biológicos a estes campos elétricos e magnéticos caracterizam o efeito “janela”, que consiste em diferentes respostas do organismo em função da variação da frequência e intensidade do campo utilizado, agravada pela variação do tempo de exposição.

Apesar de não se observar alterações significativas na integridade de DNA dos espermatozoides, estes animais podem apresentar uma capacidade de fertilização reduzida em virtude do aumento na quantidade de espermatozoides defeituosos. Fazem-se necessários novos estudos visando elucidar os possíveis mecanismos de ação destes CEM no sistema reprodutor masculino.

Tendo em vista as contradições observadas nos resultados disponíveis até o presente momento e em concordância com Kheifets et al. (2005), sugerimos a realização de pesquisas adicionais e o desenvolvimento de políticas preventivas abordando a exposição de organismos biológicos a campos elétricos e magnéticos.

## Conclusão

Neste trabalho não foram encontrados indícios de alterações na integridade do DNA de espermatozoides nos animais expostos a CEM de baixa frequência, porém, foram observadas alterações significativas na morfologia espermática, que podem resultar na redução do potencial reprodutivo. Tendo em vista os resultados contraditórios e inconclusivos sobre a ação do CEM em sistemas biológicos, é salutar considerar os CEM como um potencial risco a saúde pública, recomendando-se a realização de mais pesquisas buscando estabelecer níveis seguros de exposição aos CEM visando à adoção de políticas preventivas efetivas.

## Referências

- AHLBOM, A.; CARDIS, E.; GREEN, A.; LINET, M.; SAVITZ, D.; SWERDLOW, A. Review of the epidemiologic literature on EMF and health. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 6, p. 911-933, 2001.
- AL-AKHRAS, M. A.; ELBETIEHA, A.; HASAN, M. K.; AL-OMARI, I.; DARMANI, H.; ALBISS, B. Effects of extremely low frequency magnetic field on fertility of adult male and female rats. **Bioelectromagnetics**, v. 22, n. 5, p. 340-344, 2001.
- AYDIN, M.; TÜRK, G.; YÜKSEL, M.; ÇEVİK, A.; APAYDIN, A. M.; YILMAZ, Z. Effect of electromagnetic field on the sperm characteristics and histopathological status of testis in rats. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 63, n. 2, p. 178-183, 2007.
- BLAASAAS, K. G.; TYNES, T.; IRGENS, A.; LIE, R. T. Risk of birth defects by parental occupational exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a population based study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 59, n. 2, p. 92-97, 2002.
- DE VITA, R.; CAVALLO, D.; RAGANELLA, L.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M. G.; CALUGI, A. Effects of 50 Hz magnetic field on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometric analysis. **Bioelectromagnetics**, v. 16, n. 5, p. 330-334, 1995.
- ESTÉCIO, M. R. H.; SILVA, A. E. Chromosome abnormalities caused by computer video display monitors' radiation. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 330-336, 2002.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS,

- P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- GARCÍA, A. M.; SISTERNAS, A.; HOYOS, S. P. Occupational exposure to extremely low frequency electric and magnetic fields and Alzheimer disease: a meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 2, p. 329-340, 2008.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995.
- HEREDIA-ROJAS, J. A.; CABALLERO-HERNANDEZ, D. E.; FUENTE, A. O. R.; RAMOS-ALFANO, G.; RODRIGUEZ-FLORES, L. E. Lack of alterations on meiotic chromosomes and morphological characteristics of male germ cells in mice exposed to a 60 Hz and 2.0 Mt magnetic field. **Bioelectromagnetics**, v. 25, n. 1, p. 63-68, 2004.
- IVANCSITS, S.; PILGER, A.; DIEM, E.; JAHN, O.; RÜDIGER, H. W. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. **Mutation Research**, v. 583, n. 2, p. 184-188, 2005.
- KHEIFETS, L.; REPACHOLI, M.; SAUNDERS, R.; DEVENTER, E. The sensitivity of children to electromagnetic fields. **Pediatrics**, v. 116, n. 2, p. 303-313, 2005.
- KIM, Y. W.; KIM, H. S.; LEE, J. S.; KIM, Y. J.; LEE, S. K.; SEO, J. N.; JUNG, K. C.; KIM, N.; GIMM, Y. M. Effects of 60 Hz 14 mT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. **Bioelectromagnetics**, v. 30, n. 1, p. 66-72, 2009.
- KLIUKIENE, J.; TYNES, T.; ANDERSEN, A. Residential and occupational exposures to 50-Hz magnetic fields and breast cancer in woman: a population – based study. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 9, p. 852-861, 2004.
- LAI, H.; SINGH, N. P. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 6, p. 687-694, 2004.
- LEE, J. S.; AHN, S. S.; JUNG, K. C.; KIM, Y. W.; LEE, S. K. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, n. 1, p. 29-34, 2004.
- LUO, Q.; YANG, J.; ZENG, Q. L.; ZHU, X. M.; QIAN, Y. L.; HUANG, H. F. 50-Hertz electromagnetic fields induce gammaH2AX foci formation in mouse preimplantation embryos in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 5, p. 673-680, 2006.
- McCANN, J.; DIETRICH, F.; RAFFERTY, C. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. **Mutation Research**, v. 411, n. 1, p. 45-86, 1998.
- MIES FILHO, A.; JOBIM, M. I. M.; ENDLER, J. O.; WARD, V. B.; DUARTE, M. M. B.; SOUZA, J. A. C.; MARTINS, S. C. R. Estudo sobre inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 10, n. 4, p. 235-245, 1986.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- NIKOLOVA, T.; CZYZ, J.; ROLLETSCHEK, A.; BLYSZCZUK, P.; FUCHS, J.; JOVTCHEV, G.; SCHUDERER, J.; KUSTER, N.; WOBUS, A. M. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 1686-1688, 2005.
- RAJKOVIC, V.; MATAVULJ, M.; JOHANSSON, O. Light and electron microscopic study of the thyroid gland in rats exposed to power-frequency electromagnetic fields. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 17, p. 3322-3328, 2006.
- RAMADAN, L. A.; ABD-ALLAH, A. R. A.; ALY, H. A. A.; SAAD-EL-DIN, A. A. Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-Carnitine in mice. **Pharmacological Research**, v. 46, n. 4, p. 363-370, 2002.
- ROBERT, R. Bobina de Helmholtz. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 25, n. 1, p. 40-44, 2003.
- RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. (Ed.). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. p. 1-40.
- SHAW, G. M.; CROEN, L. A. Human adverse reproductive outcomes and electromagnetic field exposures: review of epidemiologic studies. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v. 101, n. 4, p. 107-119, 1993.
- TABLADO, L.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; NÚÑEZ, J.; NÚÑEZ, M.; SOLER, C. Effects of exposure to static magnetic field on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. **Bioelectromagnetics**, v. 19, n. 6, p. 377-383, 1998.
- WOLF, F. I.; TORSSELLO, A.; TEDESCO, B.; FASANELLA, S.; BONINSEGNA, A.; D'ASCENZO, M.; GRASSI, C.; AZZENA, G. B.; CITTADINI, A. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of redox mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1743, n. 1-2, p. 120-129, 2005.

Received on October 9, 2008.

Accepted on March 31, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.