

*Bruno Mendes Tenório*

**Efeitos dos Campos Eletromagnéticos de  
Baixa Frequência na Espermatogênese de Ratos  
em Diferentes Fases de Maturação**

Recife, 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



# **Efeitos dos Campos Eletromagnéticos de Baixa Frequência na Espermatogênese de Ratos em Diferentes Fases de Maturação**

*Bruno Mendes Tenório*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal na área de Morfofisiologia.

Recife, 2009

“ Será que somos apenas mutações aleatórias, portadores de um DNA que vive uma eterna jornada em busca de evolução, vagando num universo sem sentido? ”

(Modificado de Arntz et al., 2005)

“ O senhor é meu pastor e nada me faltará. ”

(Salmo 23)

“ Na lógica formal, uma contradição é sinal de fracasso, entretanto, na evolução do verdadeiro conhecimento, a contradição assinala o primeiro passo no progresso em direção à vitória. ”

(Whitehead, 2005)

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive em minha vida, por me guiar durante a realização do mestrado em Biociência Animal, bem como por iluminar meus caminhos durante toda a minha vida.

Dedico este trabalho aos meus pais Alcides e Lourdes e meus irmãos Alcides Jr. e Davi por terem me proporcionado uma maravilhosa educação, sempre com muito amor e afeto, me ajudando em tudo que sempre precisei em minha vida. Pelo maravilhoso exemplo que me deram durante o passar de toda minha vida, sempre com muita ética e honestidade.

Obrigado Família.

Aos meus amigos que me acompanharam durante todos estes anos, por toda contribuição que proporcionaram à minha vida.

À Msc. Fernanda Ângelo por todo amor e carinho que tem compartilhado comigo. A sua família, Cida, Nilsson, Marcela, Gilberto, Paula e Maria Eduarda, por todo apoio e carinho com que me acolheram em sua casa, me fazendo sentir membro da família.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, que além de um excelente orientador é em excelente amigo. Obrigado pela oportunidade de realizar o mestrado e por todos os conselhos e conhecimentos repassados, sempre com muita competência e carinho, pronto para ajudar seus orientados.

Ao Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira, obrigado por toda a sabedoria com que me ajudou a ingressar na vida acadêmica. Continue sempre sendo esse exímio exemplo de pesquisador e professor dedicado e compreensivo.

Ao Prof. Dr. George Chaves Jimenez, obrigado por toda ajuda na realização do protocolo experimental e por sua brilhante contribuição com este trabalho.

À Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra, obrigado pela ajuda nas análises desta pesquisa, que contribuíram bastante para abrilhantar este trabalho.

À Msc. Sandra Maria de Torres por toda ajuda durante todos estes anos de pesquisa, obrigado.

Também gostaria de agradecer a todos os funcionários e professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE por toda a ajuda e conhecimento que me proporcionaram.

... Obrigado a todos por estes anos de uma convivência harmoniosa e extremamente produtiva, não somente no campo da ciência e troca de conhecimento, mas também pela aprendizagem de inúmeras experiências de vida de valor inestimável ....

## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>12</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>15</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Fundamentos da espermatogênese .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Fundamentos do etromagnetismo.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3. Efeitos dos CEM nos sistemas biológicos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4. Efeitos dos CEM no sistema reprodutor masculino .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Objetivos gerais .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Exposição aos CEM .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Análises histomorfométricas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Histometria computacional .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Análise da testosterona plasmática .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5. Análise da integridade de DNA dos espermatozóides .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6. Análise Análise da morfologia espermática .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7. Análise estatística .....</b>	<b>41</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>43</b>

4.1. Desenvolvimento ponderal .....	44
4.2. Histomorfometria e histopatologia .....	48
4.3. Histometria computacional .....	55
4.4. Dosagem da testosterona plasmática .....	56
4.5. Integridade de DNA e morfologia espermática .....	56
5. Discussão .....	60
5.1. Desenvolvimento ponderal .....	61
5.2. Histomorfometria e histopatologia .....	64
5.3. Histometria computacional .....	55
5.4. Dosagem da testosterona plasmática .....	78
5.5. Integridade de DNA e morfologia espermática .....	79
6. Considerações finais .....	84
7. Conclusões .....	87
8. Tabelas .....	90
9. Referências .....	106

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Indicativo de acasalamento das fêmeas .....	30
<b>Figura 2.</b> Equipamentos para irradiação dos CEM de 60 Hz e 1mT .....	32
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografia óptica de testículo, demonstrando o estágio VII do ciclo do epitélio seminífero .....	35
<b>Figura 4.</b> Punção do sangue para dosagem hormonal .....	38
<b>Figura 5.</b> Desenvolvimento ponderal dos animais aos 21 dias pós-natal .....	44
<b>Figura 6.</b> Desenvolvimento ponderal dos animais aos 90 dias pós-natal .....	45
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografias dos testículos de ratos aos 21 dias pós-natal .....	48
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografias dos testículos de ratos aos 90 dias pós-natal .....	51
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografias dos testículos de ratos aos 90 dias pós-natal .....	53
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia em microscópio de contraste de fase, demonstrando a presença de gota citoplasmática distal nos espermatozóides .....	56

**Figura 11.** Porcentagem de espermatozoides normais e anormais aos  
90 dias pós-natal ..... 57

**Figura 12.** Correlação entre a quantidade de patologias espermáticas  
e o tempo de exposição ao CEM ..... 57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Desenvolvimento ponderal dos animais aos 21 dias pós-natal .....	90
<b>Tabela 2.</b> Peso em gramas dos testículos, epidídimos, adrenais, rins, fígado, baço e timo de ratos aos 21 dias pós-natal .....	91
<b>Tabela 3.</b> Índices relativo dos pesos dos órgãos em função do peso corporal em ratos aos 21 dias pós-natal .....	92
<b>Tabela 4.</b> Desenvolvimento ponderal de ratos aos 90 dias pós-natal .....	93
<b>Tabela 5.</b> Peso em gramas dos órgãos coletados nos ratos aos 90 dias pós-natal .....	94
<b>Tabela 6.</b> Índices do peso relativo dos órgãos em função do peso corporal em ratos aos 90 dias pós-natal .....	95
<b>Tabela 7.</b> Peso testicular bruto, Peso testicular líquido (em gramas) e parâmetros histomorfométricos testiculares de ratos aos 21 dias pós-natal .....	96
<b>Tabela 8.</b> Volume ( $\mu\text{L}$ ) dos componentes testiculares de ratos aos 21 dias pós-natal .....	97

<b>Tabela 9.</b> Volume ( $\mu\text{L}$ ) dos componentes do testículo e parâmetros morfométricos testiculares dos animais controle e controle negativo .....	98
<b>Tabela 10.</b> Peso líquido e parâmetros histomorfométricos testiculares de ratos aos 90 dias pós-natal .....	99
<b>Tabela 11.</b> Volume ( $\mu\text{L}$ ) dos componentes testiculares de ratos aos 90 dias pós-natal .....	100
<b>Tabela 12.</b> Área e perímetro dos túbulos seminíferos em testículos de ratos aos 90 dias pós-natal .....	100
<b>Tabela 13.</b> Dosagem da testosterona plasmática em ratos aos 21 dias pós-natal .....	101
<b>Tabela 14.</b> Dosagem da testosterona plasmática em ratos aos 90 dias pós-natal .....	101
<b>Tabela 15.</b> Análise estatística da morfologia aos 90 dias pós-natal .....	102
<b>Tabela 16.</b> Morfologia espermática de ratos aos 90 dias pós-natal .....	103

<b>Tabela 17.</b> Análise estatística da integridade do DNA de espermatozóides de ratos aos 90 dias pós-natal .....	104
--	-----

## 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 CEM de baixa frequência (50 e 60 Hz). Pesquisas vêm demonstrando que a exposição a estes CEM podem proporcionar alterações fisiológicas. Apesar disto, ainda não estão totalmente esclarecidos a extensão destes efeitos, nem os mecanismos de ação que envolve a interação com os CEM. O presente trabalho teve como principal objetivo verificar os efeitos dos CEM de baixa frequência na espermatogênese de ratos machos em diferentes fases de maturação. Os animais foram obtidos a partir de ratas gestantes, expostas desde o 13º dia de gestação ao CEM de 60 Hz de frequência e 1 mT de densidade de fluxo magnético em 3 aplicações diárias de 30 minutos. Da prole obtida, ratos machos foram submetidos a diferentes períodos de exposição ao CEM (21 e 90 dias). Ao final do período experimental, se observou que os animais expostos ao CEM apresentaram um desenvolvimento ponderal reduzido. Verificaram-se alterações histomorfométricas nos testículos dos animais expostos por 21 dias. A histometria quantitativa não revelou alteração estatisticamente significativa na produção espermática, porém, as avaliações histopatológicas demonstraram que a exposição ao CEM pode desencadear degeneração testicular sendo a apoptose o principal tipo de morte celular observado como consequência dos efeitos deletérios dos CEM sobre a espermatogênese. Os CEM causam alterações nas células somáticas e germinativas dos túbulos seminíferos com prováveis efeitos irreversíveis, uma vez que, animais expostos no período crítico do desenvolvimento testicular (13º dia de gestação ao 21º dia pós-natal) apresentaram lesões compatíveis com a degeneração testicular na idade adulta. A dosagem de testosterona plasmática e a integridade de DNA dos espermatozoides não sofreram alterações, entretanto, na avaliação da morfologia espermática observou-se o aumento na quantidade de patologias espermáticas, principalmente gota citoplasmática espermática distal. O presente trabalho recomenda a realização de pesquisas adicionais e o desenvolvimento de políticas preventivas em virtude dos resultados sobre os efeitos adversos de campos elétricos e magnéticos disponíveis até o momento se mostrarem contraditórios.

**Palavras-Chaves:** Campos eletromagnéticos, radiação não-ionizante, espermatogênese, espermatozóide, histomorfometria testicular, testosterona.

### ABSTRACT

The society's exposition 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 to electromagnetic fields (50 and 60 Hz). Issues have been demonstrating that EMF exposition could provoke significantly physiological change most of the time, predisposing the organism to unfavorable conditions in homeostasis. However, the extension of EMF effects weren't totally clarified neither were their mechanism's actions when there is interaction with living being. The major objective of this issue was to evaluate the EMF (60 Hz and 1 mT) effects on spermatogenesis process in Wistar rats exposed during different stages of testicle development. At the end of experimental period was observed that animals exposed to EMF had reduced body weight along to development. Histometrics alterations were verified in the testis of the animals exposed by 21 days. The quantitative histometry did not show significant statistic alteration in the sperm production, however, histopathological evaluations showed that EMF's expositions can triggered testicular degeneration being apoptosis the main kind of cell death observed with consequence EMF's deleterious effects on spermatogenesis. The EMF cause germ cell and somatic cell alterations with probable irreversible effects, since, animals exposed during critical period of testicular development (13<sup>th</sup> of pregnant to 21<sup>th</sup> pos-natal day) showed lesions in adult age compatible with testicular degeneration. The plasma levels of testosterone and sperm DNA integrity do not changed, but in the sperm morphology evaluation was observed increase of sperm pathology, mainly distal sperm cytoplasmatic drop. The present work recommends that more issues and adoption of preventive politics should be realized due to results about side effects of electric and magnetic fields had been showing at the moment controversy.

**Key-Words:** Electromagnetic field, non-ionizing radiation, spermatogenesis, spermatozoa, testicular histomorphometry, testosterone.

## **1. INTRODUÇÃO**

A exposição da população a Campos Eletromagnéticos (CEM) de baixa frequência (50 e 60 Hz) vem crescendo gradativamente. Diariamente grande segmento da sociedade entra em contato com linhas de distribuição de energia elétrica, aparelhos eletroeletrônicos e equipamentos de indústrias. Os CEM de baixa frequência estão associados com a produção, distribuição e utilização de energia elétrica (BOORMAN et al., 1999; CHUNG et al., 2005).

Nas últimas décadas, diversos segmentos da sociedade vêm sendo expostos a vários produtos químicos e agentes físicos exógenos. Pesquisas vêm demonstrando que o sistema reprodutor masculino é vulnerável a estes agentes, e que estes podem gerar distúrbios reprodutivos (KUMAR, 2004). Em humanos, entre 10 e 17 % dos casais apresentam subfertilidade durante algum período de suas vidas (EBISCH et al., 2007) e os homens são responsáveis por 20 % dos casos de esterilidade (WINKER e RÜDIGER, 2006).

Visando uma melhor compreensão acerca dos possíveis mecanismos de interação entre os CEM e o sistema reprodutor masculino, foi estudado nesse trabalho os efeitos do CEM de baixa frequência (60 Hz e 1 mT) na espermatogênese de ratos machos em diferentes fases de maturação. Em virtude da multidisciplinaridade do tema, faz-se necessário uma breve revisão sobre os fundamentos da espermatogênese, do eletromagnetismo, bem como dos efeitos dos CEM sobre os sistemas biológicos e em particular, sobre o sistema reprodutor masculino.

### **1.1. Fundamentos da Espermatogênese**

Os testículos de mamíferos sexualmente maduros são componentes vitais à sua reprodução e por conseqüência à perpetuação destes espécimes. A espermatogênese é um processo extremamente complexo, que depende de mecanismos que compreendem o código genético das células germinativas e uma rede de comunicação entre estas células germinativas e as células somáticas que estão presentes no testículo (VERHOEVEN, et al., 2007). O processo espermatogênico também é regulado por uma complexa e interligada rede de interação endócrina, parácrina e autócrina entre diversos tipos celulares (ROSER, 2008).

Os processos reprodutivos nos animais podem ser descritos através do funcionamento integrado das células que fazem parte do parênquima testicular. Dentre estas, as células germinativas, que através de um processo denominado espermatogênese, se diferenciam até a formação de espermatozóides funcionais. Este processo tem duração entre 30 e 75 dias nos mamíferos, e 58 dias no rato (FRANÇA et al., 1998; FRANÇA, 2005), e pode ser subdividido em três fases: (a) Fase proliferativa ou espermatogonial, caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias; (b) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões que resultam na formação de células haplóides denominadas espermátides; (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides sofrem várias alterações morfofisiológicas, tais como a formação do acrossoma, do flagelo e condensação nuclear, resultando na formação do espermatozóide (SHARPE, 1994; FRANÇA et al., 2005). Estas células se encontram nos túbulos seminíferos em associações distintas chamadas de estádios, que podem ser classificados através dos métodos de morfologia tubular (BERNDTSON, 1977; FRANÇA e RUSSEL, 1998) e pelo método do sistema acrossômico (LEBLOND e CLERMONT, 1952; RUSSEL et al., 1990). No primeiro método, oito estádios são obtidos para todas as espécies, enquanto que no segundo, o número de estádios é variado para cada espécie, sendo o ciclo do epitélio seminífero uma constante biológica espécie-específica sob controle do genótipo de cada célula germinativa (FRANÇA et al., 1998; FRANÇA et al., 2005).

Além das células germinativas, as principais células envolvidas no processo da espermatogênese são as de Sertoli e as de Leydig. As células de Sertoli estão localizadas nos túbulos seminíferos, onde formam uma barreira através de desmossomos, junções do tipo “gap” e junções à base de actina, denominadas junções de oclusão (LUI e CHENG, 2007). Esta barreira, denominada hemato-testicular, divide o epitélio seminífero em dois compartimentos, um com localização basal, onde se encontram as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica e um outro denominado compartimento adluminal, onde encontram-se os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. A barreira hemato-testicular promove um microambiente isolado e imunoprivilegiado essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (SHARPE, 1994; FRANÇA et al., 2005).

As células de Sertoli também desempenham funções de essencial importância para o desenvolvimento das células germinativas, como o fornecimento de nutrientes, mediação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese, bem como fornece suporte físico (sustentação) para estas células. As células de Sertoli têm participação ativa no processo de espermiacção (liberação) das espermátides para o lúmen tubular, fagocitose dos corpos residuais (excesso de citoplasma das células germinativas) e das células germinativas que sofrem apoptose. Estas células secretam fluidos no lúmen tubular, que possuem função de veículo para o transporte dos espermatozóides, maturação espermática e que também possui o importante papel de auxiliar na função epididimária. A secreção de fluidos também ocorre em direção ao compartimento intertubular, envolvendo mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares, como as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, células peritubulares mióides e as células de Leydig (SHARPE, 1994; FRANÇA e RUSSEL, 1998). Além destas células, também estão presentes no testículo outras células somáticas, tais como as células endoteliais e os fibroblastos (FRANÇA et al., 2005).

As células de Leydig são outro tipo celular de fundamental importância para a reprodução dos mamíferos, localizam-se no compartimento inter-tubular ou interstício, e possui como principal função a produção de andrógenos a partir de uma molécula de colesterol (VERHOEVEN, et al., 2007). Esta produção é mediada por estímulos de LH (hormônio luteinizante), o qual é controlado através de um processo de retroalimentação ou “feedback” negativo realizado pela testosterona na adenohipófise e no hipotálamo (ROSER, 2008). Nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos e nas próprias células de Leydig existem receptores para andrógenos. Dentre os principais andrógenos produzidos pelo organismo estão a testosterona e a diidrotestosterona, que são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal, aparecimento dos caracteres sexuais secundários, manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade e manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e epidídimo (LUKE e COFFEY; SHARPE, 1994; ROSER, 2008).

## **1.2. Fundamentos do Eletromagnetismo**

Uma carga elétrica gera campo elétrico quer esteja em repouso ou em movimento, porém, campos eletromagnéticos são gerados apenas por cargas elétricas em movimento, promovendo corrente elétrica (INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION, 1998; BOORMAN et al., 1999). Apesar da corrente contínua gerar campo magnético em seu entorno, somente correntes alternadas geram ondas eletromagnéticas. Uma onda eletromagnética distante da fonte geradora de CEM pode ser descrita, aproximadamente, através do modelo de onda plana, onde as frentes de onda possuem uma geometria plana. Os vetores campo elétrico, campo magnético e a direção de propagação são perpendiculares entre si e as fases do campo elétrico (CE) e campo magnético (CM) são as mesmas (FREY, 1995; HALLIDAY, 1996).

As radiações eletromagnéticas podem ser classificadas por seu efeito ao interagir com a matéria em ionizantes e não-ionizantes. São ditas ionizantes quando há como produto desta interação a remoção de elétrons dos átomos atingidos e por conseqüente a formação de íons, fazem parte desta classificação os raios gama, raios-X e parte do espectro ultravioleta. As radiações são denominadas não-ionizantes quando sua energia não é suficiente para quebrar ligações atômicas, estas radiações não produzem ionização dos átomos atingidos e fazem parte deste tipo de radiação o restante do espectro eletromagnético (LIN, 1994; LEE et al., 2004; GENUIS, 2008).

O espectro eletromagnético demonstra que as frequências de onda variam desde as ELF (Frequência Extremamente Baixa), que possuem comprimento de onda com aproximadamente  $3 \times 10^7$  m, até os raios gama, cujo comprimento de onda é de aproximadamente  $3 \times 10^{-13}$  m, porém, as frequências mais utilizadas rotineiramente variam das ELF, entre 3 Hz e 3 KHz, até as microondas, com aproximadamente 300 MHz de frequência (FREY, 1995; SCHÜZ e AHLBOM, 2008).

## **1.3. Efeitos dos Campos Eletromagnéticos nos Sistemas Biológicos**

A possibilidade de que os CEM possam interagir com os sistemas biológicos despertou o interesse da comunidade científica, acarretando em diversificados estudos

sobre os efeitos dos CEM em variados sistemas biológicos (KLIUKIENE et al., 2004; KHEIFETS et al., 2005; RAJKOVIC et al., 2006; GARCÍA et al., 2008).

Apesar do crescente interesse da classe científica acerca da possibilidade dos CEM interagirem com os sistemas biológicos causando efeitos adversos, a extensão e os mecanismos de ação desta interação ainda não estão devidamente esclarecidos (TONINI et al., 2001). Este interesse desencadeou diversos trabalhos publicados, contendo estudos epidemiológicos acerca dos riscos em relação à exposição a campos eletromagnéticos de baixa frequência, 50 e 60 Hz (BLAASAAS et al., 2002; KLIUKIENE et al., 2004; DRAPER et al., 2005).

Cada vez mais, estudos estão sendo conduzidos a fim de estabelecer correlações entre CEM de baixa frequência oscilantes no tempo e o aparecimento de diversas formas de câncer (ERREN, 1997; HAKANSSON, 2002). Outras alterações além do câncer também vêm sendo citadas, tais como efeitos genotóxicos (alterações cromossômicas) e doenças neurodegenerativas (AHLBOM, 2001; ESTÉCIO e SILVA, 2002; IVANCSITS et al., 2005). Wolf et al. (2005) observou em seu trabalho que CEM de 50 Hz e 0,5, 0,75 e 1 mT podem influenciar a proliferação celular e causar danos no DNA de células normais ou tumorais através da ação de espécies de radicais livres.

Segundo Schüz e Ahlbom (2008), a The International Agency for Research on Cancer (IARC) classificou os campos magnéticos entre 0 e 300 Hz (Frequências Extremamente Baixas) como possível agente carcinogênico para humanos.

Possíveis alterações no tamanho, forma, carga, estados químicos e estados energéticos de moléculas biológicas já foram constatados. As interações com CEM são verificadas a níveis molecular e celular, também foram observadas alterações na síntese de biomoléculas, na proliferação celular, modificações no fluxo de cálcio e influências sobre as propriedades da superfície celular. A membrana celular é sempre apontada como sendo o principal sítio de interação da célula com o CEM, tendo conseqüências no metabolismo celular e em outras respostas intracelulares (CLEARY; FREY, 1995; FREDOWITZ et al., 2002).

Luben (1995) sugere que os efeitos promovidos pelos CEM em cadeias sinalizadoras, podem ocorrer em nível de ligação ao receptor, de alterações

conformacionais, na fluidez da membrana plasmática, na cinética das proteínas, na ativação da adenilato ciclase e na fosforilação de receptores.

Trabalhos vêm demonstrando alterações inibitórias no funcionamento da glândula pineal e na secreção de melatonina em diversas condições de exposição a campos elétricos e magnéticos (YELLON, 1994; WILSON et al, 1999; LEVALLOIS et al., 2001).

Trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos visando analisar os diversos efeitos causados por CEM na proliferação e morfologia celular. Fredowitz et al. (2002), relata que células da glândula mamária expostas a CEM com 50 Hz de frequência e densidade de fluxo de  $100\mu\text{T}$ , em ratas da linhagem Sprague Dawley, durante 2 semanas, 24 horas por dia, resulta num aumento significativo na proliferação destas células. Estudos realizados na proliferação de algumas espécies de bactérias demonstraram um aumento nas taxas de proliferação da biomassa de *Saccharomyces sp.* em cerca de 5% a 25%, quando expostas a campos de 50 Hz e 12 mT, durante 2 horas das 10 horas do cultivo bacteriano (MEHEDINTUM & BERG, 1997). *Pseudomonas stutzeri* quando expostas a campos de 50 Hz e 1mT durante 10 horas, apresentaram um aumento na taxa de proliferação em aproximadamente 10% a 30% (HÖNES et al., 1998) e quando as *Corynebacterium glutamicum* foram expostas a CEM de 50 Hz e 4,9 mT durante 6 horas, as taxas de proliferação destas bactérias apresentaram um aumento em cerca de 20% a 30% (LEI & BERG, 1998). O sistema imunológico também parece sofrer efeitos adversos quando em interação com o CEM, pois a exposição de linfócitos a CEM de 100 Hz de frequência e 1,3 mT de densidade de fluxo, durante 72 horas, aumentou significativamente a sua taxa de proliferação e em sua morfologia ocorreu um aumento na frequência de aparecimento de micronúcleos (SCARFI et al., 1997).

#### **1.4. Efeitos dos Campos Eletromagnéticos no Sistema Reprodutor Masculino**

Os componentes do testículo são altamente sensíveis a radiação ionizante, doses de 0,15 Gy podem reduzir temporariamente a quantidade de espermatozóides e a exposição a 2 Gy pode resultar em azoospermia (ausência de produção de espermatozóides) prolongada ou permanente (JENSEN et al., 2006). Também vêm sendo relatados efeitos causados por radiações de baixa frequência que não envolvem os mecanismos de

ionização (radiação ionizante) ou de indução no aumento da temperatura (microondas), estes são denominados efeitos diretos da radiação não-ionizante.

Diversos estudos foram realizados abordando o risco de efeitos adversos na reprodução associados à exposição de campos elétricos e magnéticos (SHAW e CROEN, 1993; HUUSKONEN et al., 1998). Estudos epidemiológicos correlacionando os campos elétricos e magnéticos com possíveis efeitos adversos na reprodução também vêm sendo relatados. Blaasaas et al. (2002) em estudo populacional, observou uma associação entre campos de 50 Hz e deficiências congênitas do sistema nervoso central. Com base nas observações epidemiológicas, diversos estudos *in-vitro* vêm sendo conduzidos para tentar elucidar a extensão destes efeitos, bem como os possíveis mecanismos de ação dos CEM no sistema reprodutivo de machos e fêmeas. Segundo Cecconi et al. (2000), CEM de 50 Hz podem prejudicar a reprodução em fêmeas, devido a redução na capacidade de desenvolvimento dos folículos ovarianos. Campos magnéticos de 400 mT também podem induzir diversas deformações em fetos de camundongos (SAITO et al., 2006). Foram observadas alterações nos receptores de estradiol e progesterona no útero durante a gestação em ratas expostas a campos magnéticos de 13 ou 130  $\mu$ T, os autores indicam que pode haver algumas alterações no transporte e desenvolvimento dos embriões, bem como em parâmetros endócrinos associados (HUUSKONEN et al., 2001).

Também vem sendo descrito na literatura estudos que não observaram efeitos adversos na reprodução de fêmeas. Neigish et al. (2002) não observou efeitos da exposição de ratos a campos magnéticos de 50 Hz e 7, 70 ou 350  $\mu$ T por 22 horas / dia durante o período de 0 a 7 dias (pré-implantação) ou 8 a 15 dias (organogênese) da gestação. Também não foram observadas alterações nas fêmeas gestantes ou nos fetos depois da exposição contínua de ratas do 6º ao 20º dia de gestação a campos magnéticos de 5, 83,3 ou 500  $\mu$ T (CHUNG et al., 2003).

Na maioria dos casos, os estudos realizados envolvendo campos elétricos e magnéticos abordam aspectos reprodutivos voltados às fêmeas e a gestação, sendo menor a proporção de estudos voltados para o sistema reprodutor masculino (TABLADO et al., 1998). Entretanto, diversas pesquisas vêm observando possíveis efeitos adversos no sistema reprodutivo masculino em decorrência da exposição a campos elétricos e magnéticos. Segundo Lee et al. (2004) a exposição a CEM de baixa frequência (60 Hz e

0,5 mT) 24 horas por dia em camundongos adultos durante oito semanas não alterou o peso corporal nem o dos testículos, porém, aumentou a incidência de morte das células germinativas induzidas por apoptose, reduziu o escore da biópsia testicular, bem como a análise quantitativa dos túbulos seminíferos demonstraram uma diminuição significativa na espermatogênese. 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 significativa na contagem, motilidade e produção diária de espermatozóides, além de alterações na largura dos túbulos seminíferos, também foi constatada a ausência de espermatogônias e espermatogênese em algumas regiões do testículo. Ramadan et al. (2002) também observaram a redução na atividade da enzima LDH-X, no testículo esta enzima apenas pode ser detectada nas células germinativas mais diferenciadas e pode ser utilizada como marcador da maturação de células germinativas.

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 que sobreviveram após o parto. De Vita et al. (1995) também observaram possíveis efeitos citotóxicos ou citoestáticos dos campos magnéticos de 50 Hz sobre espermatogônias diferenciadas, além de uma redução estatisticamente significativa na quantidade de espermátides alongadas nos túbulos seminíferos. Aydin et al. (2007) estudou os efeitos de CEM de 50 Hz e 48,21 mG gerados por linhas de alta tensão de 170 kV irradiados continuamente em ratos durante 1, 2 e 3 meses. Estes autores observaram redução na atividade da catalase testicular e corporal. A biópsia testicular revelou menores escores nos animais expostos aos CEM, o exame histopatológico do testículo demonstrou que houve uma desaceleração da espermatogênese e degeneração de células germinativas com relação direta com o tempo de exposição ao CEM.

Entretanto, diversos trabalhos também vêm constatando que os campos elétricos e magnéticos não alteram parâmetros reprodutivos em machos. Chung et al. (2005) não encontrou efeitos deletérios na espermatogênese e fertilidade de ratos adultos expostos a CEM de 60 Hz e intensidades de 5, 83.3 e 500 mT durante o período de 21 horas por dia do 6º dia de gestação até os 21 dias de idade. A exposição de camundongos por 1 hora ou

continuamente a campos magnéticos de 0,5 e 0,7 T provenientes de um ímã não demonstraram alterações no peso corporal, testicular e epididimário, bem como na avaliação histopatológica dos testículos e epidídimos nos dias 1, 5, 15 e 35 pós-natal (TABLADO et al., 2000). RYAN et al. (1999) realizou um estudo de Multigerações avaliando a toxicidade reprodutiva de campos magnéticos de 60 Hz e 0,02 G, 2 G e 10 G irradiados continuamente e 10 G intermitentemente (1 hora ligado e 1 hora desligado), estes autores não observaram alterações nas gerações F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> em relação a capacidade reprodutiva, desenvolvimento dos fetos e dos animais neonatos. A exposição de camundongos a campos magnéticos de 60 Hz e 2 mT durante 72 horas ou 10 dias (8 horas por dia) não induziu aberrações cromossômicas e não alterou a morfologia espermática (HEREDIA-ROJAS et al., 2004). Portanto, as referências existentes abordando os possíveis efeitos de campos elétricos e magnéticos na espermatogênese ainda são contraditórias.

A literatura existente descreve que os efeitos contraditórios são observados não apenas no sistema reprodutor masculino, mas também em outros sistemas. Pode-se citar como exemplo o efeito de campos elétricos e magnéticos na angiogênese, Tepper et al. (2004) observou que CEM de 15 Hz e densidade de fluxo magnético de 12 G pode aumentar a angiogênese em camundongos e em cultura celular através da estimulação da liberação de FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto-2). Entretanto, Ruggiero et al. (2004) observou uma redução significativa da resposta angiogênica na membrana cório-alantóide de ovos de galinha expostos a campos magnéticos de 0,2 T durante 3 horas.

Uma grande dificuldade encontrada para um maior esclarecimento dos efeitos causados por CEM nos sistemas biológicos é o efeito “janela”, que consiste em diferentes respostas do organismo em função da variação na frequência e intensidade dos campos elétricos e magnéticos utilizados, agravada pela variação do tempo de exposição, que muitas vezes causam efeitos até contraditórios. Al-Akhras et al. (2001), De Vita et al. (1995) e Chung et al. (2005) enfatizam em seus trabalhos a necessidade de mais pesquisas e informações acerca da exposição do sistema reprodutor por longos períodos de tempo a campos elétricos e magnéticos, e suas possíveis conseqüências na fertilidade.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo Geral

Tendo em vista a necessidade de novos estudos para se averiguar a possibilidade de interação dos CEM com o sistema reprodutor masculino, objetivou-se com o presente trabalho verificar os possíveis efeitos de CEM de baixa frequência na espermatogênese de *Rattus norvegicus* durante diferentes fases do seu desenvolvimento.

## 2.2. Objetivos Específicos

Investigar os efeitos de campos eletromagnéticos variáveis, com 60 Hz de frequência e 1 mT de densidade de fluxo magnético, na espermatogênese de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) provenientes de ratas expostas ao CEM a partir do 13º dia de gestação, em 3 exposições diárias de 30 minutos. Estes animais foram subdivididos em diferentes grupos e submetidos a diferentes períodos de exposição ao CEM (21 e 90 dias pós-nascimento), enfocando os seguintes parâmetros:

- a. Desempenho ponderal dos ratos machos até os 21 ou 90 dias de idade;
- b. Pesos de testículos, epidídimos, adrenais, rins, fígado, baço, timo e vesícula seminal aos 21 e 90 dias de idade e seus respectivos pesos relativos em função do peso corporal;
- c. Proporções volumétricas entre componentes do parênquima testicular, altura de epitélio seminífero e diâmetro tubular;
- d. Morfologia das células da linhagem espermatogênica, células de Sertoli e células de Leydig através de microscopia óptica e as relações quantitativas entre as mesmas;
- e. População celular dos túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (CES);
- f. Número de células de Sertoli por grama de parênquima testicular e por testículo;
- g. Produção espermática diária estimada através da histologia quantitativa dos testículos;
- h. Avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona (T) aos 21 e 90 dias de idade;
- i. Análise da integridade de DNA dos espermatozoides;
- j. Análise da morfologia espermática através de microscopia óptica;
- k. Análise área e perímetro dos túbulos seminíferos através de histometria computacional.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), de ambos os sexos, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h, obtidos no biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A partir do indicativo de acasalamento (Figura 1) e da previsão de partos, as fêmeas gestantes começaram a ser expostas ao CEM a partir do 13º dia de gestação. Os ratos neonatos machos foram separados para composição dos seguintes grupos experimentais: I. Grupo de ratos exposto ao CEM durante os períodos gestacionais e pré-púbere, analisados aos 21 dias; II. Grupo de ratos analisados aos 21 dias (controle 1); III. Grupo de ratos expostos ao CEM durante os períodos gestacional e pré-púbere (21 dias), porém analisados aos 90 dias pós-natal; IV. Grupo de ratos expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias pós-natal; V. Grupo de ratos analisados aos 90 dias (controle 2); VI. Grupo de ratos adultos analisados aos 90 dias sem sofrer nenhuma manipulação (controle negativo).

Os animais controle foram mantidos nas mesmas condições experimentais, com a exceção da presença do CEM. Os animais controle negativo não sofreram manipulação, excluindo desta forma a interferência do estresse nos resultados obtidos.



**Figura 1.** Fotomicrografia óptica demonstrando a presença de espermatozoides (seta) e cabeças destacadas de espermatozoides (cabeça de seta), obtidos através de esfregaço do conteúdo vaginal, confirmando o acasalamento das fêmeas.

Os animais permaneceram com as mães em caixas individuais até 21 dias após o nascimento. Após o desmame, cada grupo foi dividido em lotes de seis animais por caixa e começaram a receber água e ração peletizada, com níveis nutricionais adequados *ad libitum* até o final do experimento. A pesagem dos animais foi realizada diariamente durante os primeiros 21 dias pós-natal, sendo posteriormente pesados semanalmente até o final do período experimental. Os índices relativos de peso dos órgãos foram obtidos através da fórmula:

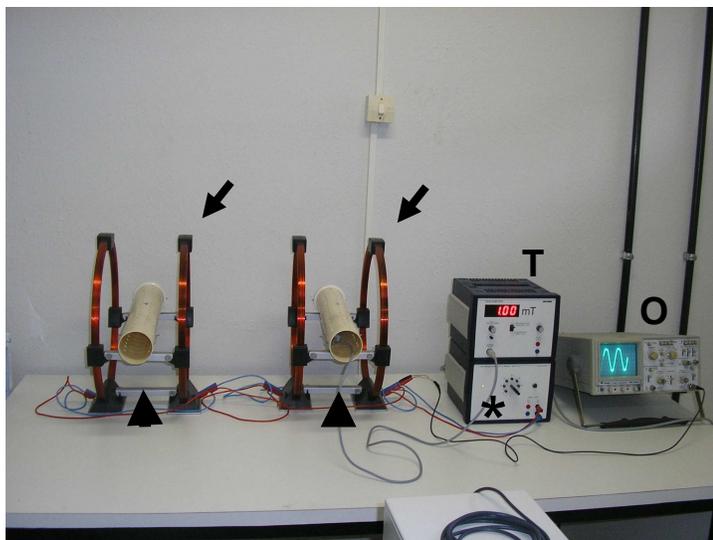
$$IR = \left( \frac{Po}{Pc} \right) \times 100$$

Onde IR = Índice relativo de peso do órgão; Po = Peso do órgão; Pc = Peso corporal total.

### 3.1. Exposição aos Campos Eletromagnéticos

Os grupos experimentais foram expostos a CEM do tipo senoidal com frequência de 60 Hz e intensidade de fluxo magnético de 1 mT. Os campos elétricos de 50 a 60 Hz geralmente possuem intensidade de  $10^{-4}$  V/m (SLINEY e PATTERSON, 2007). 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) (Figura 2). Os animais foram posicionados em um compartimento cilíndrico de Policloreto 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 (Figura 2). A exposição ao CEM de baixa frequência foi realizada intermitentemente durante os períodos experimentais em três aplicações diárias de 30 minutos.



**Figura 2.** Os CEM de 60 Hz e 1mT foram irradiados por uma série de bobinas de Helmholtz (PHYWE / GERMANY) (seta), 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 Policloreto de Vinila (PVC) (cabeça de seta), localizado espacialmente na região central da bobina. Para monitorar as áreas de exposição ao CEM foi utilizado um Teslômetro (PHYWE-GERMANY) (T) para aferir a densidade de fluxo magnético e um osciloscópio (MIMIPA MO-125 OS de 50 MHz - TRIEFIELD BROADBAND METER-EUA) (O) para monitorar a frequência das ondas emitidas pelas bobinas.

Os campos elétricos são facilmente bloqueados por árvores, paredes e outros objetos, enquanto os campos magnéticos costumam penetrar em materiais não metálicos, estes geralmente reduzem sua intensidade apenas com a distância (BOORMAN et al., 1999). A International Radiation Protection Association (IRPA) recomenda a exposição máxima a 0,5 mT por 24 horas ao dia ou de 5 mT de densidade de fluxo magnético para exposições por 2 horas ou menos (SLINEY e PATTERSON, 2007). Diversos países adotaram um limite de exposição à radiação de 15 mSv por ano (JENSEN et al., 2006). Entretanto, não foram encontrados limites de exposição intermitentes para estes campos, pois a aplicação em doses fracionadas parece ter resultado mais pronunciado que a exposição constante ao CEM (RAMADAN et al., 2002).

### 3.2. Análises Histomorfométricas

A histopatologia e histometria testicular foram realizadas aos 21 e 90 dias de idade, momento no qual os ratos de cada grupo foram anestesiados (Tiopental Sódico 30 mg/Kg), heparinizados (Heparina Sódica 125 UI/100g) e submetidos à perfusão intracardiaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (50 UI/litro), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Após a lavagem do sistema vascular, os animais foram perfundidos com glutaraldeído a 4% em solução tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,3 durante 10 minutos, pois o glutaraldeído realiza uma fixação superior do material em relação aos outros fixadores para resina à base de metacrilato (RUSSEL et al., 1990). Os testículos e epidídimos foram removidos, pesados e refixados na mesma solução utilizada na perfusão por duas horas. De cada animal, um testículo foi utilizado para as análises microscópicas, realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados os testículos, epidídimos, adrenais, rins, fígado, baço, timo e vesícula seminal

Os testículos foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA), permanecendo imersos em tampão fosfato por 2 horas, sendo posteriormente desidratados em série crescente de álcoois e incluídos na resina plástica. Cortes histológicos de 4  $\mu$ m de espessura foram corados em azul de toluidina / borato de sódio a 1% e analisados morfologicamente e morfometricamente.

O diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidas em aumento de 100X, usando retículo micrométrico linear (10 mm / 100 - Olympus) calibrado com um micrômetro padrão. O diâmetro tubular médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos seminíferos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para

tal, realizaram-se duas medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lume e o epitélio germinativo, determinando-se, a altura média do epitélio seminífero.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de graticula micrométrica (Olympus) com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica do testículo em aumento de 400 X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume, enquanto no segundo foram investigados as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sangüíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é de aproximadamente 1,03 a 1,04 (SILVA JR. et al., 2006), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

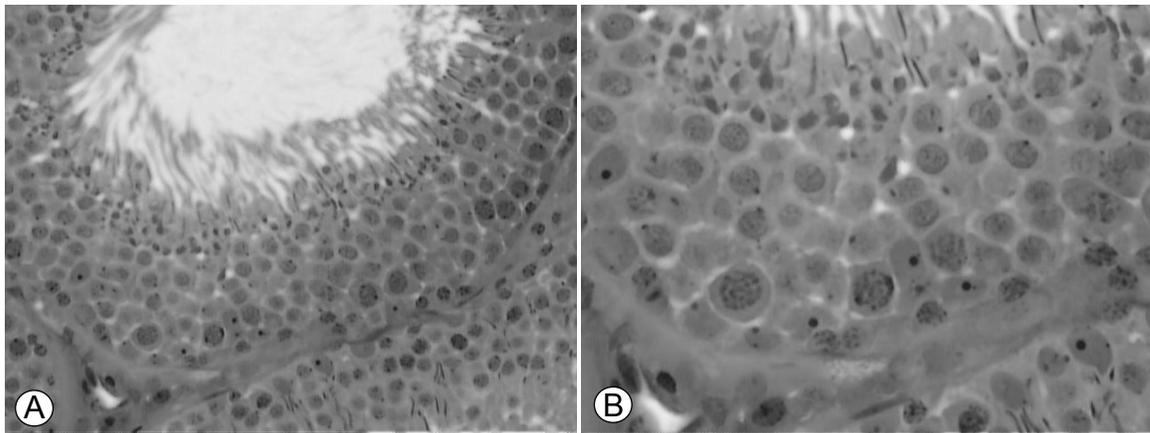
O volume de cada componente do testículo, expresso em  $\mu\text{L}$ , foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (mg). O valor deste último será obtido pela subtração de 6,5 % (referente a albugínea) do peso testicular bruto (RUSSELL e FRANÇA, 1995).

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI, 1974):

$$CT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

Onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio VII do ciclo (figura 3), classificado de acordo com o método acrossômico (RUSSELL et al., 1990), foi realizada a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas 5 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contabilizados: espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno (SPT I PI/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.



**Figura 3.** Fotomicrografia óptica de testículo, demonstrando o estágio VII do ciclo do epitélio seminífero. Observar as células germinativas em associações celulares de espermatócito I em pré-leptóteno, espermatócito I em paquíteno e espermátide arredondada. Figura 3A ampliada em aumento de 200X e 3B em 400X.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (D.M.) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de retículo micrométrico linear (10 mm / 100 - Olympus) adaptado a uma das oculares de 10X e acoplada à objetiva de 100X, propiciando um aumento final de 1000X. No caso das espermatogônias do tipo A que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico, em virtude disto, contabilizou-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou a aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

A população total de células de Sertoli por testículo foi obtida a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de-Reviere e Lincoln (1978):

$$\text{Número CS Testículo} = \frac{\text{Comp. Tot. Tub. Sem.} \times \text{Num. Cor. Nucl. CS Sec. Transv.}}{\text{Espessura do Corte}}$$

Onde, Número CS Testículo = Número de células de Sertoli por testículo; Comp. Tot. Tub. Sem. = Comprimento total de túbulos Seminíferos ( $\mu\text{m}$ ); Num. Cor. Nucl. CS Sec. Transv. = Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal; Espessura do corte ( $\mu\text{m}$ ).

A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Jr. et al. (2006):

$$PED = \frac{N^{\circ} \text{ Total CS Testículo} \times \text{Prop. AR} \times \text{Freq. R el. Est. VII}}{\text{Duração do Estágio VII}}$$

Onde, PED = produção espermática diária; N° Total CS Testículo = Número total de células de Sertoli por testículo; Prop. AR = Proporção de espermátides arredondas no estágio VII; Freq. Rel. Est. VII = frequência relativa do estágio VII; Duração do estágio (dias).

### **3.3. Histometria Computacional**

A área e o perímetro dos túbulos seminíferos foram medidos em aumento de 100X, através do uso de um programa computacional biométrico. A área e o perímetro médio para cada rato foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos seminíferos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. Após a confecção das lâminas de fragmentos do tecido testicular, foi realizada a captura da imagem através de um microscópio óptico NIKON 50i, acoplado a uma câmera filmadora digital SANSUNG SVIII, conectada a um microcomputador. Para medição da área e perímetro dos túbulos seminíferos utilizou-se do sistema computacional para aferição biométrica IMAGELAB 2000®.

### **3.4. Análise da Testosterona Plasmática**

As amostras de sangue foram colhidas por punção na convergência das veias cava cranial e caudal (Figura 4), dessoradas por centrifugação e acondicionadas em recipientes plásticos Eppendorf (dois por amostra). O material sorológico foi conservado em freezer doméstico a -20°C.



**Figura 4.** Punção do sangue para dosagem hormonal. O sangue é colhido na confluência das veias cava cranial e caudal através de seringa descartável. Posteriormente o material colhido é dessorado em centrífuga e congelado à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A dosagem de testosterona foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descritos por Brown et al. (2004).

Para este ensaio inicialmente  $66,7\mu\text{l}$  do anticorpo (Polyclonal anti-testosterona R156/7, Coralie Munro, University of California, Davis, USA.) foi diluído em 5 ml de tampão (coating buffer;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ultra pura, pH ajustado para 9,6) e  $50\mu\text{l}$  desta solução de anticorpo foram adicionados em cada poço da placa (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp). Posteriormente, a placa foi coberta com selador plástico e mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  por no máximo 12 horas.

Uma vez preparada a placa, procedeu-se com a curva padrão, por meio de diluições seriadas de  $250\mu\text{l}$  do padrão de concentração  $600\text{ pg}/50\mu\text{l}$  de testosterona (17-hydroxy-4-androsten-3-one, Steraloids, Sigma A6950) até a concentração de  $2,3\text{ pg}/50\mu\text{l}$ , em  $250\mu\text{l}$  de solução de ensaio de ELISA ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ; BSA - Sigma Aldrich, A7906;  $\text{H}_2\text{O}$  ultra pura, pH ajustado para 7,00). O hormônio conjugado com a enzima HRP (Testosterone-horseradish Peroxidase) também foi diluído ( $33,3\mu\text{l}$  em 5 ml da solução de ensaio de ELISA).

Imediatamente antes de dar início ao ensaio, a placa foi lavada 5 vezes com a solução de lavagem ( $\text{NaCl}$ ; Tween 20 – Sigma, P1379;  $\text{H}_2\text{O}$  ultra pura), sendo o excesso de solução retirada batendo-se a placa em papel toalha. A seguir, em cada um dos poços

correspondentes foram pipetados 50 $\mu$ l dos padrões, controles, amostras e logo após 50 $\mu$ l da HRP, não ultrapassando mais de 10 minutos neste processo. A placa foi novamente coberta com o selador e deixada incubando por exatamente 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período foi repetido o procedimento de lavagem.

Finalmente, imediatamente antes do uso, foi preparada a solução de substrato para ELISA combinando 40 $\mu$ l 0,5M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 125 $\mu$ l 40 mM ABTS (Calbiochem, ABTS<sup>TM</sup> Chromophore, Diammonium Salt) e 12,5 ml de solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; H<sub>2</sub>O ultra pura, pH ajustado para 4,00). Foi adicionado 100 $\mu$ l em todos os poços contendo padrão, controle ou amostra. As placas foram cobertas e incubadas em temperatura ambiente e sob agitação (Multi-Pulse Vortexer; modelo 099A VB4, 50 / 60Hz – Glass-Col®), até que a densidade óptica dos poços zero fique entre 0.9 e 1. Então, procedeu-se com a leitura no leitor de microplacas (TECAN). Todas as amostras foram lidas em duplicata, com coeficiente de variação intra e inter-ensaio menor do que 10 %.

### **3.5. Análise da Integridade de DNA dos espermatozóides**

A coleta das amostras de espermatozóides 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 espermatozóides por animal, sendo a extensão da desnaturação do DNA quantificada pelo parâmetro de fluorescência  $\alpha t$ , onde  $\alpha t$  = vermelho/vermelho + verde. Espermatozóides com o DNA em condições fisiológicas normais apresentam fluorescência verde. Em animais com pequena desnaturação de DNA, a cromatina apresenta uma distribuição estreita de  $\alpha t$ . O DNA de espermatozóides 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.

### **3.6. Análise da Morfologia Espermática**

A morfologia espermática foi avaliada utilizando-se uma amostra da punção de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo diluída em formol citrato. Após a diluição, foi colocada 5  $\mu$ L da amostra diluída entre lâmina e lamínula. A análise da morfologia espermática foi realizada através do método de Câmara Úmida de acordo com Mies Filho et. al. (1986).

### **3.7. Análise Estatística**

Para a verificação da tendência de normalidade, ou seja, se a população obtida segue uma distribuição Gaussiana, utilizou-se o método de Shapiro-Wilks. O teste de normalidade foi realizado no programa computacional Statistica 6.0 (Copyright<sup>©</sup> StatSoft, Inc., 2001). Dependendo da tendência normal dos resultados obtidos, utilizou-se testes paramétricos ou não paramétricos. Em virtude da normalidade dos dados, se procedeu com a realização dos testes estatísticos para verificação de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais, estes testes foram realizados no programa computacional InStat (GraphPad Software, Inc., 2000). Para os dados considerados normais foi utilizado o teste T-independente ou teste de Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações, visando analisar quais grupos diferiram entre si. Caso os dados não seguissem uma tendência normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn. Nas análises referentes à integridade de DNA e morfologia espermática foi utilizado o teste não paramétrico do  $\chi^2$ . Em todas as análises realizadas, os

dados foram expressos através de estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para  $p < 0,05$ . Os gráficos foram confeccionados no programa Microsoft® Office Excel, 2003.

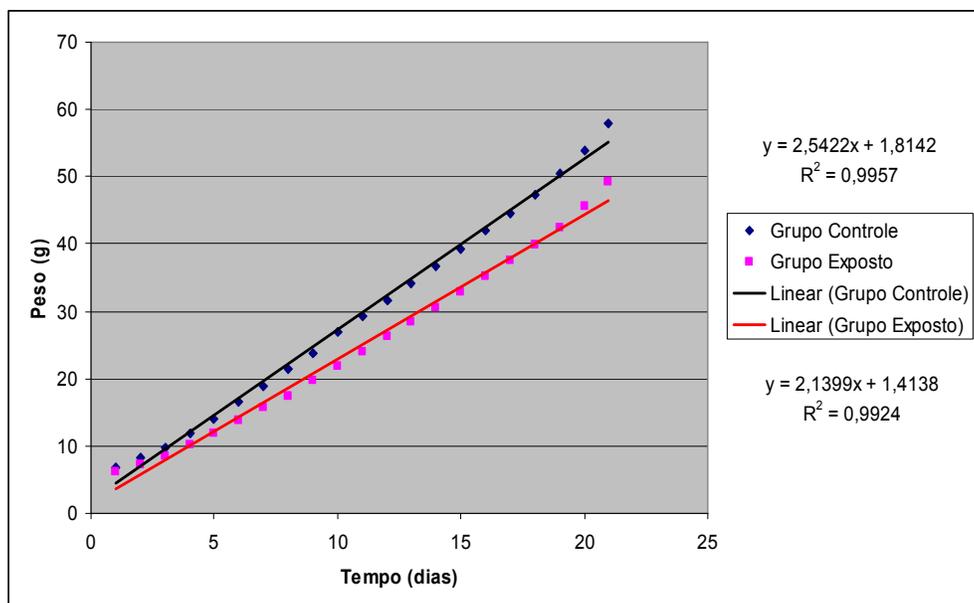
## **4. RESULTADOS**

Diversas alterações provocadas pela interação dos CEM de baixa frequência com organismos biológicos têm sido relatadas. Porém, se fazem necessários mais estudos visando esclarecer os possíveis efeitos provocados pela exposição aos CEM de baixa frequência no sistema reprodutivo masculino, em especial no processo espermatogênico. A presente pesquisa visa proporcionar um auxílio para o esclarecimento da extensão e dos possíveis mecanismos de atuação dos CEM de baixa frequência nos processos envolvidos na espermatogênese.

#### **4.1. Desenvolvimento Ponderal**

Na Tabela 1 são mostrados os valores referentes ao peso dos animais desde o primeiro dia pós-nascimento até o 21º dia de vida dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que desde o 1º dia de nascimento até o 21º pós-natal, os animais expostos ao CEM apresentaram peso estatisticamente menor em relação ao controle. Estes achados sugerem que os CEM de baixa frequência podem agir nas fêmeas gestantes, nos fetos, bem como nos animais recém nascidos, resultando na diminuição de massa corpórea durante a fase inicial de suas vidas.

Pode-se observar na Figura 5 que durante o período dos primeiros 21 dias pós-natal os ratos irradiados apresentaram um peso médio menor que os não irradiados. É interessante observar que o desenvolvimento ponderal nesta fase inicial em ambos os casos teve comportamento linear ( $R^2=0,99$  /  $R^2=0,99$ ), respectivamente. Vale ressaltar que o efeito causado pelo CEM foi quantitativo e não qualitativo, pois o desenvolvimento ponderal dos animais expostos ao CEM continuou com comportamento linear.



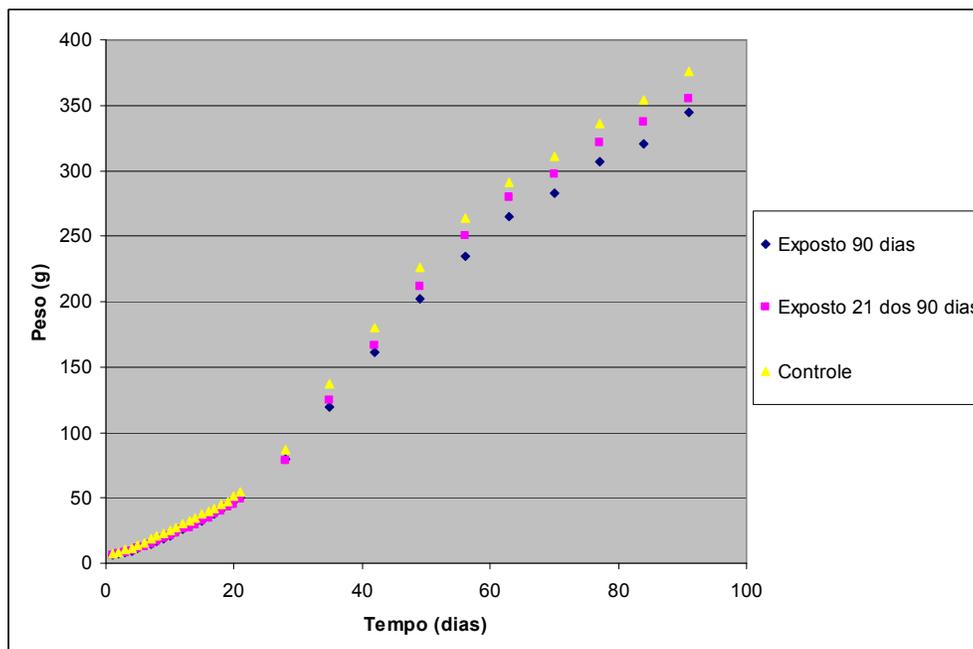
**Figura 5.** Desenvolvimento ponderal dos animais expostos ao CEM de baixa frequência (60 Hz) desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e seus respectivos controles.

Os valores referentes ao peso dos órgãos coletados aos 21 dias pós-natal podem ser visibilizados na Tabela 2. Estes resultados demonstram que houve redução significativa no peso aferido em gramas para o testículo direito, testículo esquerdo, rim esquerdo, baço e timo. Não foram observadas alterações ponderais nos epidídimos direito e esquerdo, rim direito e fígado. Estes resultados sugerem que os CEM podem ter uma ação sistêmica, envolvendo diversos sistemas biológicos, tais como o sistema reprodutor masculino, o sistema renal, sistema hematocitopoiético e sistema imunológico.

Os índices relativos referentes à proporção que os órgãos ocupam dentro do corpo do animal demonstraram que os testículos direito e esquerdo, bem como o baço apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias em relação ao grupo controle (Tabela 3).

Na Figura 6 e Tabela 4 pode-se observar que os animais que continuaram sob a interação com o CEM de baixa frequência apresentam um peso menor em relação aos não expostos. Vale ressaltar que no grupo que foi exposto ao CEM durante todo o período dos 90 dias, os animais possuem um desenvolvimento ponderal sempre inferior aos animais controle. No grupo de animais expostos desde o 13º dia de gestação até os 21 dias houve

uma recuperação do desenvolvimento ponderal ao longo do período experimental (90 dias). Estes animais apresentaram uma tendência de retorno do peso à normalidade quando foi parada a exposição ao CEM.



**Figura 6.** Desenvolvimento ponderal dos animais expostos ao CEM de baixa frequência (60 Hz) e 1mT, desde a gestação até os 21 dias pós-natal e analisados ao longo dos 90 dias de vida, expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias e seus respectivos controles.

A variação do peso médio corpóreo desde o nascimento até os 90 dias nos animais dos grupos tratado com o CEM e o controle pode ser descrita por uma função do tipo Sigmoidal de Hill (Figura 6):

$$P = Vmáx \left( \frac{tn}{kn + tn} \right)$$

Onde o “P” é o peso médio dos animais, Vmáx é o maior valor obtido do peso, o “t” é o tempo aferido em dias, bem como “k” e “n” são variáveis da função.

Para o grupo exposto ao CEM durante os primeiros 21 dias pós-natal obteve-se os seguintes parâmetros:  $\text{Chi}^2 = 38,310$ ,  $V_{\text{máx}} = 604,104 \pm 41,109$ ,  $k = 68,386 \pm 5,375$ ,  $n = 1,799 \pm 0,068$  e  $p < 0,05$ . Para o grupo controle obteve-se:  $\text{Chi}^2 = 33,608$ ,  $V_{\text{máx}} = 556,40 \pm 29,752$ ,  $k = 62,933 \pm 3,673$ ,  $n = 2,003 \pm 0,070$  e  $p < 0,05$ . Porém, para o grupo tratado com o CEM durante todos os 90 dias de vida, obteve-se como parâmetros:  $\text{Chi}^2 = 24,366$ ,  $V_{\text{máx}} = 558,649 \pm 34,742$ ,  $k = 70,016 \pm 5,019$ ,  $n = 1,784 \pm 0,059$  e  $p < 0,05$ .

A adequação das equações demonstra um  $p < 0,05$  para todos os grupos experimentais analisados. Isto indica que a descrição do processo de desenvolvimento ponderal dos animais através da função do tipo Sigmoidal de Hill é estatisticamente comprovada. Através do cálculo dos parâmetros destas funções, pode-se encontrar qualquer valor referente ao peso (em gramas) destes animais em qualquer tempo (em dias) a ser determinado.

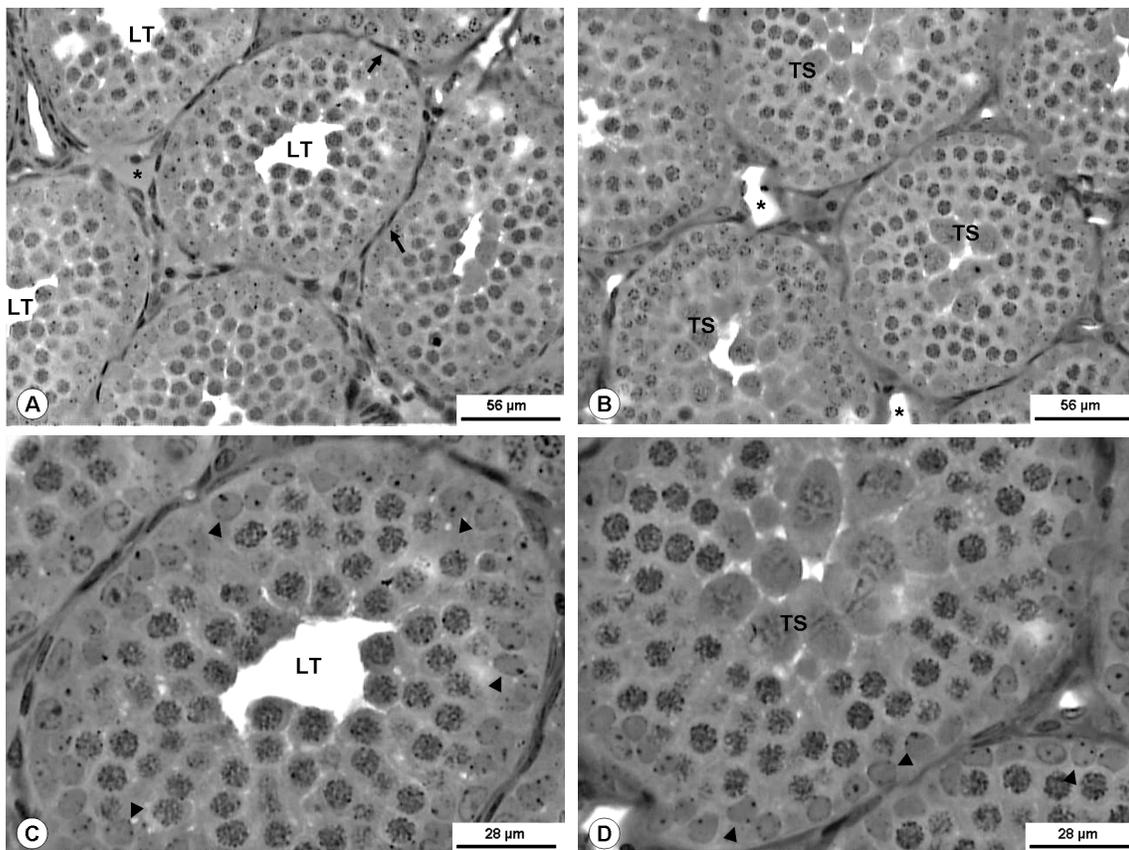
Os pesos dos órgãos coletados nos animais aos 90 dias podem ser observados na Tabela 5. Foram analisados os testículos direito e esquerdo, epidídimos direito e esquerdo, rins direito e esquerdo, fígado, baço, timo, e vesícula seminal. Apenas o peso do epidídimo direito apresentou redução estatisticamente significativa. O restante dos órgãos analisados não apresentaram alteração significativa.

Os índices relativos do peso dos órgãos em função do peso corporal demonstraram que o epidídimo direito e a vesícula seminal aumentaram estatisticamente nos animais expostos ao CEM durante o período do 13º dia de gestação até os 90 dias de vida em relação aos animais controle (Tabela 6).

O índice gonadossomático (IGS) pode ser descrito como um fator relativo referente às médias do peso de ambos os testículos em função do peso corporal total dos animais. Este IGS na ausência de alterações fisiológicas está diretamente ligada à capacidade de produção de espermatozóides viáveis pelo indivíduo (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos de animais expostos ao CEM tanto por 21 como por 90 dias em relação ao grupo controle (Tabela 6).

## **4.2. Histomorfometria e Histopatologia Testicular**

As análises estatísticas referentes à histomorfometria testicular nos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal (Tabelas 7 e 8), demonstrou que o comprimento dos túbulos seminíferos está significativamente maior nos animais expostos ao CEM. Também houve alteração significativa na proporção volumétrica dos testículos, em virtude do aumento no espaço linfático, espaço intertubular e túnica própria nos animais expostos ao CEM em relação ao controle. Foi observada nos animais expostos ao CEM uma diminuição significativa referente ao volume de epitélio seminífero, quantidade de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero, diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero. Não houve diferença estatisticamente significativa no peso líquido dos testículos, parâmetro que se refere ao parênquima testicular, ou seja, o componente responsável pela função do órgão. Também não houve alteração significativa na população total de células de Sertoli, bem como no volume de células de Leydig, vaso sanguíneo, tecido conjuntivo, túbulos seminíferos e lume (Tabelas 7, 8 e Figura 7).



**Figura 7.** Fotomicrografias dos testículos de ratos wistar aos 21 dias pós-natal. Animais controle (7A e 7C) e expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 21 dias de vida (7B e 7D). Na figura 7A notar túbulos seminíferos com lume bem definido nos animais controle (LT). Na figura 7B observar túbulos seminíferos (TS) em processo de luminação nos animais expostos. Na figura 7C e D notar detalhe de túbulos seminíferos luminados (LT) nos animais controle e dos túbulos em luminação (TS) dos animais expostos. Notar células de Sertoli no compartimento basal do túbulo seminífero (cabeça de seta) nas figuras 7C e 7D. Observar na figura 7A o espaço intertubular (\*) e a túnica própria (seta). Notar na figura 7B os vasos sanguíneos presentes no espaço intertubular (\*).

Na Tabela 9 pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros histomorfométricos testiculares entre os animais aos 90 dias do grupo controle e do grupo controle negativo. Sendo o grupo controle submetido às mesmas manipulações que os grupos experimentais, com a exceção da presença do CEM, no grupo controle negativo não foi realizado nenhum tipo de manipulação. Este pode ser considerado um indicativo de que as manipulações as quais os animais dos grupos experimentais e controle foram submetidos não interferiram nos resultados obtidos.

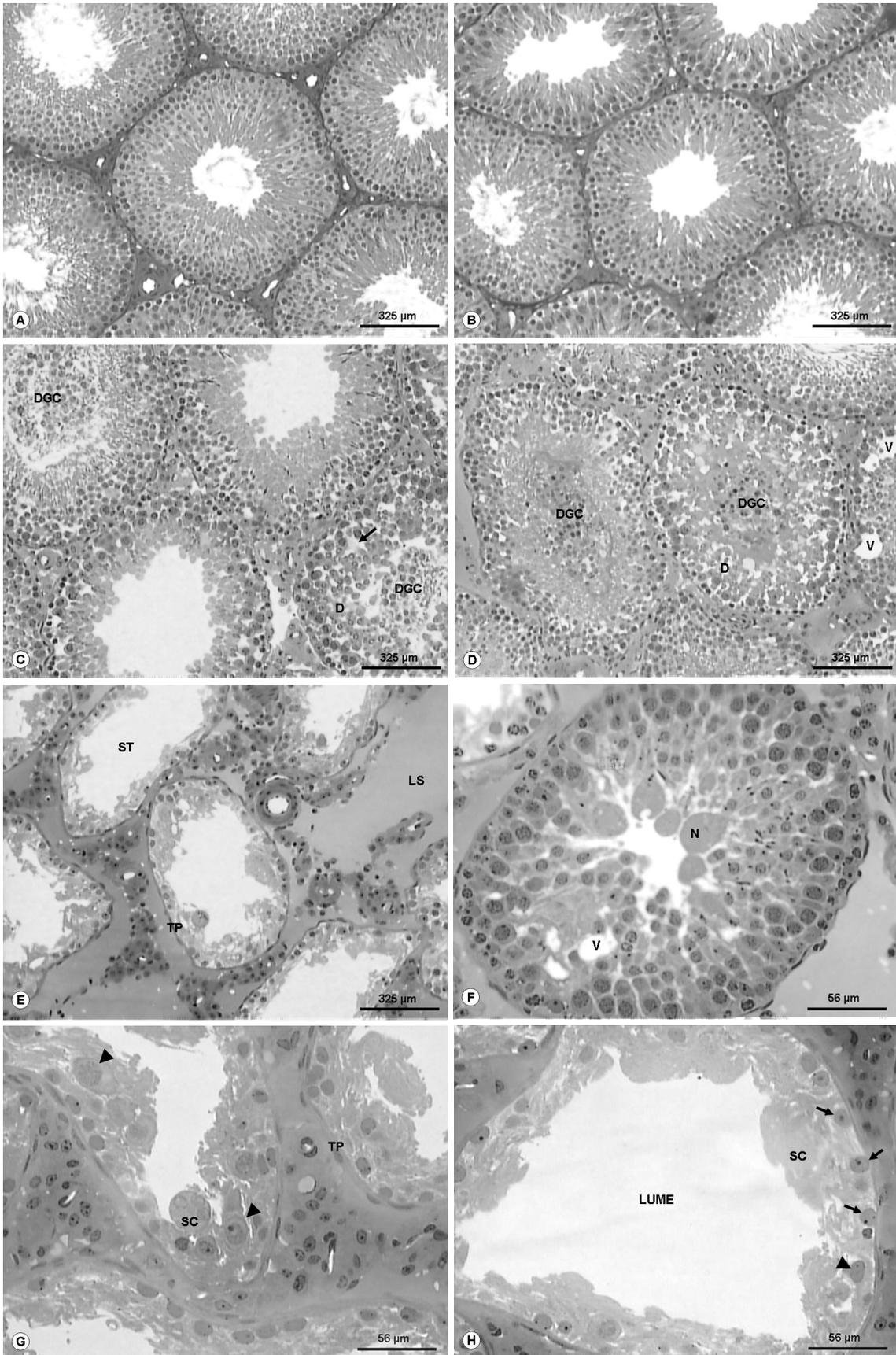
A histomorfometria testicular dos animais expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias, ou expostos desde a gestação até os 90 dias pós-natal, quando comparada aos animais dos grupos controle, apresentaram diferença estatisticamente significativa apenas para o diâmetro dos túbulos seminíferos (Tabelas 10). Não foi observada diferença significativa em relação aos parâmetros de peso líquido testicular, comprimento tubular e altura de epitélio, bem como para os parâmetros de população total de células de Sertoli, quantidade de células de Sertoli por secção transversal, índice de células de Sertoli (ICS), produção espermática diária (PED) e produção espermática diária por grama de testículo (PEDg). O volume testicular referente aos túbulos seminíferos, epitélio seminífero, lume, túnica própria, células de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, espaço linfático e espaço intertubular também não apresentaram diferença estatística significativa (Tabelas 11). Observando-se os resultados obtidos para os parâmetros histomorfométricos testiculares no grupo exposto ao CEM desde a gestação até os 90 dias de vida, pode-se constatar que apesar dos valores observados não serem considerados estatisticamente diferentes, houve uma elevada dispersão das médias (desvio padrão) dentro do mesmo grupo experimental.

As análises histopatológicas realizadas nos testículos revelaram que não houve alterações nos testículos dos animais dos grupos controle e controle negativo (Figuras 8A e 8B). Portanto, as manipulações as quais os animais do grupo controle foram submetidos não desencadearam nenhum tipo de processo patológico identificado à microscopia óptica.

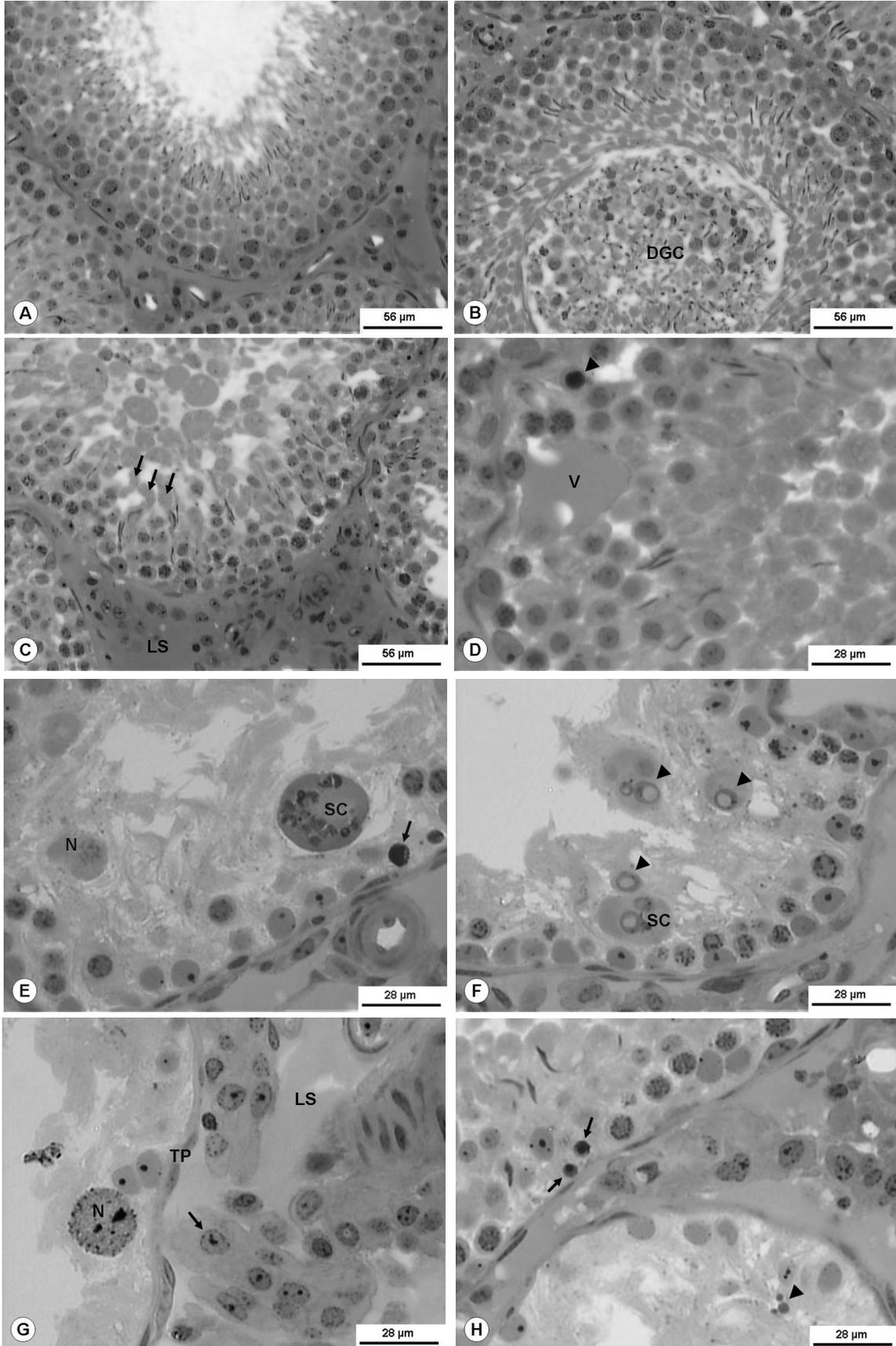
Nos animais expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias, observou-se em microscópio óptico lesões patológicas nos testículos em 50 % dos animais. Dentre estes, em 16,66 % dos animais foram observadas lesões mais graves, tais como descamação do epitélio seminífero, células germinativas no lume tubular, células germinativas em processo de apoptose e vacuolizações em células de Sertoli (Figuras 8C e 8D).

Os resultados histopatológicos também revelaram que em 50 % dos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias também apresentaram alterações patológicas nos testículos detectáveis à microscopia óptica. Em 25 % do total de animais deste grupo houve lesões no epitélio seminífero compatíveis com degeneração testicular.

Dentre as lesões compatíveis com o quadro citado anteriormente foram observadas células germinativas em processo de descamação, grande quantidade de células descamadas no lume tubular, edemas de cauda em espermátides alongadas, aumento do espaço intertubular, espessamento da túnica própria dos túbulos seminíferos, vacuolização em células de Sertoli. Também foi observada grande quantidade de células germinativas em necrose e em processo de apoptose, bem como presença de corpos apoptóticos. (Figuras 9C, 9D, 9E, 9F, 9G e 9H). Com base nestes resultados, pode-se dizer que houve comprometimento no processo espermatogênico destes animais. Em 8,33 % dos animais expostos ao CEM até os 90 dias, foi observado túbulos seminíferos com uma grande redução do epitélio seminífero, ocasionada pela diminuição excessiva da quantidade de células germinativas, inclusive das linhagens próximas ao compartimento basal. Alguns destes túbulos seminíferos apresentaram apenas a presença de células de Sertoli e algumas espermatogônias no epitélio seminífero (Figura 8H). Nestes animais também foi observada a presença de vacuolizações em células germinativas e células sinciciais gigantes ou células multinucleadas gigantes (Figuras 9E e 9F). Em 16,66 % dos animais o processo degenerativo que acometeu o testículo também cessou a produção de espermatozóides, pois não foram observados espermatozóides no lume dos túbulos seminíferos. Na avaliação histopatológica, também houve diferentes respostas ao CEM dentro do mesmo grupo experimental, enquanto 50 % dos animais não apresentaram nenhum processo patológico, 25 % apresentaram lesões no epitélio seminífero compatíveis com degeneração testicular.



**Figura 8.** Fotomicrografias dos testículos de animais controle (8A), controle negativo (8B) e expostos a CEM de baixa frequência de 60Hz e 1 mT durante 21 dias (8C e 8D) ou 90 dias (8E, 8F, 8G e 8H). Observar que nas figuras 8A (controle) e 8B (controle negativo) não existem alterações patológicas. Na figura 8C e 8D, pode-se observar a descamação do epitélio seminífero (D), células germinativas descamadas no lume tubular (DGC) e vacuolização de células de Sertoli (seta, V). Na figura 8E observa-se um túbulo seminífero com ausência de espermatogênese (ST), espessamento da túnica própria (TP) e aumento do espaço linfático (LS). Observar na figura 8F vacuolizações em células de Sertoli (V) e necrose de células germinativas (N). Na figura 8G encontram-se células sinciciais gigantes (SC), espessamento de túnica própria (TP) e células germinativas necróticas em paquíteno (cabeça de seta). Na figura 8H notar um túbulo seminífero com ausência de espermatogênese, notar a presença dos núcleos (seta) e dos prolongamentos das células de Sertoli (SC), bem como a presença de poucas espermatogônias (cabeça de seta).



**Figura 9.** Fotomicrografias do estágio VII do epitélio seminífero no animal controle (9A) e dos processos patológicos observados nos animais expostos ao CEM por 21 dos 90 dias (9B) e durante todos os 90 dias de vida (9C, 9D, 9E, 9F, 9G e 9H). Observar na figura 9B as células germinativas descamadas no centro do lúmen do túbulo seminífero. Na figura 9C podemos constatar edemas de cauda de espermátide alongada (seta), notar a presença do espaço linfático intertubular (LS). Na figura 9D notar vacuolização de célula de Sertoli (V) e uma célula germinativa em picnose (cabeça de seta). Pode-se observar na figura 9E a presença de células sinciciais gigantes (SC), célula germinativa em necrose (N) e em picnose (seta). Observar na figura 9F vacúolos em células germinativas (cabeça de seta) e a formação de células sinciciais gigantes (SC). A figura 9G demonstra uma célula germinativa em necrose (N) e o espessamento da túnica própria (TP), notar a presença de espaço linfático (LS) e célula de Leydig (seta). Na figura 9H pode-se observar células germinativas em apoptose (seta) e corpos apoptóticos (cabeça de seta).

Vale ressaltar que os animais que apresentaram processo de degeneração testicular mais grave não foram utilizados para os cálculos referentes à histometria quantitativa dos parâmetros espermatogênicos. As lesões patológicas observadas nestes animais inviabilizaram as medições de diâmetro tubular e altura de epitélio, bem como as contagens dos tipos celulares em associação com o estágio VII dos túbulos seminíferos, de acordo com o método acrossômico.

Observando-se os resultados obtidos para os parâmetros histomorfométricos do grupo exposto ao CEM até os 90 dias, pode se constatar que apesar da diferença entre os valores não serem considerados estatisticamente significativos, houve uma elevada dispersão das médias (desvio padrão) dentro do mesmo grupo. Este fato, em corroboração com os achados histopatológicos, revelaram que houve diferentes respostas dos animais ao mesmo estímulo, indicando que houve diferentes respostas individuais dentro do mesmo grupo experimental.

### **4.3. Histometria Computacional**

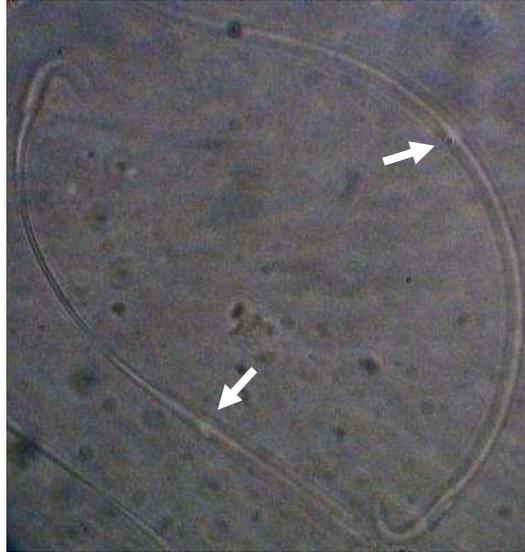
Os resultados da aferição da área e do perímetro dos túbulos seminíferos realizados através de programa computacional biométrico podem ser visibilizados na Tabela 12. Pode-se observar que tanto a área como o perímetro apresentaram uma redução estatisticamente significativa naqueles animais expostos ao CEM que apresentaram padrões compatíveis com a degeneração testicular em relação aos animais controle.

#### **4.4. Dosagens da Testosterona Plasmática**

Os resultados obtidos para as dosagens de testosterona plasmática não demonstraram diferença estatisticamente significativa. Esta similaridade estatística entre as médias ocorreram tanto nos animais pré-púberes expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal em relação ao grupo controle (Tabela 13), como nos animais adultos expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias de vida ou nos animais expostos durante todos os 90 dias em relação aos grupos controle e controle negativo (Tabela 14).

#### **4.5. Integridade de DNA e Morfologia Espermática**

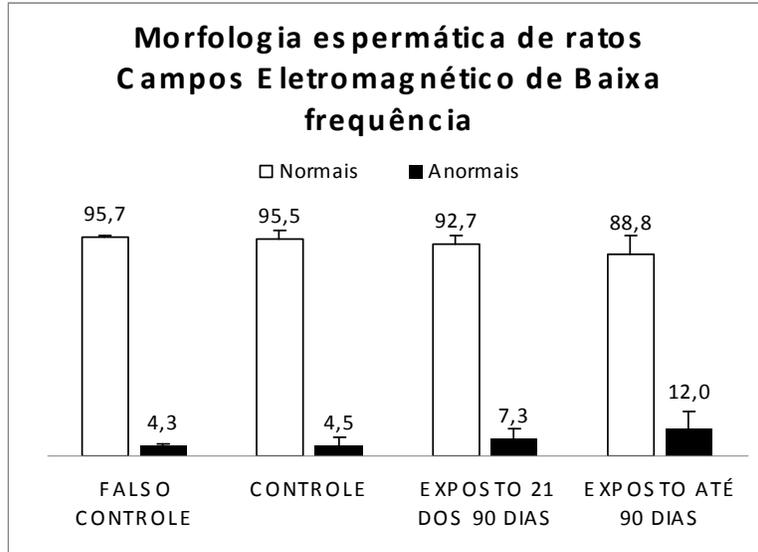
De acordo com as avaliações morfológicas dos espermatozoides (Tabelas 15 e 16), foi constatado uma maior frequência de defeitos espermáticos nos animais expostos ao CEM tanto por 21 quanto por 90 dias em relação ao grupo controle e controle negativo. Houve a prevalência de defeitos menores, principalmente dos tipos gota citoplasmática distal (Figura 10), pseudo-gota, cauda quebrada, cauda enrolada e cabeça isolada (Tabela 16). Também foi observada diferença significativa entre os animais expostos por 21 dias pós-natal em relação aos expostos durante todos os 90 dias (Tabelas 15, 16 e Figura 11).



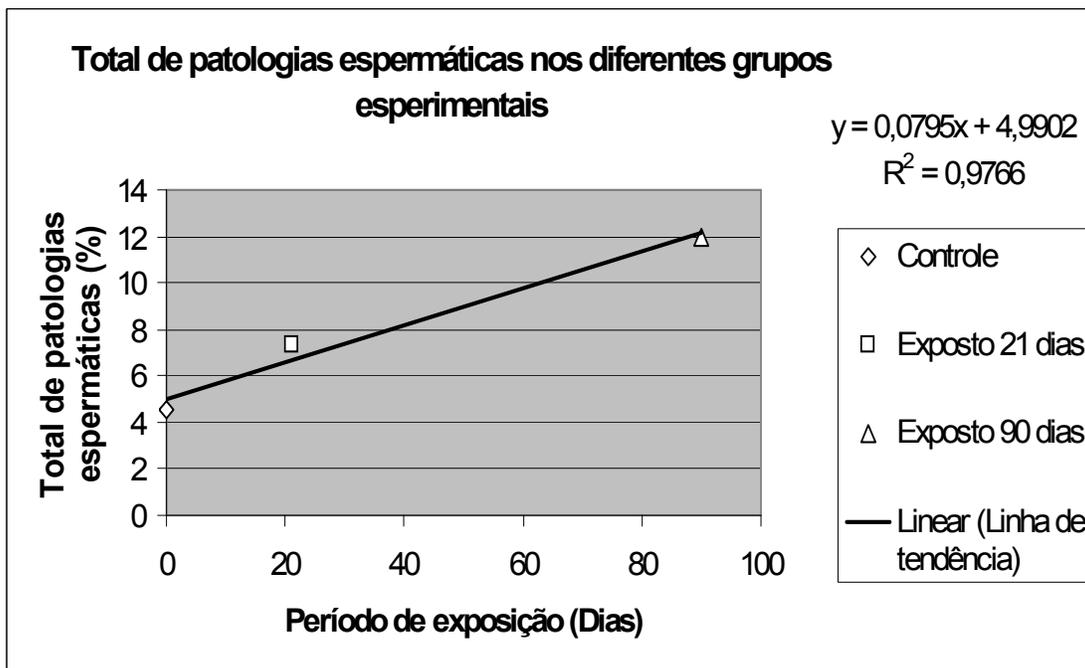
**Figura 10.** Fotomicrografia em microscópio de contraste de fase, demonstrando a presença de gota citoplasmática distal (seta) nos espermatozóides de ratos expostos a CEM de 60 Hz e 1 mT de densidade de fluxo magnético

O número de espermatozóides defeituosos foi 64% maior nos animais expostos desde a gestação até 90 dias pós-natal em relação ao grupo controle negativo e 63% maior em relação ao grupo controle. Também foi observado um aumento de 39% na quantidade de espermatozóides defeituosos nos animais expostos por 90 dias em relação aqueles expostos desde a gestação até 21 dos 90 dias pós-natal. O grupo exposto desde a gestação até 21 dos 90 dias pós-natal apresentou aumento de 41% na quantidade de espermatozóides defeituosos em relação ao controle negativo e 38% em relação ao grupo controle.

Também foi realizada correlação entre a quantidade de patologias espermáticas e o tempo de exposição ao CEM, na qual se demonstrou correlação linear positiva entre o tempo de exposição ao CEM e o percentual de patologias (Figura 11 e 12).



**Figura 11.** Porcentagem de espermatozoides normais e anormais após os diferentes períodos de exposição a Campos Eletromagnético de 60 Hz de frequência e 1 mT de densidade de fluxo magnético.



**Figura 12.** Correlação entre a quantidade de patologias espermáticas e o tempo de exposição ao CEM, demonstrada através do coeficiente de angulação da função linear que descreve o comportamento da porcentagem de patologias espermáticas durante os diferentes períodos de exposição ao CEM.

A integridade de DNA dos espermatozoides nos animais expostos ao CEM de baixa frequência não revelou alterações estatisticamente significativas do grupo controle em relação aos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dos 90 dias de vida. Também não foram significativos os resultados observados do grupo controle em relação ao grupo exposto até os 90 dias, bem como os resultados na avaliação dos grupos expostos ao CEM durante 21 dos 90 dias em relação ao grupo exposto por todos os 90 (Tabela 17).

## **5. DISCUSSÃO**

## 5.1. Desenvolvimento Ponderal

Pôde-se observar com os resultados obtidos neste trabalho, que já ao primeiro dia de nascimento os animais expostos ao CEM apresentaram o peso reduzido em relação aos controles. Este fato sugere que os CEM podem interagir com as fêmeas gestantes ou com os fetos ainda no período gestacional. Segundo Huuskonen et al. (2001) foram observadas alterações nos receptores de estradiol e progesterona no útero durante a gestação de ratas expostas a campos magnéticos de 13 ou 130  $\mu\text{T}$ , indicando que o campo magnético pode promover algumas alterações no transporte e desenvolvimento dos embriões e parâmetros endócrinos associados. Também foram constatadas correlação entre CEM de 50 Hz com defeitos congênitos do sistema nervoso central em humanos (BLAASAAS et al., 2002) e deformações em fetos de camundongos expostos a campos magnéticos de 400 mT (SAITO et al., 2006). Durante todos os primeiros 21 dias pós-natal os animais expostos ao CEM apresentaram o desenvolvimento ponderal reduzido em relação aos animais do grupo controle. Portanto, pode-se verificar que ao longo de 21 dias, período em que os organismos neonatos estão definindo as suas trajetórias metabólicas em prol da maturação de seus tecidos e sistemas orgânicos, o CEM de 60 Hz e 1mT proporcionou mudanças na taxa de ganho de peso corpóreo.

Diversos estudos não observaram efeitos adversos na gestação. Neigish et al. (2002) não observou efeitos da exposição de ratas a campos magnéticos de 50 Hz e 7, 70 ou 350  $\mu\text{T}$  por 22 horas / dia durante o período de 0 a 7 dias (pré-implantação) ou 8 a 15 dias (organogênese) da gestação. Também não foram observadas alterações nas fêmeas gestantes ou nos fetos depois da exposição contínua de ratas do 6º ao 20º dia de gestação a campos magnéticos de 5, 83,3 ou 500  $\mu\text{T}$ .

Estes estudos realizaram exposições contínuas e por longos períodos do dia, este fator pode resultar na adaptação dos animais ao estímulo causado pelos campos elétricos e magnéticos, pois já foi observado efeito de adaptação na proliferação de células expostas a CEM (KWEE e RASMARK, 1998).

Os resultados para os pesos dos órgãos coletados aos 21 dias pós-natal demonstram que houve alterações significativas no peso do testículo direito, testículo esquerdo, rim esquerdo, baço e timo. Os índices relativos referentes à proporção que os

órgãos ocupam dentro do peso corporal total aos 21 dias pós-natal demonstraram que os testículos direito e esquerdo, bem como o baço apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos animais expostos ao CEM em relação ao grupo controle. Estes resultados corroboram com as referências relatadas anteriormente e sugerem que os CEM podem ter uma ação sistêmica, envolvendo outros sistemas biológicos além do sistema reprodutor masculino.

A produção espermática em animais sob condições normais é diretamente correlacionada com o peso testicular (FRANÇA e RUSSEL, 1998). No presente trabalho, o peso dos testículos se demonstrou significativamente reduzido nos animais expostos ao CEM até os 21 dias pós-natal. Porém, esta redução estatística do peso testicular nos animais aos 21 dias não foi constatada nos animais expostos ao CEM até os 90 dias. Este fato pode sugerir um mecanismo de compensação / adaptação do organismo ao CEM.

O trabalho realizado por Tablado et al. (2000) não demonstrou alteração no peso corporal, dos testículos e epidídimos de camundongos expostos continuamente ou por 1 hora a campos magnéticos de 500 a 700 mT. Nesta densidade de fluxo magnético os autores citados anteriormente não encontraram alterações no peso testicular e epididimário, bem como na avaliação histopatológica dos testículos e epidídimos nos dias 1, 5, 15 e 35 pós-natal. Este padrão de exposição pode ter resultado na adaptação dos animais, pois a aplicação em doses fracionadas parece ter resultados mais pronunciados que a exposição constante a campos elétricos e magnéticos (RAMADAN et al., 2002).

Como a função temporal de ganho de peso demonstrou-se linear, tanto para os animais do grupo controle como para os animais do grupo tratado com o CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal, pode-se inferir que as alterações nos mecanismos que definem as taxas de ganho de peso foram qualitativamente similares em ambos os grupos, mas quantitativamente distintas.

Os animais analisados na fase adulta também apresentaram seu desenvolvimento ponderal reduzido quando continuaram a ser expostos ao CEM. No grupo de animais expostos desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e avaliados ao longo de 90 dias pós-natal, observou-se recuperação do desenvolvimento ponderal. Estes animais apresentaram uma tendência de retorno do peso à normalidade. A redução estatística entre o peso destes animais e seus respectivos controles se manteve até a 4ª semana de vida

(aproximadamente 49 dias), a partir deste período, os animais apresentaram uma recuperação de seu peso e a diferença entre os grupos não foi mais estatisticamente significativa. Estes resultados corroboram os de Al-Akhras et al. (2001), sugerindo que quando se cessa a exposição ao CEM, há uma recuperação do organismo animal, portanto, os efeitos causados pelos CEM são parcialmente reversíveis.

Os animais submetidos ao CEM apresentaram um menor ganho de peso em relação ao grupo controle. Isto, de certa forma, pode sugerir diferenças importantes nos mecanismos de acúmulo de massa corpórea, não somente com relação ao acúmulo de gordura, mas também com relação ao desenvolvimento da estrutura óssea e massa muscular, pois se sabe que pulsos eletromagnéticos de 75 Hz e 1,6 mT irradiados 6 horas por dia durante 6 meses pode alterar a densidade óssea (FINI et al., 2008) e CEM de alta frequência e baixa intensidade pode atuar em lesões do tecido muscular (CANATA et al., 1982).

Por outro lado, também pode ser sugerido que os animais submetidos ao CEM apresentaram um ganho de peso menor em virtude de uma perda maior de energia metabólica devido ao aumento do metabolismo corporal, pois os CEM de 100 Hz irradiados durante 50 dias podem alterar parâmetros como o peso corporal, a glicose sanguínea e o metabolismo de ácidos graxos (GERARDI et al., 2008). Outra hipótese seria a de que os CEM induzem alterações no comportamento dos animais, pois campos magnéticos de 50 Hz e 140 mT provocam alterações na memória de reconhecimento espacial em camundongos (FU et al., 2008). Esta alteração no comportamento dos animais poderia conduzir a modificações dos seus hábitos, inclusive em uma escala social do grupo, resultando em um menor desenvolvimento ponderal.

Em relação ao peso dos órgãos coletados aos 90 dias, apenas o peso do epidídimo direito apresentou redução estatisticamente significativa. O restante dos órgãos analisados não apresentaram alteração significativa. A redução no peso do epidídimo direito parece ser um artefato de pesquisa e não deve representar significado biológico relevante.

Aydin et al. (2007) demonstrou que CEM de 50 Hz e 48,21 mG gerados por linhas de alta tensão de 170 kV irradiados continuamente em ratos durante 1, 2 e 3 meses não alterou o peso dos órgãos reprodutivos nem as dimensões testiculares. Os resultados

observados por estes autores corroboram com os resultados do presente trabalho, onde os CEM parecem não alterar o peso dos órgãos nos animais adultos.

O índice gonadossomático (IGS) pode ser caracterizado como o percentual de peso corporal alocado no testículo (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Este parâmetro não se alterou devido à exposição ao CEM. Este resultado corrobora com os achados da histomorfometria, pois a manutenção do IGS pode ter ocorrido em virtude da não alteração dos parâmetros relacionados com as células de Sertoli, já que a população de células de Sertoli desempenha um importante papel no tamanho final do testículo (FRANÇA e RUSSEL, 1998) e em mamíferos ocupam entre 11 e 40% do epitélio seminífero (FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005).

Os índices relativos do peso dos órgãos em função do peso corporal demonstraram que o epidídimo direito e a vesícula seminal aumentaram estatisticamente nos animais expostos ao CEM durante o período do 13º dia de gestação até os 90 dias de vida em relação aos animais controle. O aumento relativo do peso do epidídimo direito também parece representar um artefato de pesquisa e não deve representar significado biológico significativo. Porém, o aumento do peso relativo da vesícula seminal pode ter ocorrido em virtude do aumento na taxa de proliferação celular (KWEE e RASKMARK, 1995; FREDOWITZ et al., 2002; WOLF et al, 2005), pois os CEM de 50 Hz irradiados por 2 meses podem interagir com a vesícula seminal (KHAKI et al., 2008).

## **5.2. Histomorfometria e Histopatologia Testicular**

Os dados obtidos nas análises histomorfométricas dos animais expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal demonstraram que houve uma redução estatisticamente significativa do volume e da altura do epitélio seminífero e do diâmetro tubular, bem como o aumento do espaço linfático, que resultou no aumento do volume de espaço intertubular.

A maturação das células de Sertoli é caracterizada pelo aparecimento da barreira hemato-testicular funcional e tem com conseqüência o aparecimento do lume tubular e progressão das células germinativas além da fase de espermatócitos primários. Em ratos, este evento ocorre entre 14 e 20 dias após o nascimento (PELLETIER; GRISWOLD,

1998; FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). No presente trabalho, os animais foram expostos ao CEM de baixa frequência desde 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal, período no qual está ocorrendo a maturação das células de Sertoli. Os resultados observados sugerem que a exposição ao CEM promove retardo na formação da barreira hemato-testicular das células de Sertoli, indicando um provável retardo no processo de maturação destas células nos animais submetidos a este protocolo de irradiação. As células de Sertoli imaturas não apresentam as junções de oclusão (barreira hemato-testicular) totalmente formadas (JEGÓU, 1992), portanto, estas células não estariam aptas a suportar a entrada das células germinativas em divisão meiótica. Este fato provocaria uma diminuição na quantidade de células germinativas no epitélio dos túbulos seminíferos nos animais expostos ao CEM até a fase pré-púbere (21 dias pós-natal). Acredita-se que o retardo no processo espermatogênico geralmente não ocorra, pois existe um rígido controle que não permite ou permite apenas um pequeno atraso no desenvolvimento da espermatogênese, porém, existe o retardo do processo espermatogênico na deficiência da vitamina A, onde as espermatogônias A<sub>1</sub> se amontoam nos túbulos (RUSSEL et al., 1990). O hipotireoidismo também retarda o processo espermatogênico, resultando no atraso da maturação das células de Sertoli, as células germinativas entram em apoptose e as células peritubulares mióides também permanecem imaturas (FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). Estes processos não foram observados durante a exposição ao CEM, entretanto neste experimento se observou um número qualitativamente menor de túbulos luninados nos animais expostos. Como o aparecimento do lúmen nos túbulos está estritamente relacionado à maturação estrutural e secreção de fluido seminífero de maneira polarizada pela célula de Sertoli (ORTH, 1993), acreditamos que o CEM interfira de alguma maneira na formação desta barreira.

Por outro lado, nestes animais expostos ao CEM, ocorreu o aumento no comprimento dos túbulos seminíferos. Este aumento de comprimento parece representar uma resposta compensatória do organismo visando manter o processo espermatogênico normal e a população de células de Sertoli, pois o comprimento total dos túbulos seminíferos está diretamente relacionado com três parâmetros, o tamanho do testículo, o volume ocupado pelos túbulos seminíferos e o diâmetro tubular (FRANÇA e RUSSEL, 1998).

Nos animais expostos ao CEM até os 21 dias pós-natal, houve uma redução estatisticamente significativa na quantidade de células de Sertoli por secção transversal. Isto pode ter influenciado na redução do diâmetro tubular e na altura do epitélio seminífero, pois as células de Sertoli em mamíferos ocupam entre 11 e 40% do epitélio seminífero (FRANÇA e CHIARINI-GARCIA, 2005). Entretanto, a população de células de Sertoli se manteve similar aos animais controle em virtude do aumento compensatório do comprimento dos túbulos seminíferos.

Nos animais adultos, quando expostos ao CEM até os 90 dias, não houve alteração estatisticamente significativa na população de células de Sertoli, bem como no comprimento de túbulos seminíferos. Este fato indica que os CEM parecem atuar apenas nas células de Sertoli imaturas, alterando-a quantitativamente por secção transversal de túbulo seminífero, porém não alterando a proliferação ao longo do túbulo, o que justifica o aumento compensatório no comprimento dos túbulos seminíferos.

O presente estudo observou que o CEM parece não influenciar na quantidade de células de Sertoli maduras, pois sua população em indivíduos adultos é estável (FRANÇA et al., 2005), e não alterou significativamente nos animais expostos ao CEM. Também não houve alterações na quantidade de células de Sertoli por secção transversal e no comprimento dos túbulos seminíferos, demonstrando que não houve a necessidade de resposta compensatória em virtude de alterações nas células de Sertoli. Entretanto, WANG et al. (2008) utilizando pulsos eletromagnéticos de 200 kV/m observou um aumento na permeabilidade da barreira hemato-testicular das células de Sertoli de camundongos adultos. No presente trabalho, não foi observada alteração quantitativa nas células de Sertoli de animais adultos, portanto, os campos elétricos e magnéticos parecem atuar nas células de Sertoli maduras qualitativamente e não quantitativamente.

Os parâmetros histomorfométricos testiculares dos animais adultos (aos 90 dias) do grupo controle e do grupo controle negativo não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros analisados. Ressaltando que o grupo controle foi submetido às mesmas manipulações que os grupos experimentais, com a exceção da presença do CEM, e o grupo controle negativo não sofreu nenhum tipo de manipulação. Este é um indicativo de que as manipulações as quais os animais dos grupos

experimentais e controle foram submetidos não causaram estresse nos animais ao ponto de interferir nos resultados obtidos para estes parâmetros.

As análises histomorfométricas nos animais adultos não revelaram alterações estatisticamente significativas entre os grupos experimentais em relação ao peso líquido testicular, altura do epitélio seminífero e quantidade de células de Sertoli por secção transversal. A histometria quantitativa dos testículos demonstrou que também não houve alteração estatisticamente significativa no comprimento dos túbulos seminíferos, na população de células de Sertoli, no índice de células de Sertoli (ICS), bem como na produção espermática diária (PED) e na produção espermática diária por grama de testículo (PED/g). A proporção volumétrica dos componentes testiculares também não se alterou estatisticamente para nenhum dos parâmetros analisados. Segundo França et al. (2005), a produção espermática diária em ratos é de 17 a 24 milhões de espermatozoides. Os resultados obtidos no presente trabalho para todos os grupos experimentais estão dentro dos padrões da espécie e conseqüentemente todas as metodologias referentes às análises histomorfométricas testiculares foram realizadas com sucesso.

Houve uma redução estatisticamente significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais expostos ao CEM até os 90 dias de vida. Esta redução do diâmetro tubular pode ter ocorrido em virtude do efeito somatório da diminuição do epitélio germinativo e do lume tubular, pois estes parâmetros estão diretamente relacionados com o diâmetro tubular (FRANÇA e RUSSEL, 1998). Esta redução do diâmetro também pode ter ocorrido em função do aumento das taxas de apoptose no epitélio seminífero. A apoptose de células germinativas ocorre fisiologicamente durante a espermatogênese (FRANÇA et al., 2005), porém, os campos elétricos e magnéticos podem influenciar no mecanismo de apoptose (LAI e SINGH, 2004), inclusive induzir o aumento nas taxas de apoptose nas células germinativas, reduzindo a quantidade de células vivas nos túbulos seminíferos (LEE et al., 2004; KIM et al., 2009).

A redução do diâmetro tubular ocorreu tanto nos animais pré-púberes, que foram expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal, como nos animais adultos, que foram expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias de vida. Portanto, o diâmetro tubular parece ser um parâmetro que pode estar sob influência do CEM durante todo o desenvolvimento do animal. Entretanto, o diâmetro tubular parece ser influenciado de

diferentes maneiras durante o desenvolvimento animal. No presente trabalho foi observado que na fase inicial de suas vidas o CEM parece atuar na maturação das células de Sertoli, impedindo que as células germinativas entrem em meiose e se diferenciem em espermatozóides (GRISWOLD, 1998). Na fase adulta estes campos parecem alterar o diâmetro tubular através da indução de apoptose nas células germinativas, diminuindo a quantidade de células germinativas vivas nos túbulos seminíferos (LEE et al., 2004; KIM et al., 2009).

Pode existir relação entre a diminuição do diâmetro tubular causada pelo CEM e uma redução na espermatogênese, já que o diâmetro dos túbulos seminíferos normalmente possuem relação positiva com a atividade espermatogênica (FRANÇA e RUSSEL, 1998), também existe referência à diminuição na espermatogênese através da análise quantitativa de túbulos seminíferos expostos a CEM (LEE et al., 2004).

Nos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias pós-natal, apesar de o diâmetro tubular apresentar-se estatisticamente reduzido, a redução na produção espermática diária (PED) não foi estatisticamente significativa, apesar da tendência de redução de 10,31%. Esta diferença na PED não se apresentou estatisticamente significativa devido ao elevado desvio padrão observado entre as médias, refletindo as diferentes respostas individuais quando os animais foram submetidos às mesmas condições experimentais.

Vale ressaltar que o diâmetro tubular não sofreu alteração significativa nos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias de vida. Este fato corrobora com os resultados obtidos no desenvolvimento ponderal, onde se observa que quando se cessa a exposição ao CEM, há uma recuperação do organismo animal. Portanto, os efeitos causados pelos CEM no diâmetro tubular e no peso dos animais parecem ser parcialmente reversíveis. Entretanto, não houve a recuperação do diâmetro tubular e do desenvolvimento ponderal com relação aos animais expostos a partir do 13º dia de gestação até 90 dias de idade. Somente a partir da retirada do CEM e num intervalo igual ou superior a duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos nos poderíamos confirmar se os efeitos do CEM na dosagem empregada é reversível para espermatogênese em ratos adultos.

Em relação às análises histopatológicas realizadas nos testículos dos animais aos 90 dias, não houve alterações nos animais dos grupos controle e controle negativo. Confirmando que as manipulações as quais os animais do grupo controle foram submetidos não desencadearam nenhum tipo de processo patológico identificado à microscopia óptica.

Os resultados histopatológicos dos animais expostos ao CEM revelaram diferentes respostas dentre os grupos experimentais e dentro do mesmo grupo experimental. Os animais expostos ao CEM desde a gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias de vida, apresentaram à microscopia óptica lesões patológicas em 50 % dos animais. Dentre estes, 16,66 % apresentaram lesões degenerativas mais graves como descamação do epitélio seminífero, células germinativas no lume tubular, células germinativas apoptóticas, bem como vacuolização em células de Sertoli. Nestes animais houve o comprometimento do processo espermatogênico normal.

Nos animais expostos ao CEM desde a gestação até 90 dias pós-natal, as análises histopatológicas também revelaram que em 50 % dos animais apresentaram alterações patológicas detectáveis à microscopia óptica. Deste grupo, 25 % do total de animais apresentaram lesões no epitélio seminífero compatíveis com degeneração testicular. Nestes animais foram observadas células germinativas em processo de descamação, grande quantidade de células descamadas no lume tubular, edemas de cauda em espermátides alongadas, aumento do espaço intertubular, espessamento da túnica própria dos túbulos seminíferos e vacuolização em células de Sertoli. Também foi observada grande quantidade de células germinativas necróticas, em processo necrótico com núcleos picnóticos e em processo de apoptose. Com base nestes resultados, pode-se considerar que nestes os animais houve lesões patológicas que resultaram no comprometimento do processo espermatogênico normal.

Em 8,33 % dos animais expostos ao CEM até os 90 dias foram observados túbulos seminíferos com uma grande redução no epitélio, ocasionada pela grande diminuição na quantidade de células germinativas, inclusive das linhagens próximas ao compartimento basal. Alguns destes túbulos seminíferos apresentaram uma drástica redução na quantidade de células germinativas, havendo apenas a presença de células de Sertoli e algumas espermatogônias na base do epitélio seminífero. Nestes animais também foi

observada a presença de vacuolizações em células germinativas e a presença de células sinciciais gigantes ou células multinucleadas gigantes. Estas células são um achado patológico comum nos testículos e se formam em virtude da desestabilização do citoesqueleto que mantém a integridade das pontes entre as células germinativas (RUSSEL et al., 1990). As lesões patológicas observados nos testículos de 16,66 % dos animais foram tão graves que resultaram na ausência da formação de espermatozóides, pois não foram observados espermatozóides espermiados no lume dos túbulos seminíferos. Ramadan et al. (2002) também observou em camundongos expostos a campos magnéticos de 20 mT lesões tão graves que não foi observada espermatogênese nos túbulos seminíferos.

De Vita et al. (1995) observaram em seu estudo que a população de espermatogônias diferenciadas parecem ser as células alvo da atuação de campos magnéticos de 50 Hz e 1,7 mT, resultando na redução da quantidade de espermátides alongadas. Esta observação realizada pelos autores corrobora com os achados da presente pesquisa, onde os CEM podem atuar provocando alterações nas células germinativas mais diferenciadas, e atuar em menor escala nas espermatogônias indiferenciadas. De Vita et al. (1995) também sugeriu uma possível diferença na sensibilidade dos diferentes tipos celulares da espermatogênese à agentes físicos, incluindo as radiações não-ionizantes, dentre estas se encontram os CEM de baixa frequência.

Geralmente as espermatogônias se diferenciam irreversivelmente. Estas continuam a se diferenciar para se tornarem espermatozóides, e a única opção para estas células que não irão se tornar espermatozóides é degenerar-se (RUSSELL et al., 1990). Vem sendo relatado na literatura que campos elétricos e magnéticos podem causar efeitos genotóxicos e citotóxicos em diversos tipos celulares (DE VITA et al., 1995; IVANCSITS et al., 2005) e indução de apoptose de células germinativas (LEE et al., 2004; KIM et al., 2009). Portanto, os CEM na dose de 60Hz e 1mT podem causar injúrias nas células germinativas e nas células de Sertoli acarretando nas lesões observadas no presente trabalho.

Vem sendo 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 e SILVA,

2002; LAI e SINGH, 2004; IVANCSITS et al., 2005; NIKOLOVA et al., 2005; LUO et al., 2006). Possivelmente, estes CEM aumentam a susceptibilidade a danos no DNA (WOLF et al., 2005). Lee et al. (2004) e Kim et al. (2009) observaram aumento da incidência de apoptose nas células germinativas.

Esta via de destruição celular parece atuar como mecanismo regulatório para reduzir possíveis efeitos tóxicos dos CEM nas células da linhagem espermatogênica (De Vita et al., 1995). Os resultados observados no presente trabalho corroboram o fato de que a apoptose decorre em consequência dos possíveis efeitos genotóxicos, pois foi observado em diversos animais expostos ao CEM células germinativas apoptóticas.

Vale ressaltar que os animais que apresentaram processo de degeneração testicular mais grave não foram utilizados para os cálculos referentes à histometria quantitativa dos parâmetros espermatogênicos. As lesões patológicas observadas nestes animais inviabilizaram as medições de diâmetro tubular e altura de epitélio, bem como as contagens dos tipos celulares em associação com o estágio VII dos túbulos seminíferos. Este fato pode ser considerado um dos principais responsáveis pela redução observada nos parâmetros histomorfométricos não se apresentarem estatisticamente significativa, pois os animais com maior grau de alteração na espermatogênese não puderam ser utilizados para estas aferições histométricas.

Os valores da produção espermática diária (PED) diminuíram 10,31% nos animais expostos ao CEM até os 90 dias pós-natal. Esta diminuição não foi considerada estatisticamente significativa devido à elevada dispersão das médias (desvio padrão) no grupo exposto ao CEM. Esta elevada dispersão entre as médias ocorreu em virtude das diferentes repostas individuais dentro do mesmo grupo experimental. Este também pode ser considerado outro fator que culminou na diferença não estatística dos resultados histométricos, pois o elevado desvio padrão observado diluiu a diferença entre as médias dos animais dos grupos experimentais. Esta observação corrobora com os achados histopatológicos, sugerindo que ocorreram diferentes repostas individuais dentro do mesmo grupo experimental, estes resultados sugerem que a susceptibilidade ao CEM parece ser indivíduo-específica. Al-Akhars et al. (2001) citaram que a linhagem dos animais utilizados no estudo pode ser uma importante variável nas pesquisas bioeletromagnéticas, bem como observaram que alguns animais apresentavam alterações

mais pronunciadas quando expostos a campos magnéticos. Estes fatos sugerem a hipótese de que alguns animais ou linhagens específicas tenham maior susceptibilidade a campos elétricos e magnéticos.

No presente trabalho, os CEM de baixa frequência de 60 Hz e 1 mT de densidade de fluxo magnético desencadearam o processo de degeneração testicular de menor intensidade nos animais expostos ao CEM desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias, e de maior intensidade nos animais expostos desde o 13º dia de gestação até a fase adulta, aos 90 dias de vida. A degeneração testicular pode ser definida como um processo que causa a deterioração da estrutura do testículo, com conseqüente perda da função testicular. Esta pode possuir diversos fatores etiológicos, tais como o calor, trauma testicular, exposição ao frio, toxinas, isquemia, deficiências nutricionais, administração exógena de andrógenos, infecções, doenças auto-imunes, obstruções do fluxo espermático, neoplasias e radiações (TURNER, 2007). Entretanto, a degeneração testicular vem sendo relacionada com as radiações de frequências mais elevadas do espectro eletromagnético. Segundo Jensen et al. (2006), o testículo é altamente sensível a radiação ionizante. Doses de 0,15 Gy pode temporariamente reduzir a quantidade de espermatozoides e a exposição a 2 Gy pode resultar em azoospermia por tempo prolongado ou permanentemente (ausência na produção de espermatozoides). Alterações no processo espermatogênico em virtude da exposição a radiações de frequências menores também vem sendo relatadas. Subbotina et al. (2006) observaram que radiações eletromagnéticas de frequência extremamente alta (30-300 GHz) e intensidade  $< 0.3 \text{ mW/cm}^2$  irradiadas em ratos em doses fracionadas de 10 aplicações de 3 horas e 15 minutos resultou em alterações patológicas, que culminaram na degeneração e polimorfismo de espermatozoides. Segundo Agarwal et al. (2008) o tempo de utilização diário de telefones celulares que operam na frequência de 400 a 2000 MHz pode diminuir a qualidade do sêmen de homens que realizaram exame de infertilidade, devido a alterações na contagem, motilidade e viabilidade dos espermatozoides, bem como na morfologia espermática normal. Esta diminuição foi proporcional ao tempo de utilização dos telefones celulares. Yan et al. (2007) observou que ratos expostos a radiações de telefones celulares (1,9 GHz) posicionados a 1 cm da cabeça dos animais, em duas aplicações diárias de 3 horas com intervalo de 30 minutos, apresentaram aumento da

incidência de espermatozóides mortos e aglomerados de espermatozóides anormais. Em estudo *in-vitro*, Erogul et al. (2006) observou que radiações eletromagnéticas de telefones celulares com 900 MHz a uma distância de 10 cm de amostras de espermatozóides humanos irradiadas por 5 minutos alterou a motilidade progressiva e aumentou a incidência de espermatozóides sem movimento. A motilidade espermática é um dos principais métodos para se avaliar danos nos testículos (RAMADAN et al., 2002).

Pesquisas vêm demonstrando que campos elétricos e magnéticos de baixa frequência também podem interagir com a espermatogênese. Al-Akhars et al. (2001) observaram uma redução na fertilidade de ratos adultos expostos a campos magnéticos de 50 Hz e 25  $\mu$ T durante 90 dias, também houve redução na quantidade de fêmeas prenhes acasaladas com machos expostos ao campo, bem como aumento no número de reabsorções embrionárias e redução na quantidade de implantações embrionárias e fetos sobreviventes por gestação. De Vita et al. (1995) demonstrou em seu estudo que camundongos expostos em dose única de 4 horas a campos magnéticos de 50 Hz e 1 mT de densidade de fluxo podem resultar em efeito citotóxico ou citoestático em espermatogônias diferenciadas, além de reduzir estatisticamente a quantidade de espermátides alongadas no epitélio seminífero.

Segundo Lee et al. (2004) a exposição a CEM de baixa frequência (60 Hz e 0,5 mT) 24 horas por dia em camundongos adultos durante oito semanas aumentou a incidência de morte das células germinativas por apoptose, reduziu o escore da biópsia testicular, bem como a análise quantitativa dos túbulos seminíferos demonstraram uma diminuição significativa na espermatogênese. Kim et al. (2009) observou 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.

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 significativa na contagem, motilidade e produção diária de espermatozóides, além de alterações na largura dos túbulos seminíferos, também foi constatada a ausência de espermatogônias e espermatogênese nos túbulos seminíferos. Ramadan et al. (2002) também observaram a redução na atividade da enzima LDH-X, no

testículo esta enzima apenas pode ser detectada nas células germinativas mais diferenciadas e pode ser utilizada como marcador da maturação de células germinativas.

Aydin et al. (2007) estudou os efeitos de CEM de 50 Hz e 48,21 mG gerados por linhas de alta tensão de 170 kV irradiados continuamente em ratos. Os animais foram posicionados a 7,5 m das linhas de transmissão de energia durante 1, 2 e 3 meses. Estes autores observaram redução na atividade da catalase testicular e corporal. A biópsia testicular revelou menores escores nos animais expostos aos CEM, o exame histopatológico do testículo demonstrou que houve uma desaceleração da espermatogênese e degeneração de células germinativas com relação direta com o tempo de exposição ao CEM.

No presente trabalho foi observado degeneração testicular em 16,66 % dos animais expostos ao CEM desde a gestação até 21 dias pós-natal e analisados aos 90 dias. Também foi observado que 25 % dos animais expostos ao CEM desde a gestação até os 90 dias pós-natal apresentaram degeneração testicular mais intensa. Os animais que foram expostos ao CEM e não apresentaram alterações podem ter apresentado esta resposta em virtude de dois mecanismos. No primeiro, os animais se adaptaram ao estímulo causado pelo CEM, parando de responder, e retornando à condição fisiológica normal; no segundo mecanismo, o organismo pode ter deflagrado uma resposta compensatória que amenizou os efeitos dos CEM na espermatogênese.

De acordo com Kwee e Rasmark (1998) a exposição à radiação de baixa frequência por longos períodos de tempo, além do necessário para o efeito máximo, não resulta em efeito mais pronunciado na proliferação celular. Os autores explicam estes eventos como mecanismo de adaptação, já que foram observadas alterações na proliferação de células expostas a CEM de 50 Hz durante 20 a 45 minutos e não houve nenhum efeito nestas células quando expostas por horas, dias ou semanas.

Os animais que foram expostos ao CEM até os 21 dias, porém analisados aos 90 dias, apresentaram lesões menos graves no epitélio seminífero. Estes achados também podem sugerir duas hipóteses. Na primeira, os túbulos seminíferos podem se recuperar das injúrias causadas pelos CEM, e quando se interrompe a exposição ao CEM, os danos causados podem ser parcialmente reversíveis; na segunda, os CEM possuem um efeito

acumulativo, e a exposição até os 21 dias ainda não tenha sido suficiente para causar lesões tão graves.

Foi observado no presente trabalho que os CEM de 60 Hz e 1mT podem atuar interferindo nos animais na fase inicial de suas vidas, pois neste período houve alterações no desenvolvimento ponderal e nos parâmetros histomorfométricos dos componentes testiculares. Os animais quando continuam a ser irradiados com este CEM também continuam a reduzir o seu desenvolvimento ponderal e o diâmetro dos túbulos seminíferos, bem como deflagrar o processo de degeneração testicular nos indivíduos susceptíveis (25 % dos animais). Porém, no grupo de animais que foram expostos ao CEM até os 21 dias pós-natal, parando a exposição e analisando os animais aos 90 dias, foi observado que o peso corporal dos animais continuou alterado até a 4ª semana e posteriormente houve uma recuperação, retornando à condição normal.

As lesões observadas no epitélio seminífero foram mais graves nos animais expostos a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal. Estes fatos nos fornecem indícios de que os CEM causam alterações nas células somáticas e germinativas dos túbulos seminíferos com efeitos aparentemente irreversíveis, uma vez que animais expostos no período crítico do desenvolvimento testicular (13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal) ainda apresentaram lesões compatíveis com degeneração testicular na idade adulta. Acreditamos que a exposição por longos períodos pode causar alterações possivelmente irreversíveis que venham a comprometer o processo espermatogênico, principalmente se a exposição ocorrer num período crítico do desenvolvimento testicular, quando as células de Sertoli e espermatogônias estão em proliferação (SILVA JUNIOR et al., 2006), como foi o protocolo deste trabalho. Por outro lado, Al-Akhras et al. (2001) demonstraram que ratos machos adultos após 90 dias de exposição a campos magnéticos de 50 Hz e 25  $\mu$ T apresentaram fertilidade reduzida, pois a quantidade de fêmeas prenhes quando acasaladas com estes machos foi reduzida. Aos 45 dias após a remoção do campo magnético, as fêmeas ainda apresentaram uma taxa menor de prenhes, porém, aos 90 dias após a remoção do campo a quantidade de fêmeas prenhes não foi mais estatisticamente reduzida, sugerindo um efeito parcialmente reversível dos campos magnéticos. Porém, estes autores irradiaram os animais apenas na fase adulta, enquanto o presente trabalho irradiou os animais durante o período crítico do desenvolvimento testicular (13º dia de

gestação até o 21º dia pós-natal), onde ocorre proliferação, maturação e a parada na proliferação das células de Sertoli (ORTH, 1993; SILVA JUNIOR et al., 2006). Este fato pode ter deflagrado lesões que não foram totalmente reversíveis mesmo após a retirada do estímulo do CEM. A duração do ciclo do epitélio seminífero em ratos é de aproximadamente 58 dias (FRANÇA et al., 2005). Kim et al. (2009) observou que a linhagem de células germinativas mais afetadas por apoptose induzida por campos magnéticos de 60 Hz e 14  $\mu$ T foram as espermatogônias. Este fato corrobora com o indicativo de que os CEM podem causar lesões irreversíveis, pois mesmo após a passagem de vários ciclos do epitélio seminífero, as lesões causadas nas espermatogônias podem ser permanentes, prejudicando o processo de diferenciação do restante das linhagens de células germinativas provenientes destas espermatogônias.

Diversos estudos não observaram efeitos de campos elétricos e magnéticos na espermatogênese e na fertilidade de machos. Chung et al. (2005) não encontrou efeitos deletérios na espermatogênese e fertilidade de ratos adultos expostos a CEM de 60 Hz e intensidades de 5, 83.3 e 500 mT durante o período de 21 horas por dia do 6º dia de gestação até os 21 dias de idade, porém, apesar da alta dose do campo utilizado e da exposição realizada da gestação até os 21 dias pós natal, os autores realizaram a exposição em dose única de 21 horas no dia. O efeito mais pronunciado dos campos elétricos e magnéticos parece ocorrer com exposições intermitentes em doses fracionadas da radiação.

A exposição de camundongos continuamente ou por 1 hora a campos magnéticos de 0,5 a 0,7 T provenientes de um ímã não demonstraram alterações no peso corporal, testicular e epididimário, bem como na avaliação histopatológica dos testículos e epidídimos nos dias 1, 5, 15 e 35 pós-natal (TABLADO et al., 2000). Os autores citados anteriormente realizaram uma exposição contínua que pode ter resultado na adaptação dos animais. Na presente pesquisa, também não se observou alterações patológicas nos animais pré-púberes (21 dias), porém, foram observadas alterações quantitativas na histometria dos componentes testiculares, as quais dificilmente seriam notadas apenas através de avaliação qualitativa histopatológica.

RYAN et al. (1999) realizou um estudo de multigerações avaliando a toxicidade reprodutiva de campos magnéticos de 60 Hz e 0,02 G, 2 G e 10 G quando expostos

continuamente e 10 G irradiados intermitentemente (1 hora ligado e 1 hora desligado), estes autores não observaram alterações nas gerações  $F_0$ ,  $F_1$  e  $F_2$  em relação a capacidade reprodutiva, desenvolvimento dos fetos e dos animais neonatos. O campo utilizado neste trabalho apesar de possuir 60 Hz, tem uma densidade de fluxo magnético baixa (0,02 G a 10 G), os autores citam que estes campos possuem maior intensidade que os rotineiramente observados no ambiente, porém, é muito inferior a recomendação de exposição máxima realizada pela International Radiation Protection Association (IRPA), que é de 0,5 mT por 24 horas ao dia ou de 5 mT de densidade de fluxo para exposições por 2 horas ou menos (SLINEY e PATTERSON, 2007).

A exposição de camundongos a campos magnéticos de 60 Hz e 2 mT durante 72 horas ou 10 dias (8 horas por dia) não induziu aberrações cromossômicas e não alterou a morfologia espermática (HEREDIA-ROJAS et al., 2004). Este estudo, assim como os que foram citados anteriormente, realizou uma exposição em doses contínuas, durante longos períodos diários e por curto período de tempo ao longo da vida do animal. Estes fatores parecem resultar na adaptação dos animais ao estímulo causado por campos elétricos e magnéticos, bem como curtos períodos de exposição ao longo da vida do animal parecem não ser suficientes para provocar efeitos adversos.

Com base no que foi discutido anteriormente, pode-se dizer que as referências existentes abordando os possíveis efeitos de campos elétricos e magnéticos na espermatogênese ainda são contraditórias. Porém, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram para a hipótese de que os campos elétricos e magnéticos podem interagir com os componentes testiculares, alterando o processo espermatogênico. Vale ressaltar que se fazem necessários mais estudos visando analisar a extensão e os possíveis mecanismos de ação destes campos sobre a espermatogênese, principalmente enfocando exposições por longos períodos de tempo e em doses fracionadas (intermitentes).

### **5.3. Histometria Computacional**

Os resultados demonstraram que tanto a área como o perímetro dos túbulos seminíferos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais controle e aqueles que apresentaram padrões compatíveis com a degeneração testicular.

Quando aferimos o volume ocupado pelos túbulos seminíferos de todos os animais expostos ao CEM através das fórmulas da histometria quantitativa, não observamos diferença estatisticamente significativa. Porém, quando medimos a área dos túbulos seminíferos apenas dos animais susceptíveis ao CEM (que apresentaram degeneração testicular na histopatologia), constatamos uma redução estatisticamente significativa. Este fato em associação com os achados da histopatologia corroboram para o indicativo de que os animais podem possuir uma susceptibilidade / sensibilidade individual para os CEM. Em virtude desta susceptibilidade, os CEM podem interagir com os componentes testiculares e causar a redução da área e perímetro dos túbulos seminíferos, o que é considerado um indicativo de alteração do processo espermatogênico (FRANÇA e RUSSELL et al., 1998). Vale ressaltar que não foi possível encontrar os valores correspondentes à área de epitélio seminífero ou do perímetro interno do túbulo seminífero, pois diversos túbulos apresentavam descamação das células germinativas muito pronunciadas, não havendo como delimitar o epitélio seminífero.

#### **5.4. Dosagens da Testosterona Plasmática**

As dosagens realizadas para a testosterona plasmática foram medidas em nMol/L, ng/mL e pela relação entre concentração e volume (CV%) do hormônio. Em nenhuma destas aferições os níveis circulantes da testosterona demonstrou-se estatisticamente alterado em qualquer dos grupos experimentais.

As quantidades circulantes de testosterona plasmática podem ser consideradas em condições normais, diretamente correlacionada com a quantidade de células de Leydig nos testículos, pois a quantidade e o tamanho das células de Leydig, bem como o volume do retículo endoplasmático são os melhores indicativos da capacidade destas células produzirem testosterona (FRANÇA et al., 2005). Os resultados apresentados na presente pesquisa, revelaram que não houve diferença estatística em relação aos animais expostos ao CEM e os não expostos, tanto em relação às dosagens de testosterona, como para o volume de células de Leydig nos testículos. Portanto, os resultados observados no presente trabalho para a testosterona plasmática estão em acordo com os obtidos para

volume testicular de células de Leydig, e não estão alterados em virtude da exposição ao CEM.

FORGÁCS et al. (2004) em seu estudo irradiou camundongos com campos magnéticos de 50 Hz e 100  $\mu$ T por 23,5 horas / dia durante 14 dias, após este período, células de Leydig foram isoladas do testículo e cultivadas em meio de cultura por 48 horas. Estes autores não observaram alterações nos níveis basais de testosterona nas células em cultura e nos níveis séricos no sangue dos animais. Porém, foi observado o aumento da produção de testosterona pelas células de Leydig em cultura quando estimuladas pela Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), que é um análogo do LH. Este estudo corrobora com os resultados da presente pesquisa, onde os CEM não alteraram os níveis séricos de testosterona no animais. Porém, faz-se uma ressalva sobre os efeitos de campos elétricos e magnéticos nas células de Leydig e na sua capacidade de produção de esteróides em situações hormonais adversas.

Os níveis plasmáticos de testosterona não alteraram, sugerindo a ação do CEM no epitélio seminífero é direta, não havendo repercussões do CEM sobre atividade endócrina testicular, pelo menos com relação à testosterona. Isto aponta para uma ação local do CEM sob as células germinativas, pois os parâmetros referentes às células de Sertoli também não sofreram alteração. Portanto, o mecanismo de ação do CEM pode ocorrer por atuação direta na membrana celular, pois esta é apontada como sendo o principal sítio de interação da célula com o CEM, tendo conseqüências no metabolismo celular e outras respostas intracelulares (CLEARY, 1995).

### **5.5. Integridade de DNA e Morfologia Espermática**

Foi estatisticamente maior a freqüência de defeitos espermáticos nos animais expostos ao CEM em relação aos animais controle e controle negativo. Foi observado uma prevalência de defeitos do tipo menor, principalmente gota citoplasmática distal, pseudo-gota, cauda quebrada, cauda enrolada e cabeça isolada.

A quantidade de espermatozoides anormais foi 64% maior nos animais expostos por 90 dias em relação ao grupo controle negativo e 63% maior em relação ao grupo controle. Também foi observado um aumento de 39% na quantidade de espermatozoides

defeituosos nos animais expostos por 90 dias em relação aqueles expostos por 21 dias. O grupo exposto por 21 dias apresentou aumento de 41% na quantidade de espermatozóides defeituosos em relação ao controle negativo e 38% em relação ao grupo controle.

Estes defeitos espermáticos podem ocorrer devido a alterações no testículo, epidídimo ou ainda manipulação em laboratório, 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.

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 espermatozóides morfologicamente anormais. Pode-se observar ainda uma relação dose resposta dos espermatozóides anormais em virtude do período de tempo de exposição ao CEM.

Também foi realizada correlação entre a quantidade de patologias espermáticas e o tempo de exposição ao CEM. Esta correlação se demonstrou linear e positiva ( $y = 0,0795x + 4,9902 / R^2 = 0,97$ ) entre o tempo de exposição ao CEM e o percentual de patologias observadas.

A análise da morfologia espermática sob uma condição crônica de exposição ao CEM, por períodos de tempo mais longos, também deve ser avaliada futuramente.

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 8 hs/dia durante 10 dias. Tablado et al. (1998) verificou o efeito de campo magnético de baixa frequência e com intensidade de 0,7 T em ratos, durante 35 dias (um grupo irradiado somente 1 h / dia e outro durante 24 hs / dia) sob a morfologia e morfometria espermática. Estes autores observaram diferença estatística significativa apenas na diminuição da angulação da cabeça dos espermatozóides, o que sugere a possibilidade da interação deste CEM com o processo espermatogênico. Contudo, enfatizaram que estas alterações teriam pouca importância na fertilidade. Segundo Aydin et al. (2007), CEM de 50 Hz e 48,21 mG gerados por linhas de alta tensão

de 170 kV irradiados continuamente em ratos posicionados a 7,5 m destas linhas de transmissão de energia durante 1, 2 e 3 meses não alteraram a concentração, motilidade e morfologia de espermatozóides coletados no epidídimo.

Nossos resultados mostram uma maior prevalência nas alterações de peça intermediária e cauda, em especial de gota citoplasmática distal, o que sugere possíveis alterações no processo de maturação dos espermatozóides no epidídimo. Nos 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, período em que os animais estão definindo as suas trajetórias metabólicas em prol da maturação de seus tecidos e sistemas orgânicos. A exposição realizada no presente estudo foi mais prolongada, este fato em adição ao diferente valor de intensidade do campo utilizado pode justificar a diferença entre os resultados obtidos.

Diversos genes estão envolvidos no processo de formação dos espermatozóides 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 espermatozóides originados da cauda do epidídimo de animais expostos a CEM de 60 Hz e 1mT. Os efeitos deletérios dos CEM em mamíferos ainda são contraditórios (LUO et al., 2006), e as pesquisas observando se os CEM de baixa frequência podem atuar causando alterações mutagênicas, também ainda são contraditórias (MCCANN et al., 1998). Nossos resultados não mostram diferenças estatisticamente significativas em relação à integridade de DNA dos espermatozóides, quando expostos ou não ao CEM. No entanto, 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 e SILVA, 2002; LAI e SINGH, 2004; IVANCSITS et al., 2005; NIKOLOVA et al., 2005; LUO et al., 2006). Possivelmente, estes CEM atuam influenciando a susceptibilidade a danos no DNA (WOLF et al., 2005). Por outro lado, diversos trabalhos não observaram tais efeitos genotóxicos em animais submetidos a

CEM (MCCANN et al., 1998). Na maioria dos estudos desenvolvidos encontram-se ressalvas sobre o real significado biológico destes resultados, bem como da necessidade de se investigar futuramente estas áreas de pesquisa.

Ivancsits (2005) observou que os efeitos genotóxicos causados pelos CEM podem variar em virtude do tipo celular observado. Por exemplo, foram observados efeitos genotóxicos em fibroblastos humanos, melanócitos humanos e células da granulosa de ratos, porém, nenhuma alteração genotóxica foi observada em linfócitos humanos, monócitos humanos e células musculares esqueléticas humanas. Não observamos neste trabalho alterações significativas na integridade de DNA dos espermatozóides 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, pode-se ainda sugerir que as respostas celulares podem ser diferentes em virtude da variação das situações *in-vivo* e *in-vitro*, pois os animais quando em vida utilizam de diversos mecanismos de regulação e adaptação a variados estímulos que venham a ser nocivos ao seu material genético. Em virtude do que foi discutido anteriormente, e em acordo com Estécio & Silva (2002), faz-se necessário mais pesquisas com diferentes técnicas que visem investigar a atuação genotóxica dos CEM.

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

Possivelmente, os defeitos espermáticos ocorreram em virtude de alterações nos testículos ou epidídimos, quando estes estiveram sob a influência do CEM. Vale ressaltar que sendo a porcentagem de espermatozóides defeituosos considerada não excessiva, concomitantemente ao fato de que estes defeitos espermáticos são todos dos tipos menores, a capacidade reprodutiva destes animais parece não estar comprometida. Porém,

correlacionando o aumento na ocorrência de patologias espermáticas, com os achados compatíveis com a degeneração testicular da histopatologia, este pode ser um indicativo da ocorrência de um alto índice de apoptose e reabsorção de células germinativas ou espermatozóides.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao correlacionarmos o aumento na ocorrência de patologias espermáticas, com os achados compatíveis com a degeneração testicular da histopatologia, pode-se sugerir um indicativo da ocorrência de um alto índice de apoptose e reabsorção de células germinativas ou espermatozóides. Este aumento na quantidade de células germinativas em apoptose parece representar um mecanismo de eliminação de células inviáveis em decorrência da exposição ao CEM, visando evitar a produção de espermatozóides defeituosos e conseqüentemente alterações em seus descendentes. Este mecanismo resultaria em uma baixa concentração espermática, o que pode ser considerado um indicativo de baixa fertilidade (GUZICK et al., 2001). Porém, quando se trata de estudos reprodutivos em ratos, a coleta dos espermatozóides geralmente é realizada através da punção de cauda do epidídimo, pois a eletroejaculação em pequenos roedores, apesar de ser um procedimento não-invasivo, necessita de equipamento específico e ocasiona a formação de coágulos no sêmen (TECIRLIOĞLU et al., 2002), não apresentando bons resultados acerca da concentração espermática.

Os resultados observados também sugerem uma atuação acumulativa do CEM sob o testículo, pois houve uma correlação direta entre os CEM, o tempo de exposição e a quantidade de patologias espermáticas. Também foi observada esta correlação nas alterações patológicas que acometeram os testículos, pois quanto maior o tempo de exposição aos CEM, maior a gravidade dos processos patológicos observados.

As análises histomorfométricas que resultaram na diminuição, porém não estatística da produção espermática parecem representar uma ação inicial do CEM sob os componentes testiculares. Os estímulos intermitentes causados pelos CEM, aplicados em doses fracionadas, parece ter resultado mais pronunciado que a aplicação constante ao CEM (RAMADAN et al., 2002). A ação intermitente dos CEM sob as células do testículo desde a gestação até a maturidade sexual parece desencadear o processo de degeneração e redução da função testicular.

Diversos estudos, utilizando animais como modelo experimental, vêm tentando esclarecer os possíveis efeitos tóxicos de campos elétricos e magnéticos sobre o sistema reprodutor, porém, os resultados encontrados ainda não entraram em consenso (AL-AKHRAS et al., 2001).

A literatura descreve que efeitos contraditórios são observados não apenas no

sistema reprodutor masculino, mas também em outros sistemas (ver introdução). Portanto, nos estudos realizados nos últimos anos foi possível observar variações em relação à metodologia utilizada para a exposição aos campos elétricos e magnéticos, tanto na frequência e densidade de fluxo magnético, como no tempo de exposição. Também foram observadas nos estudos analisados variações nas condições *in-vivo* e *in-vitro*, além dos modelos e espécies utilizadas. Este fato conduz a uma grande dificuldade para um maior entendimento acerca dos efeitos causados pelos CEM nos sistemas biológicos, o chamado efeito “janela”, que consiste em diferentes respostas do organismo em função da variação da metodologia utilizada, agravada pela variação do tempo de exposição, que pode resultar em efeitos contraditórios.

Sabe-se que o campo estático magnético da terra é de aproximadamente 50  $\mu\text{T}$ , e que uma densidade de fluxo de aproximadamente 10  $\mu\text{T}$  pode ocorrer próximo a equipamentos elétricos, bem como em algumas ocupações se pode ter uma exposição ambiental de 10 a 100 mT (SLINEY e PATTERSON, 2007), portanto, torna-se difícil especificar-se o tipo e a quantidade de radiação a qual cada indivíduo da sociedade encontra-se exposto, bem como correlacionar os resultados experimentais com estas informações.

Considerando que os CEM podem interagir com os organismos biológicos, e em acordo com o descrito em Kheifets et al. (2005), o presente trabalho recomenda a realização de pesquisas adicionais e o desenvolvimento de políticas preventivas em virtude dos resultados sobre os efeitos adversos de campos elétricos e magnéticos disponíveis até o momento se mostrarem contraditórios.

## **7. CONCLUSÕES**

Com base no que foi discutido anteriormente, conclui-se que:

1. Os CEM de 60Hz de frequência e 1mT de densidade de fluxo magnético influenciam no desenvolvimento ponderal dos animais, resultando em um menor ganho de massa corporal.
2. Os CEM de 60Hz e 1mT induziu a degeneração testicular, sendo a intensidade do processo apoptótico variável de indivíduo para indivíduo dentro do mesmo grupo experimental. Este aumento na quantidade de células germinativas em apoptose parece representar um mecanismo eliminação de células inviáveis em decorrência da exposição ao CEM.
3. A histometria quantitativa indicou uma tendência de diminuição da produção espermática e elevada dispersão entre as médias nos animais expostos ao CEM de 60 Hz e 1mT, porém, estas análises foram inviáveis nos animais que apresentaram degeneração testicular mais grave.
4. Os efeitos dos CEM de 60 Hz e 1 mT no desenvolvimento ponderal parecem ser parcialmente reversíveis, havendo a recuperação do organismo animal após cessar-se a exposição ao CEM.
5. Os CEM causam alterações nas células somáticas e germinativas dos túbulos seminíferos com prováveis efeitos irreversíveis, uma vez que, animais expostos no período de crítico do desenvolvimento testicular ainda apresentaram lesões compatíveis com degeneração testicular na idade adulta.
6. Os níveis plasmáticos de testosterona não sofreram influencia do CEM de 60Hz e 1mT, sugerindo uma ação local do CEM sob as células germinativas.
7. As análises da integridade de DNA dos espermatozóides não revelaram alterações de desnaturação na cromatina, que pode ter ocorrido devido à deflagração de um mecanismo compensatório de apoptose nas células germinativas ainda no testículo.
8. A morfologia espermática apresentou redução significativa nos animais expostos ao CEM de 60Hz e 1mT, com maior prevalência de defeitos menores do tipo gota citoplasmática distal, pseudo-gota, cauda quebrada, cauda enrolada e cabeça isolada.

9. Os campos elétricos e magnéticos quando irradiados em doses fracionadas (intermitentemente) e durante longos períodos da vida do animal parecem ocasionar efeitos adversos mais pronunciados nos sistemas biológicos.

## **8. TABELAS**

**Tabela 1.** Desenvolvimento ponderal dos animais expostos ao CEM de baixa frequência (60 Hz) desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e seus respectivos controles (Média ± desvio padrão).

<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Controles (n=12)</b>	<b>Expostos (n=17)</b>	<b>t / p</b>
1	6.78 ± 0.57	6.12 ± 0.71	t=2.68 / p=0.0124 *
2	8.35 ± 0.82	7.22 ± 0.92	t=3.35 / p=0.0024 *
3	9.72 ± 0.73	8.41 ± 1.14	t=3.48 / p=0.0017 *
4	11.80 ± 1.31	10.09 ± 1.03	t=3.93 / 0.0005 *
5	14.02 ± 1.17	11.90 ± 1.22	t=4.67 / p<0.0001 *
6	16.46 ± 1.73	13.78 ± 1.44	t=4.53 / p=0.0001 *
7	18.93 ± 1.61	15.67 ± 1.40	t=5.80 / p<0.0001 *
8	21.48 ± 1.23	17.41 ± 1.57	t=7.47 / p<0.0001 *
9	23.82 ± 1.24	19.62 ± 1.95	t=6.53 / p<0.0001 *
10	26.87 ± 1.22	21.80 ± 2.02	t=7.72 / p<0.0001 *
11	29.29 ± 1.11	23.96 ± 2.00	t=8.32 / p<0.0001 *
12	31.65 ± 1.16	26.21 ± 2.27	t=7.58 / p<0.0001 *
13	34.15 ± 1.32	28.40 ± 2.47	t=7.32 / p<0.0001 *
14	36.72 ± 1.63	30.64 ± 2.55	t=7.24 / p<0.0001 *
15	39.28 ± 1.78	32.90 ± 2.45	t=7.67 / p<0.0001 *
16	41.92 ± 2.13	35.21 ± 2.87	t=6.84 / p<0.0001 *
17	44.48 ± 2.16	37.53 ± 3.19	t=6.54 / p<0.0001 *
18	47.34 ± 2.42	39.92 ± 3.40	t=6.46 / p<0.0001 *
19	50.53 ± 2.24	42.37 ± 3.62	t=6.90 / p<0.0001 *
20	53.80 ± 2.62	45.62 ± 3.59	t=8.43 / p<0.0001 *
21	55.82 ± 3.33	49.13 ± 3.59	t=6.13 / p<0.0001 *

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 2.** Peso em gramas de testículos, epidídimos, adrenais, rins, fígado, baço e timo de ratos Wistar aos 21 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias de idade (Média ± desvio padrão).

<b>Peso (g)</b>	<b>Controle (n=12)</b>	<b>Exposto (n=17)</b>	<b>t / p</b>
<b>Testículo Direito</b>	0.129 ± 0.010	0.098 ± 0.013	t=6.72 / p<0.0001 *
<b>Testículo Esquerdo</b>	0.129 ± 0.011	0.097 ± 0.015	t=6.05 / p<0.0001 *
<b>Epidídimo Direito</b>	0.019 ± 0.005	0.019 ± 0.004	t=0.20 / p=0.8355
<b>Epidídimo Esquerdo</b>	0.032 ± 0.031	0.022 ± 0.005	t=1.30 / p=0.2040
<b>Rim Direito</b>	0.353 ± 0.050	0.321 ± 0.047	t=1.75 / p=0.0901
<b>Rim Esquerdo</b>	0.357 ± 0.040	0.314 ± 0.045	t=2.66 / p=0.0129 *
<b>Fígado</b>	2.372 ± 0.792	2.106 ± 0.444	t=1.157 / p=0.2572
<b>Baço</b>	0.350 ± 0.060	0.233 ± 0.033	t=6.63 / p<0.0001 *
<b>Timo</b>	0.233 ± 0.044	0.202 ± 0.032	t=2.19 / p=0.0372 *

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 3.** Índices relativo dos pesos dos órgãos em função do peso corporal em ratos Wistar aos 21 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias de idade (Média ± desvio padrão).

<b>Peso dos órgãos / Peso corporal x 100</b>	<b>Controle (n=12)</b>	<b>Exposto (n=17)</b>	<b>t / p</b>
<b>Testículo Direito</b>	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.02	t=2.87 / p=0.0078 *
<b>Testículo Esquerdo</b>	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.02	t=2.68 / p= 0.0122 *
<b>Epididimo Direito</b>	0.040 ± 0.008	0.036 ± 0.009	t=1.23 / p= 0.2270
<b>Epididimo Esquerdo</b>	0.056 ± 0.057	0.045 ± 0.010	t=0.72 / p= 0.4757
<b>Rim Direito</b>	0.62 ± 0.06	0.65 ± 0.07	t=1.09 / p= 0.2844
<b>Rim Esquerdo</b>	0.64 ± 0.08	0.62 ± 0.07	t=0.59 / p= 0.5588
<b>Fígado</b>	4.46 ± 0.83	4.26 ± 0.71	t=0.70 / p= 0.4885
<b>Baço</b>	0.61 ± 0.10	0.47 ± 0.07	t=4.14 / p= 0.0003*
<b>Timo</b>	0.38 ± 0.06	0.41 ± 0.05	t=1.23 / p= 0.2262

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 4.** Desenvolvimento ponderal de ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação os 21 dias pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média ± desvio padrão).

<b>Tempo (Dias)</b>	<b>Controle (n=24)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós-natal (n=25)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós-natal (n=25)</b>	<b>t / p</b>
<b>28</b>	87.41 ± 3.56 a	78.67 ± 8.78 b	79.26 ± 6.73 b	F=12.73 / p<0.0001*
<b>35</b>	137.58 ± 6.88 a	124.28 ± 10.76 b	119.08 ± 10.35 b	F=24.46 / p<0.0001*
<b>42</b>	179.58 ± 12.60 a	166.80 ± 17.09 b	161.28 ± 15.66 b	F=9.21 / p=0.0003 *
<b>49</b>	226.58 ± 19.40 a	211.96 ± 20.78 b	202.56 ± 23.50 b	F=7.87 / p=0.0008 *
<b>56</b>	263.42 ± 21.25 a	250.68 ± 28.78 a	234.32 ± 27.50 b	F=7.65 / p=0.0010 *
<b>63</b>	291.17 ± 25.36 a	279.60 ± 33.46 a	264.92 ± 34.03 b	F=4.33 / p=0.0167 *
<b>70</b>	311.00 ± 26.61 a	297.36 ± 32.94 a	283.04 ± 35.70 b	F=4.66 / p=0.0125 *
<b>77</b>	336.50 ± 27.53 a	321.2 ± 34.61 a	306.48 ± 39.59 b	F=4.67 / p=0.0124 *
<b>84</b>	354.08 ± 29.22 a	337.40 ± 35.86 a	320.56 ± 40.96 b	F=5.38 / p=0.0067 *
<b>90</b>	376.21 ± 32.06 a	354.48 ± 36.01 a	344.96 ± 34.50 b	F=5.32 / p=0.0070 *

\* Estatisticamente significativo (p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

**Tabela 5.** Peso em gramas dos órgãos coletados de ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação os 21 dias pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média ± desvio padrão).

Peso (g)	Controle (n=24)	Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós-natal (n=25)	Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós-natal (n=25)	F / p
<b>Testículo Direito</b>	1.56 ± 0.127	1.60 ± 0.21	1.48 ± 0.17	F=3.01 / p=0.0553
<b>Testículo Esquerdo</b>	1.65 ± 0.12	1.61 ± 0.20	1.58 ± 0.18	F=0.93 / p=0.3987
<b>Epidídimo Direito</b>	0.55 ± 0.03 a	0.51 ± 0.04 b	0.51 ± 0.06 b	F=4.96 / p=0.0096 *
<b>Epidídimo Esquerdo</b>	0.55 ± 0.04	0.53 ± 0.06	0.55 ± 0.07	F = 1.42 / p=0.2483
<b>Rim Direito</b>	1.71 ± 0.19	1.55 ± 0.25	1.60 ± 0.35	F=1.93 / p=0.1528
<b>Rim Esquerdo</b>	1.66 ± 0.19	1.55 ± 0.26	1.57 ± 0.37	F=1.09 / p=0.3408
<b>Fígado</b>	15.15 ± 3.24	13.51 ± 3.33	13.65 ± 4.14	F=1.54 / p=0.2208
<b>Baço</b>	0.73 ± 0.14	0.74 ± 0.22	0.65 ± 0.14	F=2.32 / p=0.1053
<b>Timo</b>	0.37 ± 0.11	0.35 ± 0.10	0.30 ± 0.10	F=2.55 / 0.0853
<b>Vesícula Seminal</b>	1.27 ± 0.27	1.31 ± 0.22	1.35 ± 0.29	F=0.55 / p=0.5740

\* Estatisticamente significativo (p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

**Tabela 6.** Índices do peso relativo dos órgãos em função do peso corporal em ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação os 21 dias pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média ± desvio padrão).

<b>Peso dos órgãos / Peso corporal x 100</b>	<b>Controle (n=24)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós-natal (n=25)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós-natal (n=25)</b>	<b>F / p</b>
<b>Testículo Direito</b>	0.41 ± 0.04	0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.07	F=2.50 / p=0.0890
<b>Testículo Esquerdo</b>	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.05	F=0.98 / p=0.3782
<b>Epidídimo Direito</b>	0.14 ± 0.01 a	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01 b	F=3.59 / p=0.0326 *
<b>Epidídimo Esquerdo</b>	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	F=0.15 / p=0.8608
<b>Rim Direito</b>	0.45 ± 0.03	0.44 ± 0.06	0.46 ± 0.06	F=0.82 / p=0.4404
<b>Rim Esquerdo</b>	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.45 ± 0.07	F=0.41 / p=0.6613
<b>Fígado</b>	4.04 ± 0.86	3.81 ± 0.88	3.89 ± 0.85	F=0.43 / p=0.6479
<b>Baço</b>	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.02	F=1.86 / p=0.1631
<b>Timo</b>	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	F=1.64 / p=0.2005
<b>Vesícula Seminal</b>	0.33 ± 0.07 a	0.37 ± 0.05	0.39 ± 0.06 b	F=3.64 / p=0.0311 *
<b>IGS</b>	0.42 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.44 ± 0.06	F=1.84 / p=0.1660

\* Estatisticamente significativo (p<0,05). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

**Tabela 7.** Peso testicular bruto, Peso testicular líquido (em gramas) e parâmetros histomorfométricos testiculares de ratos Wistar aos 21 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal (Média ± desvio padrão).

	<b>Controle (N=5)</b>	<b>Exposto (N=6)</b>	<b>t / p</b>
<b>Peso bruto testicular (g)</b>	0,12 ± 0,009	0,13 ± 0,02	t=-0,98 / p=0,34
<b>Peso líquido testicular (g)</b>	0,11 ± 0,008	0,12 ± 0,02	t= -0,09 / p=0,34
<b>Comprimento tubular (m)</b>	5,24 ± 0,26	6,25 ± 0,50	t=-0,001 / p=0,003 *
<b>Célula de Sertoli/secção transversal</b>	14,79 ± 0,48	13,63 ± 0,59	t=3,50 / p=0,006 *
<b>População células Sertoli (x 10<sup>7</sup>)</b>	1,94 ± 0,12	2,13 ± 0,22	t= -1,66 / p=0,12
<b>Diâmetro tubular (µm)</b>	154,46 ± 3,76	140,05 ± 4,94	t= 5,33 / p=0,004 *
<b>Altura de epitélio (µm)</b>	57,06 ± 2,00	45,27 ± 2,4	t= 8,67 / p<0,001 *

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 8.** Volume ( $\mu\text{L}$ ) dos componentes testiculares de ratos Wistar aos 21 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal (Média  $\pm$  desvio padrão).

	<b>Controle (n=5)</b>	<b>Exposto (n=6)</b>	<b>t / p</b>
<b>Túbulo seminífero</b>	98,22 $\pm$ 0,91	95,96 $\pm$ 2,59	t=1,83 / p=0,066
<b>Epitélio seminífero</b>	86,33 $\pm$ 0,91	81,97 $\pm$ 3,44	t=2,53 / p=0,032 *
<b>Lume</b>	4,25 $\pm$ 1,54	3,02 $\pm$ 1,10	t=1,52 / p=0,160
<b>Túnica própria</b>	7,63 $\pm$ 1,34	10,96 $\pm$ 1,91	t= -3,26 / p=0,009 *
<b>Espaço intertubular</b>	7,73 $\pm$ 0,80	9,81 $\pm$ 0,31	t= -5,85 / p=0,0002 *
<b>Células de Leydig</b>	2,76 $\pm$ 0,54	2,48 $\pm$ 0,35	t=1,00 / p=0,3394
<b>Tecido Conjuntivo</b>	1,00 $\pm$ 0,31	1,12 $\pm$ 0,30	t= -0,66 / p=0,522
<b>Vasos Sangüíneos</b>	0,65 $\pm$ 0,31	1,00 $\pm$ 0,26	t= -1,98 / p=0,078
<b>Espaço Linfático</b>	3,09 $\pm$ 0,5377	4,85 $\pm$ 0,5153	t= -5,51 / p=0,0003 *

\* Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9.** Volume ( $\mu\text{L}$ ) dos componentes do testículo e parâmetros morfométricos testiculares de ratos Wistar aos 90 dias pós-natal, quando submetidos à manipulação experimental (grupo controle) e não submetidos a manipulação (Controle negativo). Média  $\pm$  desvio padrão.

	<b>Controle Negativo (n=6)</b>	<b>Controle (n=12)</b>	<b>p / F</b>
<b>Túbulo seminífero</b>	1480,04 $\pm$ 0,09	1345,21 $\pm$ 0,12	F=1.91 / p=0.1442
<b>Epitélio seminífero</b>	1289,58 $\pm$ 0,08	1182,65 $\pm$ 0,14	F=1.54 / p=0.2179
<b>Lume</b>	136,89 $\pm$ 0,008	105,47 $\pm$ 0,03	F=1.19 / p=0.3248
<b>Túnica própria</b>	53,56 $\pm$ 0,009	57,08 $\pm$ 0,01	F=0.30 / p=0.8204
<b>Células de Leydig</b>	20,22 $\pm$ 0,002	29,76 $\pm$ 0,017	F=0.81 / p=0.4912
<b>Tecido Conjuntivo</b>	5,62 $\pm$ 0,002	4,84 $\pm$ 0,003	F=1.09 / p=0.3643
<b>Vasos Sangüíneos</b>	10,9 $\pm$ 0,004	15,49 $\pm$ 0,003	F=0.95 / p=0.4255
<b>Espaço Linfático</b>	103,76 $\pm$ 0,019	111,96 $\pm$ 0,019	F=1.15 / p=0.3397
<b>Espaço Intertubular</b>	140,51 $\pm$ 0,03	162,08 $\pm$ 0,03	F=1.14 / p=0.3436
<b>Peso líquido testicular (g)</b>	1,62 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,09	F=1.30 / p=0.2881
<b>Comprimento tubular (m)</b>	19,33 $\pm$ 1,29	17,63 $\pm$ 1,40	F=1.07 / p=0.3721
<b>Diâmetro Tubular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	312,27 $\pm$ 6,10	312,69 $\pm$ 7,45	F=3.67 / p=0.214
<b>Altura de Epitélio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	97,22 $\pm$ 3,42	97,83 $\pm$ 3,66	F=1.38 / p=0.2643
<b>Pop Sertoli</b>	4,38 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 8,56 x 10 <sup>6</sup>	4,02 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 6,63 x 10 <sup>6</sup>	F=1.09 / p=0.3637
<b>ICS</b>	7,57 $\pm$ 1,16	7,07 $\pm$ 0,79	F=2.33 / p=0.0920
<b>PED</b>	2,28 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 2,99 10 <sup>6</sup>	2,23 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 1,65 x 10 <sup>6</sup>	F=0.51 / p=0.6757
<b>PED/g</b>	1,41 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 1,45 x 10 <sup>6</sup>	1,46 x 10 <sup>7</sup> $\pm$ 0,87 x 10 <sup>6</sup>	F=0.09 / p=0.9596

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 10.** Peso líquido e parâmetros histomorfométricos testiculares de ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação os 21 dias pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média ± desvio padrão).

	Controle Negativo (n=6)	Controle (n=12)	Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós- natal (n=12)	Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós- natal (n=12)	p / F
<b>Peso líquido testicular (g)</b>	1,62 ± 0,11	1,53 ± 0,09	1,56 ± 0,14	1,47 ± 0,20	F=1.30 / p=0.2881
<b>Comprimento tubular (m)</b>	19,33 ± 1,29	17,63 ± 1,40	18,46 ± 1,45	17,63 ± 4,04	F=1.07 / p=0.3721
<b>Diâmetro Tubular</b>	312,27 ± 6,10 a	312,69 ± 7,45 a	310,88 ± 8,17 ab	302,50 ± 5,92 b	F=3.67 / p=0.0214 *
<b>Altura de Epitélio</b>	97,22 ± 3,42	97,83 ± 3,66	96,66 ± 3,66	94,41 ± 4,24	F=1.38 / p=0.2643
<b>C. Sertoli / secção transversal</b>	9.03 ± 1.46	9.30 ± 1.16	8.16 ± 1.10	8.62 ± 1.52	F=1.62 / p=0.2028
<b>Pop. Sertoli</b>	4,38 x 10 <sup>7</sup> ± 8,56 x 10 <sup>6</sup>	4,02 x 10 <sup>7</sup> ± 6,63 x 10 <sup>6</sup>	3,67 x 10 <sup>7</sup> ± 4,86 x 10 <sup>6</sup>	3,81 x 10 <sup>7</sup> ± 1,29 x 10 <sup>7</sup>	F=1.09 / p=0.3637
<b>ICS</b>	7,57 ± 1,16	7,07 ± 0,79	8,17 ± 1,10	7,17 ± 1,37	F=2.33 / p=0.0920
<b>PED</b>	2,28 x 10 <sup>7</sup> ± 2,99 10 <sup>6</sup>	2,23 x 10 <sup>7</sup> ± 1,65 x 10 <sup>6</sup>	2,21 x 10 <sup>7</sup> ± 5,38 x 10 <sup>6</sup>	2,00 x 10 <sup>7</sup> ± 6,28 x 10 <sup>6</sup>	F=0.51 / p=0.6757
<b>PED/g</b>	1,41 x 10 <sup>7</sup> ± 1,45 x 10 <sup>6</sup>	1,41 x 10 <sup>7</sup> ± 0,87 x 10 <sup>6</sup>	1,41 x 10 <sup>7</sup> ± 3,14 x 10 <sup>6</sup>	1,36 x 10 <sup>7</sup> ± 3,21 x 10 <sup>6</sup>	F=0.09 / p=0.9596

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 11.** Volume ( $\mu\text{L}$ ) dos componentes testiculares de ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média  $\pm$  desvio padrão).

	Controle Negativo (n=6)	Controle (n=12)	Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós- natal (n=12)	Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós- natal (n=12)	p / F
<b>Túbulo seminífero</b>	1480,04 $\pm$ 93,96	1345,21 $\pm$ 129,94	1402,27 $\pm$ 134,17	1294,51 $\pm$ 240,04	F=1.91 / p=0.1442
<b>Epitélio seminífero</b>	1289,58 $\pm$ 85,08	1182,65 $\pm$ 142,20	1225,31 $\pm$ 125,19	1116,95 $\pm$ 253,59	F=1.54 / p=0.2179
<b>Lume</b>	136,89 $\pm$ 8,11	105,47 $\pm$ 33,95	118,66 $\pm$ 36,23	117,62 $\pm$ 37,22	F=1.19 / p=0.3248
<b>Túnica própria</b>	53,56 $\pm$ 9,55	57,08 $\pm$ 12,72	58,29 $\pm$ 15,08	59,93 $\pm$ 13,75	F =0.30 / p=0.8204
<b>Células de Leydig</b>	20,22 $\pm$ 2,87	29,76 $\pm$ 8,94	27,65 $\pm$ 8,61	28,05 $\pm$ 13,54	F=0.81 / p=0.4912
<b>Tecido Conjuntivo</b>	5,62 $\pm$ 2,24	4,84 $\pm$ 3,04	4,69 $\pm$ 3,42	7,69 $\pm$ 7,51	F=1.09 / p=0.3643
<b>Vasos Sangüíneos</b>	10,9 $\pm$ 4,39	15,49 $\pm$ 3,49	12,37 $\pm$ 3,65	12,28 $\pm$ 9,97	F=0.95 / p=0.4255
<b>Espaço Linfático</b>	103,76 $\pm$ 19,45	111,96 $\pm$ 19,06	124,80 $\pm$ 22,18	130,61 $\pm$ 53,64	F=1.15 / p=0.3397
<b>Espaço Intertubular</b>	142,58 $\pm$ 25,00	158,77 $\pm$ 26,84	169,53 $\pm$ 24,56	178,65 $\pm$ 64,60	p=0.34 / F=1.144

\* Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12.** Área e perímetro dos túbulos seminíferos em testículos de ratos Wistar aos 90 dias pós-natal, quando submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (túbulos degenerados) ou animais controle, em 3 exposições diárias de 30 minutos. Média  $\pm$  desvio padrão.

	Controle (n=6)	Degenerados (n=5)	t / p
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	97526,90 $\pm$ 5802,40	72645,57 $\pm$ 16065,00	t=3.55 / p=0.0061 *
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	1226,47 $\pm$ 82,26	1064,83 $\pm$ 107,50	t=3.12 / p=0.0123 *

\* Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 13.** Dosagem de testosterona plasmática em ratos Wistar aos 21 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias de pós-natal (Média ± desvio padrão).

	Controle (n=6)	Exposto (n=6)	U / p
Testosterona (nMol/L)	13,65 ± 3,08	12,96 ± 3,52	U=21 / p=0,69
Testosterona (ng/mL)	3,93 ± 0,88	3,73 ± 1,01	U=21 / p=0,69
Testosterona (CV%)	4,04 ± 3,26	4,25 ± 3,28	U=18 / p=0,99

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 14.** Dosagem de testosterona plasmática em ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21 dias pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média ± desvio padrão).

	Controle Negativo (n=6)	Controle (n=6)	Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós-natal (n=6)	Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós-natal (n=6)	KW / p
Testosterona (nMol/L)	6,02 ± 3,40	10,59 ± 3,48	10,35 ± 5,17	9,45 ± 6,49	KW=3,34 / p=0,34
Testosterona (ng/mL)	1,73 ± 0,98	3,05 ± 1,00	2,98 ± 1,49	2,72 ± 1,87	KW=3,34 / p=0,34
Testosterona (CV%)	2,57 ± 3,52	2,23 ± 2,04	4,68 ± 2,31	1,85 ± 1,16	KW=1,65 / p=0,20

\* Estatisticamente significativo (p<0,05).

**Tabela 15.** Análise estatística da morfologia espermática, demonstrando os grupos experimentais em que células morfologicamente anormais e normais foram significativamente diferentes. Utilizou-se o teste não paramétrico do Qui-quadrado e nível de significância de 5%.

	<b>Grupo Controle (n=10)</b>	<b>Exposto do 13° de gestação até 21° dia pós-natal (n=10)</b>	<b>Exposto do 13° de gestação até 90° dia pós-natal (n=10)</b>
<b>Grupo Controle Negativo (n=7)</b>	$\chi^2=0,04 / p=0,83$	$\chi^2=6,57 / p=0,01 *$	$\chi^2=25,71 / p<0,0001 *$
<b>Grupo Controle (n=10)</b>	-	$\chi^2=7,06 / p=0,007 *$	$\chi^2=31,03 / p<0,0001 *$
<b>Grupo Exposto 21 dos 90 dias (n=10)</b>	-	-	$\chi^2=9,06 / p=0,002 *$

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

**Tabela 16.** Morfologia espermática de ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21º pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal (Média ± Desvio Padrão). Os resultados estão expressos em porcentagem do total de espermatozoides analisados.

	<b>Controle Negativo (n=7)</b>	<b>Controle (n=10)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós-natal (n=10)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós-natal (n=10)</b>
<b>Total de espermatozoides normais</b>	95,72 ± 1,25	95,50 ± 3,75	92,70 ± 4,37	88,00 ± 7,87
<b>Total de espermatozoides com patologias</b>	4,28 ± 1,26	4,50 ± 3,74	7,30 ± 4,38	12,00 ± 7,87
<b>Espermatozoides com gota citoplasmática distal</b>	-	2,70 ± 3,37	3,90 ± 4,28	7,20 ± 7,00
<b>Espermatozoides com pseudo-gota distal</b>	-	0,50 ± 0,70	0,60 ± 1,07	0,80 ± 1,16
<b>Espermatozoides com cauda enrolada</b>	2,75 ± 0,9	0,30 ± 0,42	0,70 ± 1,05	1,0 ± 1,22
<b>Espermatozoides com cauda quebrada</b>	0,49 ± 0,48	0,70 ± 0,48	0,90 ± 0,99	1,10 ± 0,99
<b>Espermatozoides com cabeça isolada</b>	0,34 ± 0,4	0,20 ± 0,42	0,50 ± 1,26	0,80 ± 0,94
<b>Espermatozoides com cabeça estraçalhada</b>	0,42 ± 0,5	-	0,40 ± 0,69	0,50 ± 0,85
<b>Outras</b>	-	0,2 ± 0,62	0,30 ± 0,93	0,6 ± 1,41

**Tabela 17.** Análise estatística da integridade do DNA de espermatozóides de ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos a Campos Eletromagnéticos de baixa frequência, em 3 exposições diárias de 30 minutos, desde o 13º dia de gestação até os 21º pós-natal e a partir do 13º dia de gestação até 90 dias pós-natal. Utilizou-se o teste não paramétrico do Qui-quadrado e nível de significância de 5%.

	<b>Grupo Controle (n = 6)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 21º dia pós-natal (n=6)</b>	<b>Exposto do 13º de gestação até 90º dia pós-natal (n=6)</b>
<b>Grupo Controle (n = 10)</b>	-	( $\chi^2=1,5$ / p=0,22)	( $\chi^2=2,25$ / p=0,13)
<b>Grupo Exposto 21 dos 90 dias (n = 10)</b>	-	-	( $\chi^2=0,2$ / p=0,65)

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

## **9. REFERÊNCIAS**

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anatomical Records**, v.94, p.238-248, 1946.

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

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**. n. 22, p. 340-344, 2001.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal Dairy Science**. v.45, p.774-781, 1962.

ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys**. v.3, p.219-241, 1963.

AYDIN, M.; TURK, G.; YUKSEL, M.; CEVIK, A.; APAYDIN, A.M.; YILMAZ, S. Effect of electromagnetic field on the sperm characteristics and histopathological status of testis in rats. *Medycyna Weterynaryjna*. v. 63, n. 2, pp. 178-183, 2007.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**. v. 44, p. 818-833, 1977.

BLAASAAS, K.G.; TYNES, T.; IRGENS, Å.; LIE R.T. Risk Of Birth Defects By Parenteral Occupational Exposure To 50 Hz Electromagnetic Fields: A Population Based Study. **Occup. Environ. Med**. n. 59, p. 92-97, 2002.

BOORMAN, G.A.; MCCORMICK, D.L.; FINDLAY, J.C.; HAILEY, J.R.; GAUGER, J.R.; JOHNSON, T.R.; KOVATCH, R.M.; SILLS, R.C.; HASEMAN, J.K. Chronic Toxicity / Oncogenecity Evaluation of 60 Hz (Power Frequency) Magnetic Fields in F344/N Rats. **Toxicologic Pathology**. v. 27, n. 3, p. 267-278, 1999.

BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. **Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal**. Virginia – EUA, 93 p., 2004.

CANATA, G.L.; FRIERI, G.; PUGLIESE, M. Use of pulsating electromagnetic fields in sports injuries. **Medicina dello Sport**. v. 35, Issue 1, p. 11-13, 1982.

CECCONI, S.; GUALTIERI, G.; DI BARTOLOMEO, A.; TROIANI, G.; CIFONE, M. G.; CANIPARI, R. Evaluation of effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development, **Human Reproduction**. Vol. 15, No. 11, pp. 2319-2325, 2000.

CHUNG, M.-K.; KIM, J.-C.; MYUNG, S.-H.; LEE, D.-I. Developmental Toxicity Evaluation of ELF Magnetic Fields in Sprague-Dawley Rats. **Bioelectromagnetics**. n. 24, p. 231-240, 2003.

CHUNG, M.K.; LEE, S.J.; KIM, Y.B.; PARK, S.C.; SHIN, D.H.; KIM, S.H.; KIM, J.C. Evaluation of spermatogenesis and fertility in fl male rats after in utero and neonatal exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. **Asian J. Androl**. V. 7, n. 2, p. 189-194, 2005.

CLEARY, S.F. Biophysical aspects of electromagnetic field effects on mammalian cells. In: FREY, A. H. Ed. **On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems**. New York: Springer-Verlag, 1995.

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**. n. 16, p. 330-334, 1995.

DRAPER, G.; VINCENT, T.; KROLL, M.E.; SWANSON, J. Childhood cancer in relation to distance from high voltage power lines in England and Wales: a case-control study. **BMJ**. v. 330, p. 1-5, doi:10.1136/bmj.330.7503.1290, 2005.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monotsh. Ver. Med.** v.29, p. 650-652, 1974.

EBISCH, I.M.W.; THOMAS, C.M.G.; PETERS, W.H.M.; BRAAT, D.D.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Human Reproduction Update**. v.13, n.2, p. 163–174, 2007.

EROGUL, O.; OZTAS, E.; YILDIRIM, I.; KIR, T.; AYDUR, E.; KOMESLI, G.; IRKILATA, H.C.; IRMAK, M.K.; PEKER, A.F. Effects of Electromagnetic Radiation from a Cellular Phone on Human Sperm Motility: An In Vitro Study. **Archives of Medical Research**. n. 37, p. 840-843, 2006.

ERREN, T.C. A biologically based overview: The melatonin hypothesis: Breast cancer and the use of electric power. **Epidemiologic studies of EMG and breast cancer risk**. Columbus: Battelle Press, 1997.

ESTÉCIO, M.R.H.; SILVA, A.E.; Alterações cromossômicas causadas pela radiação dos monitores de vídeo de computadores. **Revista 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.; de ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.** v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; ALDINI, N.N.; CAVANI, F.; SETTI, S.; NICOLINI, A.; CARPI, A.; GIARDINO, R. Effect of pulsed electromagnetic field stimulation on knee cartilage, subchondral and epiphyseal trabecular bone of aged Dunkin Hartley guinea pigs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. n. 62, p. 709-715, 2008.

FRANÇA L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. (**Tese, Doutorado**), Belo Horizonte: UFMG, ICB, 180p., 1991.

FRANÇA, R.L.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L.; RUSSEL, L.D. Germ cell genotype control cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of reproduction**. v.59, p. 1371-1377, 1998.

FRANÇA, R.L.; RUSSEL, L.D. The testis of domestic animals. In: **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Ed. Madrid: Churchill Communications Europe España, cap. 16, p. 197-219, 1998.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**. n. 63, p. 300-318, 2005.

FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células uma abordagem multidisciplinar**. Editora Manole, Barueri-SP, Cap. 24, p. 302-324, 2005

FREDOWITZ, M.; WESTERMANN, J.; LÖSHER, W. Magnetic field exposure increases cell proliferation but does not affect melatonin levels in the mammary gland of female sprague dawley rats. **Cancer research**. v. 62, p. 1356-1363, 2002.

FREY, A.H. An integration of the data on mechanism with particular reference to cancer. In: FREY, A.H. Ed. **On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems**. New York: Springer-Verlag, 211p, 1995.

FU, Y.; WANG, C.; WANG, J.; LEI, Y.; MA, Y.; Long-term exposure to extremely low-frequency magnetic fields impairs spatial recognition memory in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04922.x, n. 35, p. 797–800, 2008.

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**. n. 37, p. 329–340, Doi:10.1093/Ije/Dym295, 2008.

GENUIS, S. J. Fielding a current idea: exploring the public health impact of electromagnetic radiation. **Public Health**. n. 122, p. 113–124, 2008.

GERARDI, G.; NINNO, D.; PROSDOCIMI, M.; FERRARI, V.; BARBARO, F.; MAZZARIOL, S.; BERNARDINI, D.; TALPO, G. Effects of electromagnetic fields of low frequency and low intensity on rat metabolism. **BioMagnetic Research and Technology**. v. 6, Iss. 1, Art. n. 3, DOI: 10.1186/1477-044X-6-3, 2008.

GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Cell & Developmental Biology**. v. 9, p. 411-416, 1998.

GUZICK, D.S.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C.K.; NAKAJIMA, S.T.; COUTIFARIS, C.; CARSON, S.A.; CISNEROS, P.; STEINKAMPF, M.P.; HILL, J.A.; XU, D.; PHIL, M.; VOGEL, D.L. sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **The New England Journal of Medicine**. v. 345, n. 19, 2001.

HAKANSSON, N.; FLODERUS, B.; GUSTAVSSON, P.; JOHANSEN, C.; OLSEN, J.H. Cancer incidence and magnetic field exposure in industries using resistance welding in Sweden. **Occp. Environ. Med.** v. 59, p. 481-486, 2002.

HALLIDAY, R.W. Fundamentos da física. **Eletromagnetismo**. 4º Edição, Editora LTC, Rio de Janeiro-RJ, 350 p., 1996.

HEREDIA-ROJAS, J.A.; CABALLERO-HERNANDEZ, D.E.; RODRIGUEZ-DE LA FUENTE, A.O.; 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**. n. 25, p. 63-68, 2004.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M-T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**. v.54, p.209-213, 1978.

HÖNES, I.; POPISCHIL, A.; BERG, H. Electrostimulation of proliferation of the denitrifying Bacterium *Pseudomonas stutzeri*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 44, p. 275-277, 1998.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Hormonal regulation of testis. In: **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Ed. Spain: Churchill Communications Europe España, cap. 7, p. 67-80, 1998.

HUUSKONEN, H.; LINDBOHM, M.-L.; JUUTILAINEN, J. Teratogenic and reproductive effects of low-frequency magnetic fields. *Mutation Research*. n. 410, p. 167-183, 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**. v. 74, n. 4, p. 494-522, 1998.

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, p. 184-188, 2005.

JEGÓU, B. The sertoli cell in vivo and in vitro. **Cell Biology and Toxicology**. v. 8, n. 3, p. 49-54, 1992.

JENSEN, T.K.; BONDE, P.P.; JOFFE, M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. **Occupational Medicine**. n. 56, p. 544–553, 2006.

JUUTILIANEM, J.; MATILAINEM, P.; SAARIKOSKI, S.; LAARA, E.; SUONIO, S. Early pregnancy loss and exposure to 50-Hz magnetic fields. **Bioelectromagnetics**. v. 14, p. 229-236, 1993.

KHAKI, A.A.; ZARRINTAN, S.; KHAKI, A.; ZAHEDI, A. The effects of electromagnetic field on the microstructure of seminal vesicles in rat: A light and transmission electron microscope study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. v. 11, Iss. 5, p. 692-701, 2008.

KHEIFETS, L.; REPACHOLI, K.; SAUNDERS, R.; VAN DEVENTER, E. The Sensitivity Of Children To Electromagnetic Fields. **Pediatrics**. n.116, 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**. n. 30, p. 66-72, 2009.

KLIUKIENE, K.; 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.

KUMAR, S. Occupational Exposure Associated with Reproductive Dysfunction. **J. Occup. Health**. n. 46, p. 1–19, 2004.

KWEE, S.; RASKMARK, P. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 2. Microwave radiatio. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 44, p. 251-255, 1998.

KWEE, S.; RASKMARK, P. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 36, p. 109-114, 1995.

LAI, H.; SINGH, N.P. Magnetic-Field–Induced DNA Strand Breaks in Brain Cells of the Rat. **Environmental Health Perspectives**. v. 112, n. 6, 2004.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat. **Annals of New York Academy science**. v. 55, p. 548-573, 1952.

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 J. Androl**. N.6, p. 29-34. 2004.

LEI, C.; BERG, H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 45, p. 261-265, 1998.

LEVALLOIS, P.; DUMONT, M.; TOUITOU, Y.; GINGRAS, S.; MÂSSE, B.; GAUVIN, D.; KRÖGER, E.; BOURDAGES, M.; DOUVILLE, P. Effects of Electric and Magnetic Fields from High-power Lines on Female Urinary Excretion of 6-Sulfatoxymelatonin. **American Journal of Epidemiology**. v. 154, n. 7, 2001.

LIN, J.C. Early contributions to electromagnetic fields in living systems. In: LIN, J.C. Ed. **Advances in electromagnetic fields in living systems**, vol. 1. New York: Plenum Press, 1994.

LUBEN R.A. Membrane signal transduction as a site of electromagnetic field actions in bone and other tissues. In: FREY, H.A. Ed. **On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems**. New York: Springer Verlag, p. 83-95, 1995.

LUI, W.Y.; CHENG, C.Y. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis—A molecular and biochemical perspective. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. n. 18, p. 299–311, 2007.

LUKE, M.C.; COFFEY, D.S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology of reproduction. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. Ed. **The physiology of reproduction**. Ed. 2, New York: Raven Press, v. 1, cap. 23, p. 1435-1488, 1994.

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**. n. 75, p. 673–680, 2006.

MCCANN, J.; DIETRICH, F.; RAFFERTY, C. The Genotoxic Potential Of Electric And Magnetic Fields: An Update. **Mutation Research**. n. 411, p. 45–86, 1998.

MEHEDINTUM, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 43, p. 67-70, 1997.

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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 10, n. 4, p. 235-245. 1986.

NEGISHI, T.; IMAI, S.; ITABASHI, M.; NISHIMURA, I.; SASANO, T. Studies of 50 Hz Circularly Polarized Magnetic Fields of up to 350 mT on Reproduction and Embryo-Fetal Development in Rats: Exposure During Organogenesis or During Preimplantation. **Bioelectromagnetics**. n. 23, p. 369-389, 2002.

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**. 10.1096/Fj.04-3549fje. Published Online, 2005.

ORTH JM. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. in: Desjardins C, Ewing LL. (eds), *Cell and Molecular Biology of the Testis*, 1 st ed. New York: Oxford University Press. p 3-42, 1993.

PELLETIER, R.M. Blood-tissue barriers in the male reproductive system. In: MARTÍNEZ-GARCÍA, F.M.; REGADERA, J. **Male reproduction. A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications Europe España, Cap. 15, p. 183-195, 1998.

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, 2002.

ROBERT, R. Bobina De Helmholtz. **Revista Brasileira de Ensino De Física**. v. 25, n. 1, 2003.

ROCHA, D.M.C., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult wistar rats. **Tissue & Cell**. v.31, p.372-379, 1999.

ROSER, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**. n. 107, p. 179-196, 2008.

RUGGIERO, M.; BOTTARO, D.P.; LIGURI, G.; GULISANO, M.; PERUZZI, P.; PACINI, S. 0.2 T Magnetic Field Inhibits Angiogenesis in Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. **Bioelectromagnetics**. n. 25, p. 390-396, 2004.

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, cap. 1, p. 1-40, 1990.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue & Cell**. v.27, p.129-147, 1995.

RYAN, B.M.; SYMANSKI, R.R.; POMERANZ, L.E. JOHNSON, T.R.; GAUGER, J.R.; MCCORMICK, D.L. Multigeneration Reproductive Toxicity Assessment of 60 Hz Magnetic Fields Using a Continuous Breeding Protocol in Rats. **Teratology**. n. 59, p. 156-162, 1999.

SAITO, K.; SUZUKI, H.; SUZUKI, K. Teratogenic effects of static magnetic field on mouse fetuses. **Reproductive Toxicology**. Vol. 22, pp. 118-124, 2006.

SCARFI, M.R.; LIOI, M.B.; DELLA NOCE, M.; ZENI, O.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D.; CASTELLANNI, G.; BERSANI, F. Exposure to 100 Hz pulsed magnetic fields increases micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 43, p. 77-81, 1997.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E.; NEILL, J.D. Ed. **The physiology of reproduction**. ed. 2, New York: Raven Press, v. 1, cap. 22, p. 1363-1434, 1994.

SHAW, G.M.; CROEN, L.A. Human Adverse Reproductive Outcomes And Electromagnetic Field Exposures: Review Of Epidemiologic Studies. **Environmental Health Perspectives**. v. 101, s. 4, p. 107-119, 1993.

SCHÜZ, J.; AHLBOM, A. exposure to electromagnetic fields and the risk of childhood leukaemia: a review. **Radiation Protection Dosimetry**.v. 132, n. 2, pp. 202–211, 2008.

SLINEY, D.H.; PATTERSON, R.M. Guidelines for exposure to sub-radiofrequency electric and magnetic fields. **International Radiation Protection Association (IRPA)**. Link: [http:// www.irpa.net/irpa8/cdrom/vol.1/m1\\_228.pdf](http://www.irpa.net/irpa8/cdrom/vol.1/m1_228.pdf), Acessado em: 08.02.2009, 2007.

SILVA JR., V.A.; VIEIRA, A.C.S.; PINTO, C.F.; DE PAULA, T.A.R.; PALMA, M.B. AMORIN, M.J.A.A.L; AMORIN JR., A.A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reprod. Nutr. Dev.** N. 46, p. 157-166, 2006.

SUBBOTINA, T. I.; TERESHKINA, O. V.; KHADARTSEV, A. A.; YASHIN, A. A. Effect of Low-Intensity Extremely High Frequency Radiation on Reproductive Function in Wistar Rats. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Biophysics and Biochemistry**. v. 142, n. 2, p. 189-190, 2006.

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**. n. 19, p. 377-383, 1998.

TABLADO, L.; SOLER, C.; NÚÑEZ, M.; NÚÑEZ, J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F. Development of Mouse Testis and Epididymis Following Intrauterine Exposure to a Static Magnetic Field. **Bioelectromagnetics**. n. 21, p. 19-24, 2000.

TENFORD, T.S. Interaction of ELF magnetic fields with living system. In: POLK, C.; POSTOW, E. **Biological effects of electromagnetic fields**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 185-230, 1996.

TECIRLIOĞLU, R.T.; HAYES, E.S.; TROUNSON, A.O. Semen collection from mice: electroejaculation. **Reprod. Fertil. Dev.** n. 14, p. 363-371, 2002.

TEPPER, O.M.; CALLAGHAN, E.I.; CHANG, R.D.; GALIANO, D.K.; BHATT, K.A.; BAHARESTANI, S.; GAN, J.; SIMON, B.; HOOPER, A.; LEVILE, J.P.; GURTNER, G.C. Electromagnetic fields increase *in-vitro* and *in-vivo* angiogenesis through endothelial release of FGF-2. **The FASEB Journal**, n.10.1096/fj.03-0847fje, 2004.

TONINI, R.; BARONI, M.D.; MASALA, E.; MICHELETTI, M.; FERRONI, A.; MAZZANTI, M. Calcium protects differentiating neuroblastoma cells during 50 Hz electromagnetic radiation. **Biophysical Journal**. v. 81, p. 2580-2589, 2001.

TURNER, R.M.O. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. **Clin. Tech. Equine Pract.** n. 6, p. 278-284, 2007.

VERHOEVEN, G.; DENOLET, E.; SWINNEN, J.V.; WILLEMS, A.; SAUDERS, P.T.K.; SHARPE, R.M.; DE GENDT, K. The role of androgens in the control of spermatogenesis: lessons from transgenic models involving s Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor. **Anim. Reprod.** v. 4, n. 1/2, p. 3-14, 2007.

WILSON, B.W.; MATT, K.S.; MORRIS, J.E.; SASSER, L.B.; MILLER, D.L.; LARRY, E.A. Effects of 60 Hz Magnetic Field Exposure on the Pineal and Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in the Siberian Hamster (*Phodopus sungorus*). **Bioelectromagnetics**. v. 20, p. 224-232, 1999.

WINKER, R.; RÜDIGER, H.W. Reproductive toxicology in occupational settings: an update. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**. n. 79, p. 1-10, 2006.

WOLF, F.I.; TORSELLO, 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, p. 120-129, 2005.

WANG, X.W.; DING, G.R.; SHI, C.H.; ZHAO, T.; ZHANG, J.; ZENG, L.H.; GUO, G.Z. Effect of Electromagnetic Pulse Exposure on Permeability of Blood-testicle Barrier in Mice. *Biomedical and Environmental Sciences*. n. 21, p. 218-221, 2008.

YELLON, S.M. Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster. **Journal Pineal Research**. v. 16, p. 136-144, 1994.

YAN, J.G.; AGRESTI, M.; BRUCE, T.; YAN, Y.H.; GRANLUND, M.; MATLOUB, H.S. Effects of cellular phone emissions on sperm motility in rats. **Fertility and Sterility**. v. 88, n. 4, p. 957-964, 2007

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)