

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIECIA
ANIMAL

Márcio Botelho Pedrosa

**EFEITOS DO CAMPO
ELETROMAGNÉTICO DE 27,12 MHZ
EMITIDO POR EQUIPAMENTO DE ONDAS
CURTAS NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS
WISTAR ADULTOS**

RECIFE,
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIECIA
ANIMAL

Márcio Botelho Pedrosa

**EFEITOS DO CAMPO
ELETROMAGNÉTICO DE 27,12 MHZ
EMITIDO POR EQUIPAMENTO DE ONDAS
CURTAS NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS
WISTAR ADULTOS**

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.

Orientador: Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Co-orientador: Dr. Bruno Mendes Tenório

RECIFE,

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIECIA
ANIMAL

**EFEITOS DO CAMPO
ELETROMAGNÉTICO DE 27,12 MHZ
EMITIDO POR EQUIPAMENTO DE ONDAS
CURTAS NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS
WISTAR ADULTOS**

Dissertação elaborada por

Márcio Botelho Pedrosa

Aprovada em 06/08/2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Orientador)
Departamento de Morfologia e e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia
Departamento de Patologia - UFRPE

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório
Instituto de Ciencias Biológicas e da Saúde – ICBS - UFAL

Prof^a. Dra. Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório
Departamento de Histologica e Embriologia - UFPE

Ficha catalográfica

P372e	Pedrosa, Marcio Botelho
	Efeitos do campo eletromagnético de 27,12
MHz emitido	por equipamento de ondas curtas na
	espermatogênese de
	ratos adultos / Marcio Botelho Pedrosa. – Recife,
	2015.
	122 f. : il.
	Orientador(a): Valdemiro Amaro da Silva
Junior.	Dissertação (Mestrado em Biociência Animal)
—	Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento	de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
	Inclui anexo(s) e referências.
	1. Ondas-Curtas 2. Radiação Não Ionizante
	3. Espermatogênese 4. Testosterona 5. Células
de Leydig	I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orientador II.
Título	
	CDD
636.089	

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e a confiança para realização deste trabalho, e novos conhecimentos, muitas palavras seriam poucas para descrever o somatório de emoções e sentimentos vividos. Agradeço também por ter colocado as pessoas certas, no tempo certo para realização deste sonho. Agradeço a meus irmãos e espíritos de luz, que me deram o suporte para continuar e nunca desistir, sempre auxiliando meus caminhos, dando-me força e coragem diariamente.

A minha família, meus pais e meu irmão que sempre estão presentes em minha vida, me apoiando e me dando toda base de sustentação psíquico e emocionalmente.

Agradecimento especial a minha esposa, Elizabeth, pela paciência, tolerância e incentivo no desenvolvimento de nossas vidas, pois sem eles talvez não fosse possível a concretização do mestrado.

Ao meu Orientador Professor Dr. Valdemiro Amaro Junior, pela confiança e paciência, pelas dicas e conselhos pessoais e profissionais que engrandeceram-me como pessoa, pesquisador e professor.

Agradeço ao meu co-orientador Bruno Tenorio, pela sua calma e por estar presente nos momentos mais precisos para concretização do trabalho.

Agradeço aos funcionários da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pois a receptividade e cordialidade de todos tornam possível esta realização durante todo o período.

As Minhas Amigas Anna Kelly, e Fabiana. por estarem sempre comigo me ensinando e ajudando sempre que precisei.

RESUMO

O avanço da tecnologia e o aumento significativo das redes de radiofrequências e telecomunicações, faz com que, cada vez mais, as pessoas fiquem expostas e imersas em campos eletromagnéticos, cujos efeitos aparentam ser controversos e parâmetro-dependentes, e a curto prazo podem não representar um risco iminente quando aplicados de forma controlada, no entanto, como estes comportar-se-ão com a imersão de formas crônicas em nosso cotidiano é inconclusivo e sem estudos suficientes. Por outro lado, os campos eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 MHz) representam uma alternativa nos tratamentos com eletroterapias para algias e processos inflamatórios, que atingem milhares de pessoas pelo mundo. Este trabalho realizou aplicação do campo de ondas curtas em três grupos de ratos wistar divididos pelos tempos de exposição diário em 15, 30 e 60 dias consecutivos e seus controles, foi estudado os efeitos que os campos eletromagnéticos podem gerar nos testículos e sobre a espermatogênese. Com esta irradiação observou-se mudanças principalmente sobre as células de Leydig e uma variação na dosagem de testosterona entre os grupos, bem como uma diminuição do peso da próstata a longo prazo. Embora não tenham ocorridas alterações nos pesos testiculares e nenhum indicativo de lesões na análise histopatológica com a microscopia óptica.

Palavras-Chave: Campos Eletromagnéticos, Ondas-Curtas, Radiação Não Ionizante, Espermatogênese, Testosterona, células de Leydig.

ABSTRACT

The advancement of technology and the significant increase in radio networks and telecommunications, causes, increasingly, people are exposed and immersed in electromagnetic fields, the effects appear to be controversial and parameter-dependent, and short-term can not represent an imminent risk when applied in a controlled manner, however, as these will behave with the immersion chronic forms in our daily lives is inconclusive and without sufficient studies. On the other hand, the short-wave electromagnetic fields (27.12 MHz) represent an alternative in treatment with electrotherapies for pains and inflammatory processes that affect millions of people worldwide. This work conducted application of short wave field into three groups of Wistar rats divided by daily exposure times of 15, 30 and 60 consecutive days and controls was studied the effects of electromagnetic fields may generate the testes and on spermatogenesis. With such irradiation observed changes primarily on Leydig cells and a variation in testosterone dose between groups, as well as a reduction in long-term prostate weight. Although no alterations in testicular weights and no indication of lesions histopathology with optical microscopy.

Key-Words: Short-Wave, Non-Ionizing Radiation, Spermatogenesis, Testosterone, Leydig cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

μA	MicroAmper
μl	Microlitro
μs	Microsegundo
μT	Microtesla
A/m	Amper por metro
AR	Receptor Androgênico
BHT	Barreita hemato-testicular
CEM	Campo Eletromagnético
Cm	Centimetro
GFAP	Proteína fibrilar ácida
GHz	Giga hertz
Hz	Hertz
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICNIR	International Commission On Non-Ionizing Radiation Protection
IGS	Índice Gonadossomático
IRPA	International Radiation Protection Association
ITT	Testosterona intracelular
Kg	Kilograma
M	Molar
mg	Miligrama
MHz	Mega Hertz
mm	Milímetro
ηm	Manômetro
OC	Ondas Curtas
ROS	Espécie reativa de oxigênio

LISTA DE ANEXOS

Figura 14.

ANEXO 1

Prancha de análise histopatológica em aumento 100x.

Figura 15.

ANEXO 2

Prancha de análise histopatológica em aumento de 100x.

Figura 16.

ANEXO 3

Prancha de análise histopatológica em aumento de 400x.

Tabela 1.

ANEXO 4

Peso corporal dos animais expostos por 15 dias

Tabela 2.

ANEXO 5

Peso corporal dos animais expostos por 30 dias

Tabela 3.

ANEXO 6

Peso corporal dos animais expostos por 60 dias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espermatogênese....	17
Figura 2. Modelo de onda plana	18
Figura 3. Espectro eletromagnético	18
Figura 4. Espectro de radiação eletromagnéticos	19
Figura 5. Equipamentos e animais em exposição	26
Figura 6. Fotomicrografia óptica de testículo	30
Figura 7. Peso corporal dos animais submetidos ao campo por 15 dias.	34
Figura 8. Peso corporal dos animais submetidos ao campo por 30 dias.	35
Figura 9. Peso corporal dos animais submetidos ao campo por 60 dias.	35
Figura 10. Dosagem de testosterona plasmática	36
Figura 11. Volumes das células de Leydig	43
Figura 12. População total de células de Leydig	43
Figura 13. População de células de Leydig por grama de testículo .	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal dos animais expostos por 15 dias	
Tabela 2. Peso corporal dos animais expostos por 30 dias	
Tabela 3. Peso corporal dos animais expostos por 60 dias	
Tabela 4. Dosagens de Testosteronas em ng/mL	36
Tabela 5. Pesagem dos Orgãos dos animais entre os grupos de 15 dias de exposição e seus controles.....	37
Tabela 6. Pesagem dos Orgãos dos animais entre os grupos de 30 dias de exposição e seus controles.....	37
Tabela 7. Pesagem dos Orgãos dos animais entre os grupos de 60 dias de exposição e seus controles.....	37
Tabela 8. Volume (μ L) dos componentes testiculares de ratos adultos durante 15 dias de estudo	38
Tabela 9. Volume (μ L) dos componentes testiculares de ratos adultos durante 30 dias de estudo	39
Tabela 10. Volume (μ L) dos componentes testiculares de ratos adultos durante 60 dias de estudo	39
Tabela 11. Parametros morfométricos tubulares dos animais expostos por 15 dias	40
Tabela 12. Parametros morfométricos tubulares dos animais expostos por 30 dias	40

Tabela 13. Parametros morfométricos tubulares dos animais expostos por 60 dias	41
Tabela 14. Volumes e Populações de células de Leydig nos animais expostos por 15 dias e seus controles	42
Tabela 15. Volumes e Populações de células de Leydig nos animais expostos por 30 dias e seus controles	42
Tabela 16. Volumes e Populações de células de Leydig nos animais expostos por 60 dias e seus controles	42

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Revisão bibliográfica	15
1.1.1. Fundamentos da espermatogênese	15
1.1.2. Fundamentos do eletromagnetismo	18
1.1.3. Efeitos dos CEM nos sistemas biológicos	20
1.1.4. Efeitos dos CEM no sistema reprodutor masculino	22
2. Objetivos	24
2.1. Objetivos gerais	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. Material e Métodos	24
3.1. Animais	24
3.2. Delineamento experimental	25
3.3. Exposição aos Campos Eletromagnéticos	25
3.4. Análises histomorfométricas	27
3.5. Histometria computacional	31
3.6. Análise da testosterona plasmática	32
3.7. Análise estatística	33
4. Resultados	34
4.1. Pesos corporais	34
4.2. Dosagem da testosterona plasmática	36
4.3. Peso dos órgãos	37
4.4. Volumes e Populações de células de leydig	41
4.5. Análise Histopatologia	44
5. Discussão	45
5.1. Peso corporal e o campo eletromagnético	45
5.2. Alterações do peso da próstata	46
5.3. Dosagem de testosterona plasmática	47
5.4. Populações e volumes de células de Leydig	48
5.5. Histomorfometria testicular	50
5.6. Análise Histopatológica	53
6. Conclusões	54
7. Referências	56

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem sendo observado que vários segmentos da sociedade estão expostos cada vez mais a reações químicas e agentes físicos de origens exógenas, ocasionando subfertilidade entre 10 e 17 % dos casais em fase reprodutiva durante algum período de suas vidas (EBISCH et al., 2007), especialmente o sistema reprodutor masculino que mais é vulnerável a tais agentes, sendo responsáveis por 20% dos casos de esterilidade (WINKER e RÜDIGER, 2006). Os fatores externos podem gerar distúrbios reprodutivos (KUMAR, 2004). O conjunto de causas da redução da fertilidade masculina pode estar relacionado ao estilo de vida e fatores ambientais (AGARWAL, et.al., 2001).

Os avanços das pesquisas científicas aumentam a especificidade e a confiança nas análises relacionadas aos efeitos dos campos eletromagnéticos (CEM) em tecidos biológicos. No processo de evolução tecnológica e eletrônica, criam-se verdadeiros mares de ondas eletromagnéticas cuja imersão e exposição dos indivíduos estão cada vez mais intensas e crônicas. Esta malha eletromagnética gerada por computadores, redes de alta tensão, sistemas de rádio e wireless, ou mesmo, nas formas de imagens de ressonância para avaliação médica, bem como, na terapêutica por eletroterapia, termoterapia com o efeito das frequências de ondas curtas (com ou sem efeito da diatermia) e micro-ondas (MESSIAS, 2011).

A aplicação e o estudo dos CEM apresentam, de forma extensa uma grande variação de frequências, desde as muito baixas, como as observadas pelas correntes elétricas, gerados por equipamentos caseiros, até os campos de alta frequência produzidos pela telefonia celular. O que as pesquisas demonstram são informações controversas e conflitantes sobre os efeitos que os campos podem causar nos tecidos biológicos. Embora o uso dos aparelhos celulares em estado de espera próximo as regiões testiculares, não apresentem correlação aparente com os tumores em canais seminíferos, seminomas (HARDEL et al., 2007), que segundo Hardell et al. (2007) não descarta que o uso crônico ou os CEM

intercorrentes por períodos duradouros possam causar cânceres, em regiões corporais como próximo aos testículos ou mesmo ao encéfalo, uma vez que em estudos pregressos estes autores encontraram associações a alterações em sistemas nervosos, logo não descartando tais hipóteses.

Há diversas publicações conflituosas referentes aos riscos causados por telefones celulares e redes Wi-fi, Segundo Marcilio et al. (2009), diversas patologias aparentam estar associadas à exposição aos CEM, dentre elas, a leucemia em crianças e adultos, bem como, tumores no sistema nervoso central. Já Balbani e Krawczyk (2011), relatam que não encontraram dados consistentes em seus estudos em relação aos danos causados pelo uso de celulares, porém, relataram alterações no comportamento nos indivíduos, inclusive distúrbios no sono.

Estudos mostraram que há efeitos carcinogênicos e alterações bioquímicas em ratos Sprague-Dawley, após a aplicação de CEM de frequências extremamente baixas (100 e 500 microT) (AKDAG et al., 2007). Em sua revisão Krueger-Beck et al. (2010), mostraram que os parâmetros aplicados com campos elétricos mais utilizados são de duração de pulso de 65 μ s a 100 μ s; intensidade de aproximadamente 1 mA; frequência de 0 a 250 Hz. No entanto para estudos sobre a intensidade dos campos magnéticos (CM), utilizam-se preferencialmente os campos com intensidade de campo de 4,35 μ T a 8 T e frequência entre 0 e 54 GHz.

As ondas eletromagnéticas de ondas curtas, da ordem de 27,12MHz, usadas como recursos terapêuticos, podem vir a apresentar além do efeito da radiação, um efeito de aquecimento tecidual (diatermia) associado ao campo que pode gerar estresse tecidual e ativar algumas proteínas de choque térmico. Desta forma, levantam-se dúvidas quanto a aplicação, dosagem e segurança do equipamento, sobre qual o melhor e mais seguro modo de aplicação, se no modo contínuo ou pulsado. As Ondas Curtas (OC) apresentam respostas terapêuticas, então surgem novos questionamentos sobre quais as respostas, a curto e a longo prazo de irradiação podem se apresentar nos tecidos vivos, ou mesmo, quais respostas são observadas em estruturas teciduais distintas (SHIELDS,2003; 2004).

Uma vez que Kotnik (2000) em seu estudo, indica um maior potencial de dissipação de energia tende a ocorrer dentro das membranas afetando principalmente a sinalização celular ou mesmo a função dos receptores de membrana. São mais utilizados para estudos dos campos eletromagnéticos, as frequências das ordens de MHz à GHz, o que pode vir a gerar alterações bioquímicas e biofísicas alterando as estruturas e funcionamento celular.

1.1. Revisão Bibliográfica

1.1.1. Fundamentos da espermatogênese

A reprodução é um evento fundamental para a perpetuação das espécies animais, para tal, o testículo precisa de um bom funcionamento e que os tecidos passem por um processo de maturação dos testículos e promova a espermatogênese. Logo, é preciso que uma complexa e intrínseca relação entre aspectos do código genético e suas interconexões entre as células somáticas e reprodutivas aconteçam (VERHOEVEN, et al., 2007).

A espermatogênese necessita de uma rede de interrelações neuroendócrinas com funções endócrinas, parácrinas e autócrinas (ROSER, 2008). E que em ratos estas geram um ciclo que apresenta 55,6 dias onde ocorrem as diferenciações das células germinativas do epitélio seminífero (FRANÇA, 2005). O processo espermatogênico apresenta uma subdivisão em três fases: (a) Fase inicial, que é a fase proliferativa ou espermatogonial, ocorrem séries de divisões mitóticas das espermatogônias; (b) em seguida a fase meiótica ou espermatocitogênica, cujos eventos nucleares importantes como duplicação do DNA e a recombinação gênica ocorrem, também ocorrem duas divisões para formar as espermatídes (células haploides); (c) e por fim, fase de diferenciação ou espermiogênica, onde ocorreram diversas alterações nas espermatídes, afim de formar os espermatozoides (SHARPE, 1994; FRANÇA et al., 2005).

Para melhor entendimento do processo de divisões e diferenciações celulares foram estabelecidos os estádios, que são classificados por sua morfologia tubular, diferenciadas em oito estádios para todas as espécies (BERNDTSON, 1977; FRANÇA et al., 1998) ou pelo análise do sistema acrossômico (LEBLOND e CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990), na qual, o número de estádios varia para cada espécie, sendo espécie-específico com controle genotípico de cada célula germinativa (FRANÇA et al., 1998; FRANÇA et al., 2005).

Há dois tipos de células que são fundamentais no processo da espermatogênese, a primeira são as células de Sertoli, estas funcionam como uma base desde a membrana adluminal do túbulo seminífero, cuja forma um arcabouço estrutural para as células da linhagem espermática, servindo as células espermáticas os nutrientes necessários e como suporte estrutural. As células de Sertoli são influenciadas por hormônios, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e a testosterona estes atuam na divisão, na diferenciação e na maturação das linhagens espermáticas até a liberação dos espermatozoides inativos no lumen tubular (GUYTON, 2006).

As células de Sertoli auxiliam no transporte dos espermatozoides, maturação espermática e auxiliam na função epididimária. Dentre os mecanismos de regulação que as células de Sertoli atuam, ainda há ação sobre as células musculares lisas, vasos sanguíneos e células peritubulares mióides, bem como, uma direta interação com as células de Leydig. (SHARPE, 1994; FRANÇA et al., 1998). As células de Sertoli localizam-se nos túbulos seminíferos, e formam parte da túnica própria atuando a partir das junções do tipo “gap” e junções de oclusão (LUI e CHENG, 2007). Elas formam uma barreira que é denominada barreira hemato-testicular (BHT), esta promove um microambiente imunoprotegido, fundamental para o desenvolvimento do processo espermatogênico. A BHT divide o epitélio seminífero em dois compartimentos. No primeiro desses observam-se as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (compartimento da membrana basal) e um outro compartimento, o adluminal, onde encontram-se os espermatócitos

primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. (SHARPE, 1994; FRANÇA et al., 2005).

Outro tipo celular fundamental são as células de Leydig, localizam-se no interstício e tem ações fundamentais para a reprodução, como a produção de andrógenos a partir da molécula de colesterol (VERHOEVEN, et al., 2007). Estas células são mediadas pela estimulação por hormônio luteinizante (LH), e este hormônio é regido por um processo de retroalimentação negativa realizada pela testosterona no hipotálamo (ROSER, 2008).

A principal função das células de Leydig é a produção da testosterona e a diidrotestosterona, principalmente nas células de Leydig maduras, pois estas apresentam um aumento das organelas, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias, para produção dos esteroides e redução citoplasmática (SHAN, 1992), a testosterona atua em células do testículo que apresentam receptores androgênicos (AR), como nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos e nas próprias células de Leydig, essa testosterona testicular está diretamente relacionada a 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, 1994; SHARPE, 1994; ROSER, 2008). (Figura 1)

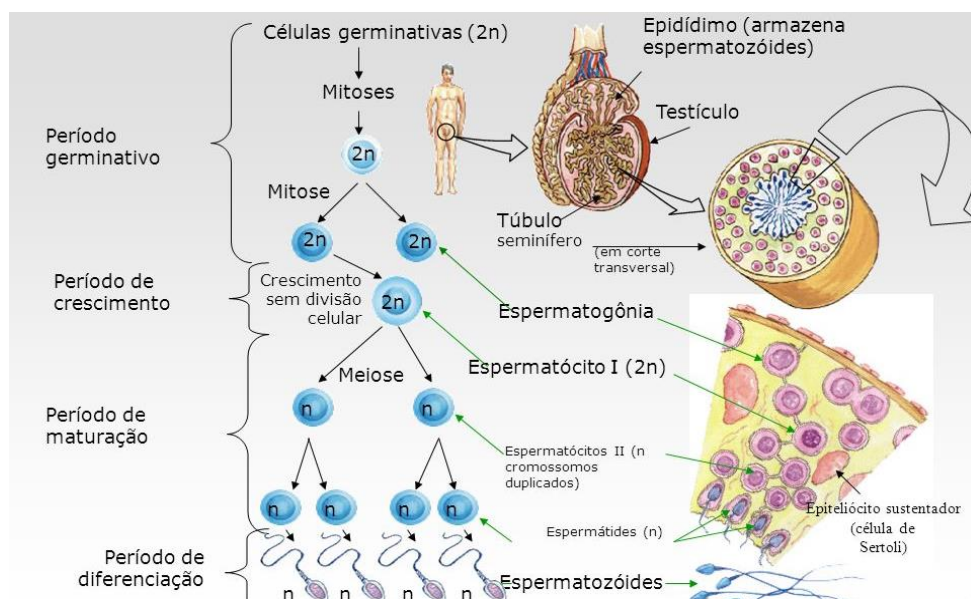


Figura 1. Espermatogênese. Fonte: www.images.slideplayer.com.br/1/287348/slides/slide

1.1.2. Fundamentos do eletromagnetismo

Os campos são gerados quando as cargas elétricas são colocadas em movimento estas produzem um campo eletromagnético que promovem corrente elétrica (INTERNATIONAL COMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION, 1998; BOORMAN et al., 1999). A produção do campo eletromagnético é proveniente das correntes elétricas alternadas, este pode ser representada por ondas do campo descrita como um modelo de onda plana (figura 2), possuem vetores de campos elétricos e campos magnéticos com direções perpendiculares entre si e com fases simétricas (FREY, 1995; HALLIDAY, 1996).

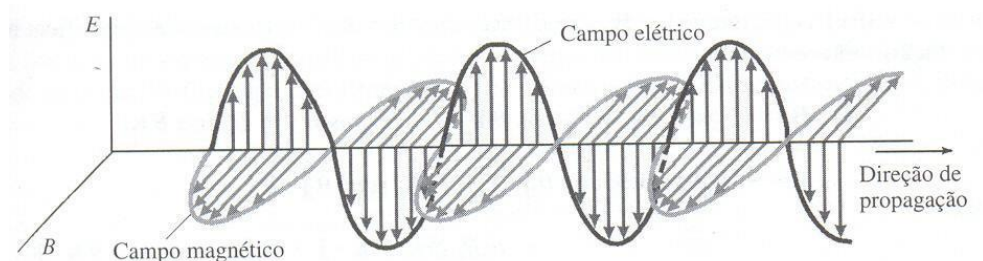


Figura 2. Modelo de onda plana, onde o campo elétrico (E), e o campo magnético (B), encontram-se em formas perpendiculares e de ondas semelhantes. Fonte: www.fisica.ufmg.br/fopdist/oem

As radiações eletromagnéticas são classificadas como ionizantes, uma vez que apresentam o poder de interagir com a matéria podendo remover elétrons dos átomos e desta maneira gerar a formação de íons, como por exemplo os raios-X, e parte da irradiação ultra-violeta; a outra classificação são as radiações denominadas não-ionizantes, estas não têm energia suficiente para quebrar ligações atômicas, não produzindo ionização dos átomos atingidos e fazem parte deste tipo de radiação os demais espectros eletromagnéticos (LIN, 1994; LEE et al., 2004; GENUIS, 2008) (Figura 3)

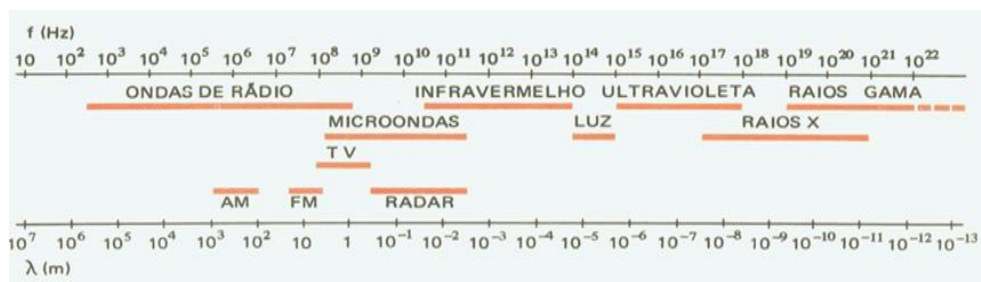


Figura 3: Espectro de ondas eletromagnéticas. Fonte: if.ufrj.br/~micha/pesquisa/imagens/espectro.

O espectro eletromagnético classifica as frequências de onda desde ELF (Frequência Extremamente Baixa), que possuem comprimento de onda com aproximadamente 3×10^7 m, até os raios gama, cujo comprimento de onda é de aproximadamente 3×10^{-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). (Figura 4)

Espectro de Radiação Eletromagnética				
Região	Comp. Onda (Angstroms)	Comp. Onda (centímetros)	Frequência (Hz)	Energia (eV)
Rádio	$> 10^9$	> 10	$< 3 \times 10^9$	$< 10^{-5}$
Micro-ondas	$10^9 - 10^6$	$10 - 0.01$	$3 \times 10^9 - 3 \times 10^{12}$	$10^{-5} - 0.01$
Infra-vermelho	$10^6 - 7000$	$0.01 - 7 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{12} - 4.3 \times 10^{14}$	$0.01 - 2$
Visível	$7000 - 4000$	$7 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{14} - 7.5 \times 10^{14}$	$2 - 3$
Ultravioleta	$4000 - 10$	$4 \times 10^{-5} - 10^{-7}$	$7.5 \times 10^{14} - 3 \times 10^{17}$	$3 - 10^3$
Raios-X	$10 - 0.1$	$10^{-7} - 10^{-9}$	$3 \times 10^{17} - 3 \times 10^{19}$	$10^3 - 10^5$
Raios Gama	< 0.1	$< 10^{-9}$	$> 3 \times 10^{19}$	$> 10^5$

Figura 4: espectro de radiação eletromagnética. Fonte: smar.com/uploads/images/t1.png

O campo de ondas curtas (OC) é um dos mais utilizados como forma de tratamento por fisioterapeutas, devido a este campo apresentar um alto poder de penetração e por promover aquecimento profundo do corpo, pois há interação entre o campo magnético e elétrico com as moléculas de água do organismo, sendo esta do tipo não ionizante da ordem de frequência de 27,12 MHz (KITCHEN, 1998). Os efeitos deste campo dar-se principalmente ao alto poder de penetração do CEM desta frequência (CIRELLI e MOREIRA, 2006).

A terapia por ondas curtas é bastante utilizada por atingir áreas mais profundas enquanto os campos de micro-ondas são escolhidos para áreas mais específicas e superficiais, a terapia por ondas curtas apresenta eletrodos Indutivos e capacitivos (LEITJEB, 2010). A *International Commission On Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) preconiza como limites da taxa de absorção (SAR) para todo o corpo de 0.4W/Kg. E

cerca de $SAR = 10W/Kg$ para uma área específica. A SAR é expressa na fórmula:

$$SAR(W/Kg) = \sigma E^2 / P.$$

Onde σ é a condutibilidade do liquido e o rho (P) é a densidade do liquido, e E os valores medidos do Campo.

1.1.3. Efeitos dos campos eletromagnéticos nos sistemas biológicos

Com os avanços tecnológicos as redes elétricas e campos eletromagnéticos estão cada vez mais abundantes o que desperta o interesse na comunidade científica em verificar quais interações e alterações os vários campos, podem afetar os processos biológicos. Alguns estudos epidemiológicos alertam para os riscos à exposição aos campos desde os de baixa frequência 50 e 60 Hz (BLAASAAS et al., 2002; KLIUKIENE; TYNES E ANDERSEN, 2004; DRAPER et al., 2005), até os estudos com campos eletromagnéticos de aparelhos de telefonia móvel da ordem de 800MHz até certa de 2450GHz.

Alguns autores estudaram a relação entre tumores e cancers envolvendo campos eletromagnéticos de diversas ordens de frequência, como os estudos de baixa frequência que se relacionam a estas disfunções celulares como a relação com aparecimento de diversas formas de câncer (ERREN, 1997; HAKANSSON, 2002). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica os campos magnéticos entre 0 e 300 Hz (Frequências Extremamente Baixas) como possíveis agentes carcinogênicos para humanos (IARC, 2010). Segundo Marcilio (2009), diversas patologias aparentam estar associadas à exposição aos CEM, dentre elas, a leucemia em crianças e adultos e tumores no SNC, contudo, o aparecimento do câncer de mama, não está relacionado a exposição ao CEM de altíssima frequência. Também são estudadas outras alterações mais aprofundadas como as análises sobre a atuação dos CEM a níveis celulares e moleculares, como os efeitos genotóxicos (alterações

cromossômicas) e doenças neurodegenerativas (ESTÉCIO e SILVA, 2002; IVANCSITS et al., 2005).

Algumas pesquisas vêm demonstrando alterações inibitórias nas funções do sistema nervoso central como da glândula pineal e na secreção de melatonina em diversas condições de exposição aos CEM (YELLON, 1994; WILSON et al, 1999; LEVALLOIS et al., 2001).

Em outro estudo demonstrando que a exposição crônica ao campo eletromagnético da ordem de 835MHz, durante 3 meses, buscou-se identificar alterações nos canais de Ca^{+2} , por estes demonstraram interferências na ação sináptica e na apoptose, podendo também exercer influencia sobre aprendizagem; memória; patologias no hipocampo, bem como, nos astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que estão associados com várias funções celulares (citoesqueleto, sinal via de transdução, metabolismo), em sua pesquisa Maskey et al. (2010) observou no grupo exposto uma perda de interneurônios e células piramidais e de células granulares corticais. Além disso, um total aumento do GFAP foi observado no hipocampo. A ação apoptótica, indicou que esta exposição pode alterar a viabilidade celular.

O campo de Ondas Curtas (OC), apresenta efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, melhora a extensibilidade de tecidos colágenos, esses efeitos associam-se principalmente ao alto poder de penetração do CEM de 27,12MHz podendo ocasionar efeitos de elevação da temperatura por interação com moléculas de água e íons (CIRELLI e MOREIRA, 2006)

A relação do OC neste estudo inclui o fato do CEM ser aplicado em regiões lombares, quadril e joelhos; bem como, a proximidade dos cabos e do aparelho da região pélvica dos profissionais. Trabalhos evidenciam que os equipamentos utilizados mostraram valores de densidade eletromagnética muito alto nas proximidades da pelve do terapeuta e dos pacientes, entretanto a utilização de gaiolas de Faraday aumenta significativamente as intensidades de campo não sendo recomendado ao uso (MESSIAS, 2011).

1.1.4. Efeitos dos campos eletromagnéticos no sistema reprodutor masculino

Várias frequências e densidade de campos apresentam diversas respostas no sistema reprodutor masculino, apresentando um efeito “janela” sobre as estruturas e funções testiculares e no ciclo germinativo. Jensen et al., (2006), relatou haver alguns efeitos causados por radiações de baixa frequência e não-ionizante.

Blaasaas et al. (2002) demonstrou que a exposição a CEM no ambiente de trabalho, na presença de campos de 50Hz Ocasionou um aumento na incidência de deficiências congênitas na geração subsequente no sistema nervoso central. No entanto, um grande número de pesquisas vem constatando alguns efeitos adversos no sistema reprodutivo masculino em decorrência da exposição a campos elétricos e magnéticos. No trabalho de Lee et al. (2004) apesar de não ter havido alteração no peso do testículo, ele demonstrou um aumento na incidência de morte das células germinativas induzidas por apoptose.

Da mesma maneira a exposição a campos eletromagnéticos emitidos por telefones celulares, provocou diminuição nos parâmetros da espermatogênese e maturação de espermatozóides em ratos Wistar adultos (MEO et. al., 2011). Em estudos com CEM de telefonias celulares constatou-se a diminuição da quantidade de sêmen de homens, submetidos aos exames de infertilidade, como na contagem, morfologia e viabilidade dos espermatozoides (AGARWAL et al., 2008)

A aplicação dos diversos tipos de Campos eletromagnéticos em áreas corporais distintas como sistema reprodutor, apresentam respostas contraditórias, pois alguns autores submeteram os animais ao campo de cerca de 1.850MHz por 1 hora por dia durante 11 semanas, e demonstrou que a frequência de rádio pulsado de baixa intensidade emitida por um telefone celular convencional não prejudicou a função testicular em ratos adultos. Da mesma forma a exposição subcronica, com dois tempos de 45 minutos de exposição intervalado por 15 minutos, em um CEM de

848,5MHz não influenciou a contagem e a espermatogênese (RIBEIRO et. al., 2007).

Segundo Kumar (2011), as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem surgir e estas são as responsáveis por respostas tóxicas causando efeitos na fisiologia da reprodução, contudo, alguns dos agentes antioxidantes (glutathione, peroxidase, catalase, superóxido dismutase), agem para combater o aumento da ROS. Colaborando com esta hipótese, Kesari (2009; 2010; 2011) demonstrou em vários de seus estudos que os efeitos da radiofrequência; micro-ondas e os pulsos magnéticos podem estimular ou controlar a produção de ROS agindo também como protetor nos testículos e cérebros.

Embora a radiação por radiofrequência possa causar danos nos tecidos como alterações nas cascatas de sinalização que podem contribuir para formação de tumores. Kesari et al. (2010; 2011) tem demonstrado tumores em células testiculares por identificar vários fatores como a proteína quinase C (PKC), histona quinase, apoptoses, assim como possíveis mudanças nos ciclo celular e redução da contagem de células espermáticas. Desai et al., (2009) mostrou que o campo de radiofrequência sugere a presença de tumores podem afetar a enzimas celulares como PKC, as concentrações de Ca^{++} intracelular e gerar estresse celular.

Al-Damegh (2012), identificou que alguns agentes como as vitaminas C e E, aparentam um efeito protetor contra as alterações e efeitos deletérios dos diversos CEM, por estes agentes reduzirem os estresses oxidativos produzidos pelo CEM, quando comparados aos grupos controles, em suas pesquisas, Al-Damegh, identificou que o CEM por 15 a 60 minutos diários por duas semanas. Demonstrou um aumento significativo no diâmetro dos túbulos seminíferos com uma interrupção do ciclo de espermatozoário no grupo exposto. Evidenciam-se que diversas frequências podem gerar alterações distintas com efeito “janela” e parâmetro-dependente.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a influência do CEM de 27,12MHz no sistema reprodutor.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Mensurar os pesos corporais e testicular;
- b. Avaliar as proporções volumétricas do parênquima testicular;
- c. Determinar a morfologia das células da linhagem espermatogênica;
- d. Contabilizar e quantificar a população celular dos túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (CES);
- e. Calcular o Índice Gonadossomático;
- f. Observar alterações Histomorfométricas e histopatológicas;
- g. Medir as áreas dos túbulos seminíferos pela histometria computacional.
- h. Calcular a população de células de Sertoli
- i. Avaliar os níveis de testosterona (T) plasmática;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

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

3.2. Delineamento Experimental

Os animais foram selecionados aleatoriamente 8 animais por grupo e começaram a ser expostos ao CEM de 27,12Mhz a partir dos 90 dias de vida. Os ratos machos foram separados para composição dos seguintes grupos experimentais:

- I. Grupo de ratos expostos ao CEM durante 15 dias consecutivos, sendo uma exposição diária de 15 minutos;
- II. Grupo de ratos controle, submetidos ao mesmo manuseio durante 15 dias, porém sem a exposição ao CEM;
- III. Grupo de ratos expostos ao CEM durante 30 dias consecutivos, sendo uma exposição diária de 15 minutos;
- IV. Grupo de ratos controle, submetidos ao mesmo manuseio durante 30 dias, porém sem a exposição ao CEM;
- V. Grupo de ratos exposto ao CEM durante 60 dias consecutivos, sendo uma exposição diária de 15 minutos;
- VI. Grupo de ratos controle, submetidos ao mesmo manuseio durante 60 dias, porém sem a exposição ao CEM.

O protocolo experimental utilizado no presente trabalho foi aprovado pela comissão de ética do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e legislações pertinentes (Proc. N° 23082.009449/2014/DMFA-UFRPE), estando aprovado e de acordo com os princípios básicos para pesquisa envolvendo animais, pré-estabelecidos pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) (N.º da Licença. 089/2014).

3.3. Exposição aos Campos Eletromagnéticos

Os grupos experimentais foram expostos a CEM não-ionizantes do tipo senoidal, variáveis no tempo, com frequência de 27,12 MHz, Comprimento de onda de 11,02m; os campos eletromagnéticos foram

mensurados usando um teslometro (PHYWE-GERMANY) na sala de experimentação, bem como nos sítios de aplicação entre as placas e os animais, e a densidade de fluxo magnético foi variável entre 21mT e 70 mT. Os grupos dos CEM foram irradiados por equipamento de emissão de ondas curtas, da Marca BIOSET - Brasil, 2013, *Thermowave*, utilizando as placas de silicone posicionadas em série abaixo dos animais a cerca de 3cm dos mesmos, os animais foram alocados sobre o espaço total de 54cm entre as placas, de forma que o campo oscilasse o menos possível.

Os animais foram contidos em recipientes plásticos devidamente adaptados e que permitiam movimentação dos ratos em seu interior, a fim de reduzir o estresse do animal, e estes foram dispostos aleatoriamente em grupos de três animais, entre as placas. (Figura 5). As ondas do CEM são facilmente bloqueadas por portas, janelas e paredes, logo durante o período de irradiação os animais controle foram mantidos da mesma maneira e neste ambiente não se verificou a presença do CEM. Observa-se que os campos elétricos de baixa frequência têm pouco poder de penetração em tecidos biológicos, enquanto os campos magnéticos atravessam os tecidos biológicos mais facilmente (MARKOV, 2000).

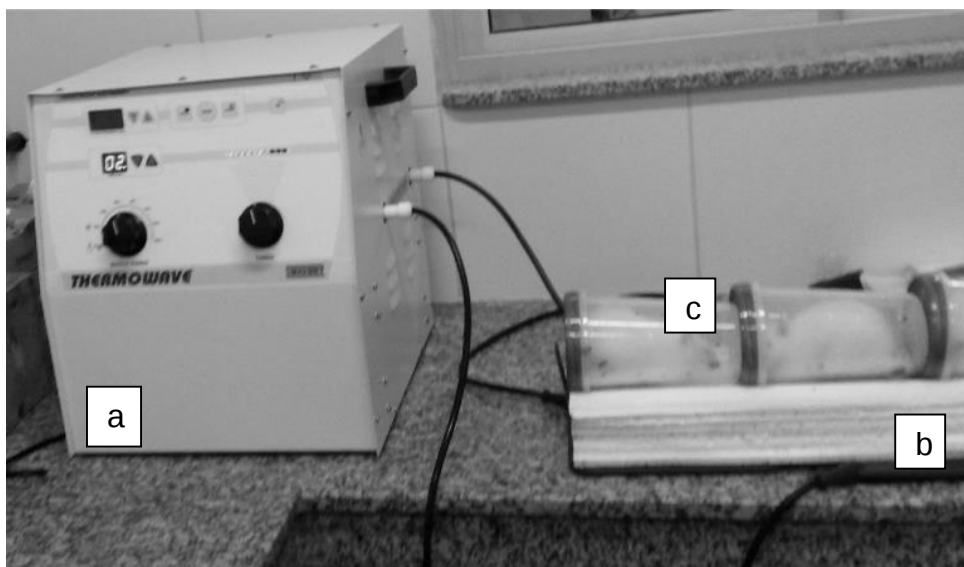


Figura 5. Foto dos animais em experimento. a) equipamento gerador do campo de 27,12MHz; b) placa de capacitancia localizadas abaixo dos animais dispostas para gerar melhor uniformidade do CEM; c) animais acondicionados nos recipientes adaptados.

Os Valores recomendados pela *Internation Commission on Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) que engloba a radiação do ondas curtas de 27,12 MHz, tem como limite ocupacional 61V/m para campo elétrico e 0,16A/m para o campo magnético (ICNIRP, 1998). A IRPA (*International Radiation Protection Association*) coloca como faixa de exposição máxima 0,5 mT / 24 horas em um dia ou 5 mT / 2 horas ou menos (SLINEY e PATTERSON, 2007). Outro fator subjetivo está na intensidade de campo variável com a sensibilidade do paciente no caso da terapia por ondas curtas (MESSIAS, 2011). Por não haver um limite pré-estabelecido ou recomendado, as exposições intermitentes aos campos eletromagnéticos parecem ter melhores resultados quando comparado a exposição ao CEM de maneira constante (RAMADAN et al., 2002). É observado que a exposição ao CEM de Ondas curtas com emissão de forma constante também gera um efeito de diatermia, causando efeitos biológicos térmicos, por isso foi escolhido para este estudo o modo pulsátil de campo a fim de tentar obter uma melhor estimulação e reduzir ou impedir este efeito.

3.4. Análises histomorfométricas

A histopatologia e histometria testicular foram realizadas após o período de exposição de 15, 30 e 60 dias consecutivos, momento no qual os ratos de cada grupo foram heparinizados (Heparina Sódica 125 UI/100g), anestesiados com xilazina (10mg/ Kg) e cetamina (115mg/Kg) em seguida foi feito o aprofundamento anestésico com tiopental sódico (100 mg/Kg), logo após os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (50 UI/litro), por um período de tempo aproximado de 10 minutos. Após a lavagem do sistema vascular, prosseguiu com a perfusão por glutaraldeído a 4% em solução tampão fosfato a 0,1M e pH 7,3 por cerca de 10 minutos, uma vez que o glutaraldeído tem como objetivo realizar fixação superficial do material em relação aos outros fixadores para

que os materiais sejam incluídos em material de resina à base de metacrilato (RUSSEL et al., 1990).

Os órgãos como coração, pulmão, fígado, baço, bem como, as estruturas do sistema reprodutor (testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata) foram removidos e pesados, então foram fixados na solução de glutaraldeído utilizada na perfusão por cerca duas horas. Um testículo de cada animal foi utilizado para as análises histopatológicas e morfométricas em análises microscópicas, realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA), os fragmentos transversais do testículo seccionados aproximadamente em 2 mm de espessura, estes foram acondicionados em imersão em tampão fosfato por 2 horas, sendo posteriormente desidratados em série crescente de álcoois e incluídos na resina plástica. Para análise da microscopia óptica foram feitos cortes histológicos de 4 µm de espessura e as lamínas receberam a coração por azul de toluidina / borato de sódio a 1% e em seguida foram analisados morfologicamente e morfometricamente (BRINGEL et al., 2011).

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. Para as medidas dos diâmetros tubulares médios foram mensurados quinze túbulos seminíferos de cada animal, selecionados aleatoriamente e os que apresentaram formas redondas ou arredondadas, em diversos estágios do ciclo do epitélio germinativo, bem como, a altura do epitélio seguiram os mesmos critérios de seleção (utilizando-se os mesmos túbulos para mensuração. As áreas tubulares e as áreas dos epitélios (estas foram obtidas pela subtraindo a área luminal da área tubular), também foi realizada a mensuração com os mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, foi usado o programa de análise de imagens (*IMAGEJ*).

No testículo pode-se dividir em dois compartimentos: tubular (neste foram avaliados a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume); e

intertubular ou intersticial (nos qual foram investigadas as células de Leydig, células do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos).

Como a densidade do testículo é de aproximadamente 1,03 a 1,04 (SILVA et al., 2006), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. O volume de cada componente do testículo, expresso em μL , foram obtidos pelos valores percentuais das densidades dos constituintes tubulares (%) e o produto com 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).

ATTAL e COUROT, (1963); DORST e SAJONSKI, (1974), empregaram a fórmula para expressar o comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, em metros, esta medida foi delineada a partir dos valores do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e pelas medidas do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, Para este cálculo obtiveram-se o volume total dos túbulos seminíferos (VTS), e dividi-lo pela área da secção transversal dos túbulos seminíferos (πR^2 ; sendo o R = diâmetro tubular/2). Tal formula expressa-se como:

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

Para a análise do parênquima testicular, os dados volumétricos foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de grátícula micrométrica (Olympus) foram contabilizados aleatoriamente 6615 pontos para cada animal, divididos a partir uma contagem de 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica do testículo em aumento de 400X.

Para medição dos diâmetros nucleares utilizou-se do 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.

Para analisar o epitélio germinativo foi escolhido o estágio VII do ciclo germinativo do rato, segundo a classificação de acordo com o método

acrossômico de Russell et al., (1990), foi o escolhido para estimar os diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero (figura 6), neste estágio foram realizadas as contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas, utilizou-se 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.

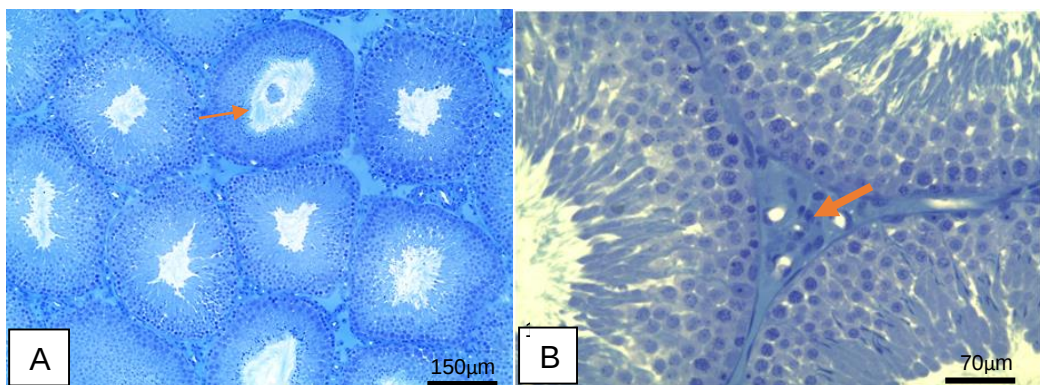


Figura 6. Fotomicrografia óptica de testículo de ratos Wistar adultos. Na figura 6A, notar a presença de túbulos seminíferos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (seta). Aumento de 100x, azul de toluidina borato de sódio. Observar na figura 6B, detalhe do intertúbulo (seta) delimitado por túbulos seminíferos em diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero. Aumento de 100x, azul de toluidina borato de sódio.

As contagens das células germinativas, como as espermatogônias do tipo A cujas apresentam núcleos ovóides, tiveram o valor utilizado obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. No caso dos números de células de Sertoli, contabilizadas apenas as células com os nucléolos visíveis, foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) que foi modificada por Amann e Almquist (1962), sendo o diâmetro nuclear médio (DM), a média dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular, para cada animal:

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

Para a população total de células de Sertoli por testículo, realizou-se a correção do número 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), na qual o Número corrigido de células de Sertoli é igual ao produto do Número de células de Sertoli por testículo (número CS Testículo) pelo Comprimento total de túbulos Seminíferos (μm) (Comp. Tot. Tub. Sem.) e também multiplicado pelo Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal (Num. Cor. Nucl. CS Sec. Transv); em seguida dividindo-os pela espessura do corte (μm), é representada pela fórmula abaixo:

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

O cálculo da produção espermática diária por testículo (PED = produção espermática diária) foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Jr. et al. (2006), nas quais a PED é igual ao Nº Total CS Testículo = Número total de células de Sertoli por testículo multiplicado pela proporção de espermátides arredondadas no estágio VII e pela frequência relativa do estágio VII; divididos pela duração dos estágios em dias, consoante a fórmula descrita:

$$PED = \frac{\text{Nº Total CS Testículo} \times \text{Prop. AR} \times \text{Freq. R el. Est. VII}}{\text{Duração do Estágio VII}}$$

3.5. Histometria Computacional

As áreas dos túbulos seminíferos foram medidas em aumento de 100X, através do uso de um programa computacional biométrico. A área perímetro médio para cada animal 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 LEICA DM500, acoplado a uma câmera filmadora digital LEICA ICC50, conectada a um microcomputador. Para medição da área e perímetro dos túbulos seminíferos utilizou-se do sistema computacional para aferição biométrica IMAGELAB 2000®.

3.6. Análise da Testosterona Plasmática

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

Na avaliação da dosagem de testosterona, 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). Desta forma foi feito inicialmente 66,7µl do anticorpo (Polyclonal anti-testosterona R156/7, Coralie Munro, University of California, Davis, USA.) foi diluído em 5 ml de tampão (coating buffer; Na_2CO_3 , NaHCO_3 , H_2O ultra pura, pH ajustado para 9,6) e 50µl 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°C por no máximo 12 horas.

Em seguida elaborou-se a curva padrão, séries de diluições de 250µl do padrão de concentração 600 pg/50µl de testosterona (17-hydroxy-4-androsten-3-one, Steraloids, Sigma A6950) até a concentração de 2,3 pg/50µl, em 250µl de solução de ensaio de ELISA (NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; NaCl ; BSA - Sigma Aldrich, A7906; H_2O ultra pura, pH ajustado para 7,00). O hormônio conjugado com a enzima HRP (Testosterone-horseradish Peroxidase) também foi diluído (33,3µl em 5 ml da solução de ensaio de ELISA).

A solução de substrato para ELISA foi concluída com um combinando 40µl 0,5M H₂O₂, 125µl 40 mM ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e 12,5 ml de solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; H₂O ultra pura, pH ajustado para 4,00). Para cada poço contendo o material do estudo ou controle, foi adicionado 100µl. As placas foram cobertas e incubadas em temperatura ambiente e sob agitação (Multi-Pulse Vortexer; modelo 099A VB4, 50 / 60Hz – Glass-Cols), 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). Para evitar maiores desvios as amostras foram lidas de forma duplicada mantendo o coeficiente de variação intra e inter-ensaio menor do que 10%. Os níveis plasmáticos da testosterona dos animais foram medidos em nMol/L, ng/mL e pela relação entre concentração e volume (CV%) do hormônio.

3.7. Análise estatística

Foi realizada a verificação da tendência de normalidade, ou seja, se a população obtida segue uma distribuição Gaussiana. O teste de normalidade foi realizado pelo programa computacional INSTAT PLUS, (Copyright© StatSoft, Inc., 2001). Dependendo da tendência normal dos resultados obtidos, utilizou-se dos testes não paramétricos. Em virtude da normalidade dos dados, se procedeu 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). O teste de Mann-Whitney foi utilizado entre as amostras e seus controles. Na avaliação das médias intergrupos foi utilizado o teste de Turkey. 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, 2013.

4. RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

De acordo com os resultados de peso corporal expostos na figura 7 e na tabela 1 (no anexo 4), observou-se que este parâmetro não sofreu influência da exposição ao CEM durante 15 dias em relação ao grupo controle.

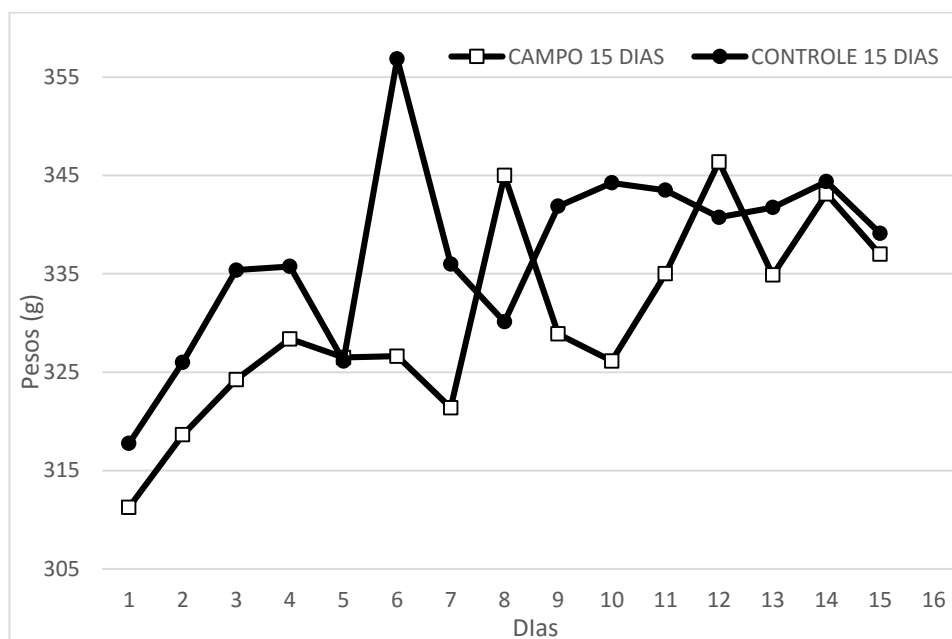


Figura 7. Peso corporal de ratos Wistar machos submetidos a CEM durante o período de 15 dias. Marcador branco animais expostos; marcador preto animal controle, não houve mudança significativas nos pesos dos animais.

Por outro lado, se observou que a exposição ao mesmo CEM por 30 dias promoveu aumento do peso corporal nos animais expostos. Ao final do período de trinta dias de exposição foi encontrada uma diferença extremamente significativa entre grupos (ratos irradiados de 348.83 ± 7.66 ; e dos ratos controle de 333.96 ± 5.88 ; $p=0.0001$). Demonstrado na figura 8. (tabela 2 no anexo 4)

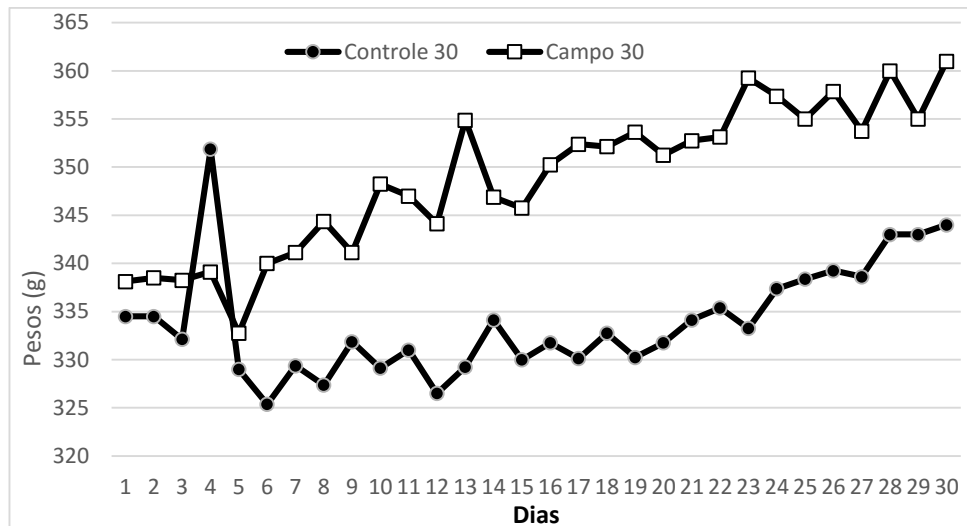


Figura 8: Peso corporal dos animais expostos pelo período de 30 dias (linha preta); e os animais controle (linha cinza); há uma tendência de aumento do peso médio dos animais mais acentuado que dos animais controle.

Os animais apresentaram uma tendência a aumento do peso médio dos animais dos grupos submetidos ao CEM durante 60 dias, este comportamento permaneceu até próximo aos 30 dias e a partir daí a média de peso destes animais apresentaram um comportamento de diminuição das médias do peso. Na figura 9 podemos observar o comportamento do peso corporal dos animais submetidos ao CEM por 60 dias. Na comparação das médias diárias dos animais não se constatou diferença estatística (tabela 3 no anexo 6).

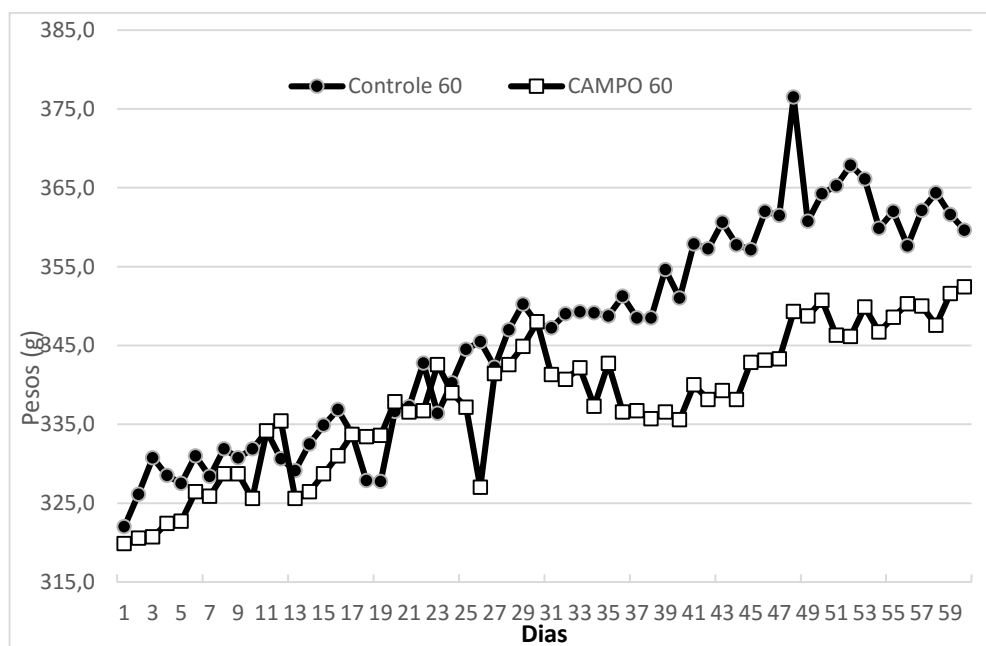


Figura 9: O gráfico mostra o acompanhamento ponderal dos animais durante 60 dias de experimento, tendo os animais controle representado na cor cinza; e os animais do campo representados na cor preta. Note uma tendência de aumento ponderal até meados dos 30 dias e depois uma redução dos pesos médios dos animais do campo.

4.2 Testosterona plasmática

Na análise dos níveis plasmáticos de testosterona, não houve diferença estatística entre os animais tratados e seus respectivos controles nos diversos períodos de exposição ao campo eletromagnético (Tabela 4). Embora tenha sido observada tendência de diminuição dos níveis de testosterona plasmáticos entre os grupos tratados (figura 10), estes não foram estatisticamente significativos.

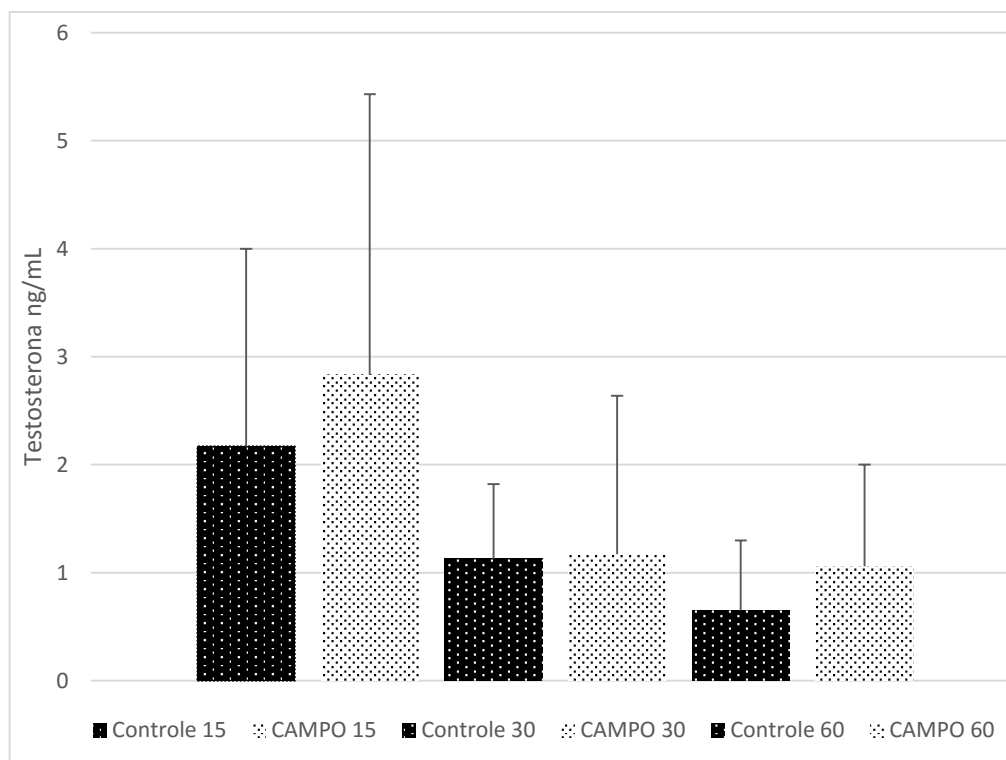


Figura 10: Níveis de testosterona (ng/ml). Os grupos estão organizados na figura da esquerda para direita: Animais controle 15 dias ($2,17 \pm 1,83$); Animais CEM 15 dias ($2,83 \pm 2,6$). Animais controle de 30 dias ($1,13 \pm 0,69$); Animais CEM 30 dias ($1,17 \pm 1,47$); Animais controle de 60 dias ($0,65 \pm 0,65$). Animais CEM 60 dias ($1,06 \pm 0,94$).

Tabela 4. Níveis de testosterona plasmática (ng/mL) em ratos Wistar após 15, 30 e 60 dias de exposição ao CEM de 27,12 MHz em exposições de 15 minutos por dia (Média $\pm$ desvio padrão). * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Exposição	Controle (n=8)	Exposto (n=8)	P
15 dias	2,17 $\pm$ 1,83	2,83 $\pm$ 2,60(25%)	0,99
30 dias	0,88 $\pm$ 0,74	1,20 $\pm$ 1,45(26%)	0,79
60 dias	0,65 $\pm$ 0,65	1,06 $\pm$ 0,94(39%)	0,20

4.3. Peso de órgãos

O peso dos órgãos dos ratos Wistar expostos ao CEM durante 15, 30 e 60 dias estão registrados nas tabelas 5, 6 e 7 respectivamente. Não foram encontradas mudanças na pesagem dos órgãos após os 15 e 30 dias de exposição ao CEM. Ao verificar os pesos dos órgãos após 60 dias de irradiação, foi identificado redução significativa no peso da próstata quando comparado aos demais animais.

Tabela 5. Peso em gramas de órgãos em ratos Wistar adultos submetidos a campos eletromagnéticos de ondas curtas durante 15 dias (Média $\pm$ desvio padrão). IGS = Índice Gonadossomático. Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Peso (g)	Controle (n=8)	Exposto 15 dias (n=8)	P
Testículo	1,62 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,06	0,27
Líquido do testículo	1,52 $\pm$ 0,06	1,48 $\pm$ 0,06	0,28
Epidídimo	0,63 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,04	0,87
Próstata	0,75 $\pm$ 0,30	0,77 $\pm$ 0,13	0,27
Vesícula Seminal	1,49 $\pm$ 0,25	1,53 $\pm$ 0,16	0,72
IGS ($\times 10^{-3}$)	4,70 $\pm$ 0,53	4,60 $\pm$ 0,59	0,95

Tabela 6. Peso em gramas de órgãos em ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas durante 30 dias. IGS = Índice Gonadossomático. Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Peso (g)	Controle (n=8)	Exposto 30 dias (n=8)	P
Testículo	1,63 $\pm$ 0,25	1,69 $\pm$ 0,20	0,67
Líquido do testículo	1,53 $\pm$ 0,23	1,58 $\pm$ 0,19	0,87
Epidídimo	0,71 $\pm$ 0,12	0,74 $\pm$ 0,10	0,91
Próstata	0,74 $\pm$ 0,19	0,83 $\pm$ 0,13	0,33
Vesícula Seminal	1,81 $\pm$ 0,43	1,88 $\pm$ 0,28	0,95
IGS ($\times 10^{-3}$)	4,70 $\pm$ 0,40	4,60 $\pm$ 0,51	0,93

Tabela 7. Peso em gramas de órgãos em ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 60 dias (Média $\pm$ desvio padrão). IGS = Índice Gonadossomático. Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Peso (g)	Controle (n=8)	Exposto 60 dias (n=8)	P
Testículo	1,61 ± 0,16	1,56 ± 0,24	0,53
Líquido do testículo	1,50 ± 0,15	1,46 ± 0,23	0,52
Epidídimo	0,74 ± 0,05	0,78 ± 0,10	0,53
Próstata	0,81 ± 0,15	0,58 ± 0,14	0,01*
Vesícula Seminal	2,15 ± 0,30	2,02 ± 0,35	0,53
IGS (x 10 ⁻³)	4,30 ± 0,44	4,40 ± 0,29	0,92

A partir da análise dos pesos dos órgãos do sistema reprodutor não apresentou diferença significativa na maioria dos órgãos, após os períodos de 15, 30 e 60 dias de exposição. O peso da próstata foi o único destes que se verificou uma redução após o período de 15 e 60 dias de exposição, sendo estatisticamente significativa nos animais irradiados por 60 dias consecutivos (tabela 7).

Na análise dos testículos, não houveram alterações significativas nos volumes dos componentes, no entanto verificou-se alterações significativas na túnica própria dos animais expostos aos campos eletromagnéticos após os 15 dias (tabela 8) e após os 60 dias (tabela 10), mas estas alterações não foram observadas quando contabilizado as medidas nos animais expostos por 30 dias (tabela 9).

Tabela 8. Volume (µL) dos componentes testiculares de ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 15 dias (Média ± desvio padrão). * Estatisticamente significativo (p<0,05).

	Controle (n=8)	Exposto 15dias ao CEM (n=8)	p
Peso líquido do testículo (g)	1,52 ± 0,06	1,48 ± 0,06	0,280
Túbulo seminífero	385,82 ± 7,13	386,24 ± 9,19	0,790
Epitélio seminífero	350,29 ± 9,62	352,38 ± 5,88	0,870
Lume	33,50 ± 9,74	30,71 ± 4,37	0,380
Túnica própria	2,01 ± 0,77	3,14 ± 0,46	0,003*
Células de Leydig	17,83 ± 0,82	16,12 ± 0,82	0,270
Tecido Conjuntivo	1,17 ± 0,50	1,43 ± 0,93	0,870
Vasos Sanguíneos	8,40 ± 3,51	6,73 ± 3,86	0,500
Espaço Linfático	27,77 ± 4,52	30,46 ± 5,66	0,440

Espaço Intertubular	55,18 ± 7,13	54,60 ± 9,18	0,720
----------------------------	--------------	--------------	-------

Tabela 9. Volume (μL) dos componentes testiculares de ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 30 dias (Média ± desvio padrão). * Estatisticamente significativo (p<0,05).

	Controle (n=8)	Exposto 30 dias (n=8)	P
Peso líquido do testículo (g)	1,53 ± 0,23	1,58 ± 0,19	0,87
Túbulo seminífero	380,55 ± 14,09	376,08 ± 11,28	0,44
Epitélio seminífero	351,31 ± 15,04	340,69 ± 13,19	0,19
Lume	28,12 ± 12,25	33,95 ± 5,80	0,44
Túnica própria	1,11 ± 0,46	1,43 ± 0,73	0,37
Células de Leydig	15,83 ± 2,02	15,23 ± 2,92	0,57
Tecido Conjuntivo	3,84 ± 1,91	3,57 ± 1,02	0,95
Vasos Sanguíneos	9,15 ± 4,62	11,09 ± 5,05	0,38
Espaço Linfático	31,61 ± 8,76	35,20 ± 6,63	0,34
Espaço Intertubular	60,45 ± 14,09	65,10 ± 11,26	0,44

Tabela 10. Volume (μL) dos componentes testiculares de ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 60 dias (Média ± desvio padrão). * Estatisticamente significativo (p<0,05).

	Controle (n=8)	Exposto 60 dias (n=8)	p
Peso líquido do testículo (g)	1,50 ± 0,15	1,46 ± 0,23	0,52
Túbulo seminífero	392,21 ± 7,66	389,13 ± 18,80	0,95
Epitélio seminífero	359,43 ± 12,38	361,25 ± 24,98	0,39
Lume	29,50 ± 9,96	22,83 ± 8,65	0,33
Túnica própria	3,28 ± 0,61	5,04 ± 1,73	0,01*
Células de Leydig	16,50 ± 2,54	17,19 ± 3,28	0,99
Tecido Conjuntivo	2,24 ± 1,00	3,09 ± 1,70	0,35
Vasos Sanguíneos	4,28 ± 2,79	3,88 ± 2,66	0,86
Espaço Linfático	25,76 ± 3,42	27,51 ± 17,84	0,28
Espaço Intertubular	48,79 ± 7,66	51,69 ± 18,70	0,86

Nas tabelas 11, 12 e 13 podemos observar os dados referentes aos parâmetros espermáticos após 15, 30 e 60 dias de exposição, não se observou alterações no diâmetro tubular, áreas do túbulo (exceto nos animais expostos a 30 dias), epitélio germinativo, altura do epitélio nos tempos estudados.

Há tendência de aumento da produção espermática quando comparado aos seus controles. Por outro lado, constatou-se aumento estatisticamente significativo da produção espermática por grama do testículo nos animais expostos durante 15 dias.

Tabela 11. Parâmetros morfométricos testiculares de ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 15 dias (Média $\pm$ desvio padrão). * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

	Controle (n=8)	Exposto 15 dias (n=8)	P
Comprimento tubular (m)	14,96 $\pm$ 2,30	16,50 $\pm$ 2,53	0,28
Diâmetro Tubular (μm)	338,61 $\pm$ 21,35	291,07 $\pm$ 81,05	0,10
Altura de Epitélio(μm)	114,81 $\pm$ 19,88	146,96 $\pm$ 33,05	0,10
Área tubular (μm^2) $\times 10^5$	90,00 $\pm$ 1,10	71,00 $\pm$ 2,80	0,13
Área epitelial (μm^2) $\times 10^3$	79,60 $\pm$ 1,28	75,40 $\pm$ 1,06	0,72
C. Sertoli / secção transvers	5,43 $\pm$ 0,36	5,51 $\pm$ 0,39	0,44
População Sertoli $\times 10^6$	20,00 $\pm$ 3,20	51,00 $\pm$ 8,20	0,19
ICS	8,10 $\pm$ 1,56	8,40 $\pm$ 0,79	0,32
PED $\times 10^6$	12,00 $\pm$ 2,50	14,00 $\pm$ 2,10	0,09
PED/g $\times 10^5$	8,00 $\pm$ 1,40	9,60 $\pm$ 1,50	0,03*

Tabela 12. Parâmetros espermáticos de ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 30 dias (Média $\pm$ desvio padrão). * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

	Controle (n=8)	Exposto 30 dias (n=8)	P
Comprimento tubular (m)	15,57 $\pm$ 3,83	16,49 $\pm$ 2,72	0,440
Diâmetro Tubular (μm)	331,21 $\pm$ 16,90	324,50 $\pm$ 14,57	0,380
Altura de Epitélio(μm)	106,30 $\pm$ 3,78	102,73 $\pm$ 5,62	0,230
Área tubular (μm^2) $\times 10^5$	86,00 $\pm$ 8,40	82,00 $\pm$ 7,40	0,390

Área epitelial (μm^2) $\times 10^3$	78,60 $\pm$ 7,28	77,80 $\pm$ 7,93	0,001*
C. Sertoli / secção transversal	5,67 $\pm$ 0,44	5,69 $\pm$ 0,38	0,750
População Sertoli $\times 10^6$	22,00 $\pm$ 6,00	23,00 $\pm$ 3,20	0,640
ICS	8,53 $\pm$ 1,66	9,04 $\pm$ 1,15	0,570
PED $\times 10^6$	14,00 $\pm$ 3,00	16,00 $\pm$ 3,90	0,450
PED/g $\times 10^6$	8,90 $\pm$ 1,10	9,90 $\pm$ 1,60	0,230

Tabela 13. Parâmetros espermáticos de ratos Wistar adultos submetidos a Campos Eletromagnéticos de ondas curtas (27,12 Mhz) durante 15 minutos uma vez ao dia durante 60 dias (Média $\pm$ desvio padrão). * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

	Controle (n=8)	Exposto 60 dias (n=8)	P
Comprimento tubular (m)	15,18 $\pm$ 1,85	14,04 $\pm$ 2,23	0,39
Diâmetro Tubular (μm)	335,97 $\pm$ 18,88	341,97 $\pm$ 13,66	0,69
Altura de Epitélio (μm)	111,73 $\pm$ 9,13	103,74 $\pm$ 4,63	0,15
Área tubular (μm^2) $\times 10^5$	88,00 $\pm$ 1,00	91,00 $\pm$ 7,20	0,66
Área epitelial (μm^2) $\times 10^3$	82,10 $\pm$ 1,01	81,90 $\pm$ 4,55	0,90
C. Sertoli / secção transversal	5,72 $\pm$ 0,29	5,78 $\pm$ 0,37	0,68
População Sertoli $\times 10^6$	21,00 $\pm$ 2,80	20,00 $\pm$ 4,30	0,46
ICS	8,38 $\pm$ 1,15	9,21 $\pm$ 1,54	0,33
PED $\times 10^6$	13,00 $\pm$ 2,10	14,00 $\pm$ 2,70	0,25
PED/g $\times 10^6$	9,00 $\pm$ 1,40	9,50 $\pm$ 1,70	0,53

4.4. Volumes e Populações de células de Leydig

As células de Leydig apresentaram um aumento de seus volumes, sendo cerca de 45% de aumento para os grupos expostos por 15 dias, 31,6% de aumento por 30 dias de exposição. No entanto os animais irradiados por 60 dias contínuos houve redução dos volumes das células de Leydig em cerca de 36,2%. Conforme demonstrado nas tabelas 14, 15 e 16 e esquematizado na figura 11.

Os animais submetidos ao CEM apresentaram reduções nas populações totais e por grama de testículo, das células de Leydig após 15 dias (53,1%) e 30 dias (22%) de irradiação, mas ocorreu um aumento dos

números totais de células de Leydig em 65,5% após o período de 60 dias de exposição. Para a população de células de Leydig por grama de testículo observou-se mudanças semelhantes nos parâmetros, uma diminuição destas populações em 15 dias (37,8%) e em 30 dias (24,7%), com um aumento desta população por grama após 60 dias de exposição (67,8%). Valores observados nas tabelas sobre os volumes das células de Leydig (tabela14) e nas tabelas sobre as populações de células de Leydig (tabelas 15 e 16 e representados nas figuras 12 e 13.

Tabela 14. Volume e população de células de Leydig de ratos wistar submetidos a CEM de 27,12 MHz durante 15 dias. media $\pm$ desvio padrão.* Estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

	Grupo Controle (n=8)	Exposto por 15 dias (n=8)	P
Volume das Células de Leydig	826,26 $\pm$ 113,98	1205,2 $\pm$ 572,51	0,0370*
População de células de Leydig por testículo ($\times 10^7$)	10,70 $\pm$ 2,19	5,01 $\pm$ 1,44	0,0002*
População de células de Leydig por grama ($\times 10^7$)	7,07 $\pm$ 1,32	3,38 $\pm$ 0,96	0,0002*

Tabela 15. Volume e população de células de Leydig de ratos wistar submetidos a CEM de 27,12 MHz durante 30 dias. media $\pm$ desvio padrão.* Estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

	Grupo Controle (n=8)	Exposto por 30 dias ao CEM (n=8)	P
Volume das Célula de Leydig	884,35 $\pm$ 221,73	1163,87 $\pm$ 307,84	0,0002*
População de células de Leydig por testículo ($\times 10^7$)	6,50 $\pm$ 1,70	5,04 $\pm$ 1,88	0,19400
População de células de Leydig por grama ($\times 10^7$)	4,20 $\pm$ 0,73	3,16 $\pm$ 1,05	0,03000*

Tabela 16. Volume e população de células de Leydig de ratos wistar submetidos a CEM de 27,12 MHz durante 60 dias. media $\pm$ desvio padrão.* Estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

	Grupo Controle (n=8)	Exposto por 60 dias ao CEM (n=8)	P
Volume da Célula das Leydig	859,62 $\pm$ 78,98	547,79 $\pm$ 78,66	0,0003*
População de células de Leydig por testículo ($\times 10^7$)	6,65 $\pm$ 1,51	11,01 $\pm$ 4,56	0,0400*
População de células de Leydig por grama ($\times 10^7$)	4,38 $\pm$ 0,77	7,35 $\pm$ 2,13	0,0090*

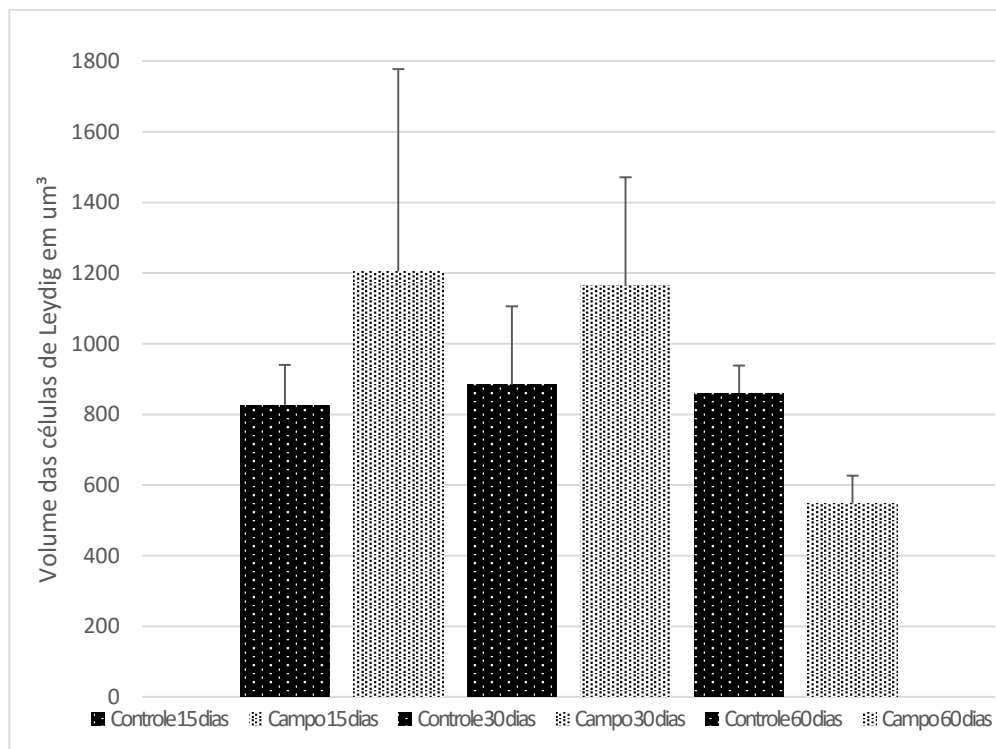


Figura 11: Volume médio das células de Leydig de ratos wistar expostos A CEM de 27,12 MHz após 15, 30 E 60 dias. Mostra-se na diferença dos volumes das células de Leydig, expesso em μm^3 .

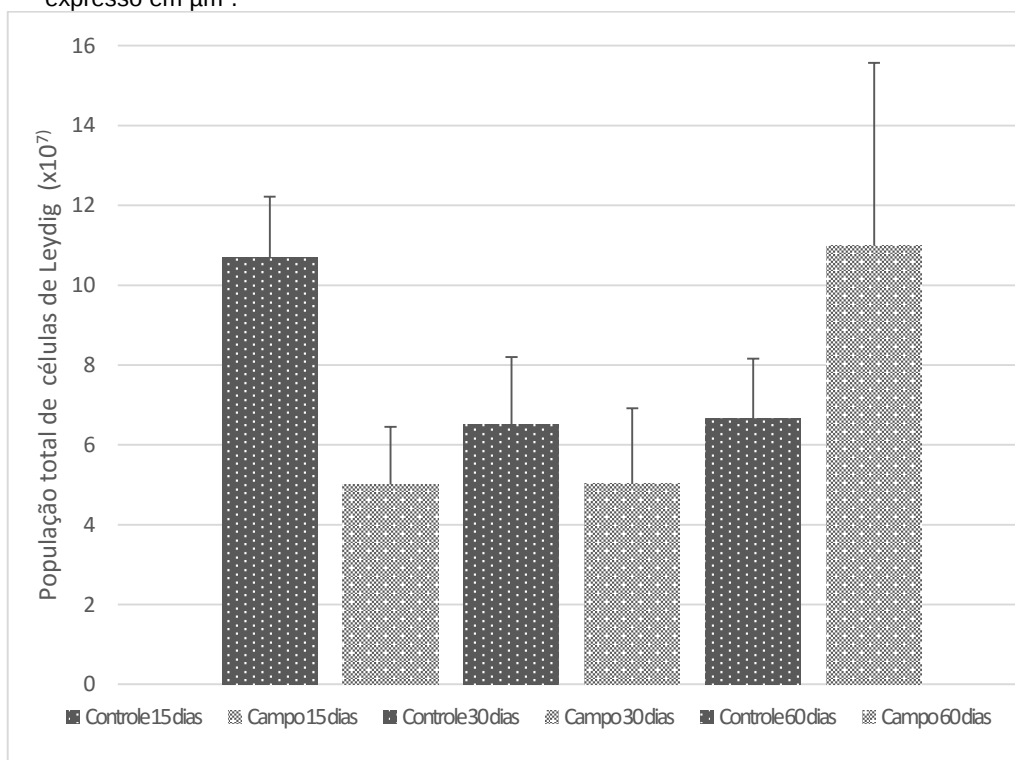


Figura 12: População total de células de Leydig em animais expostos ao CEM de 27,12MHz e seus respectivos Controles. (valores expressos em $\times 10^7$).

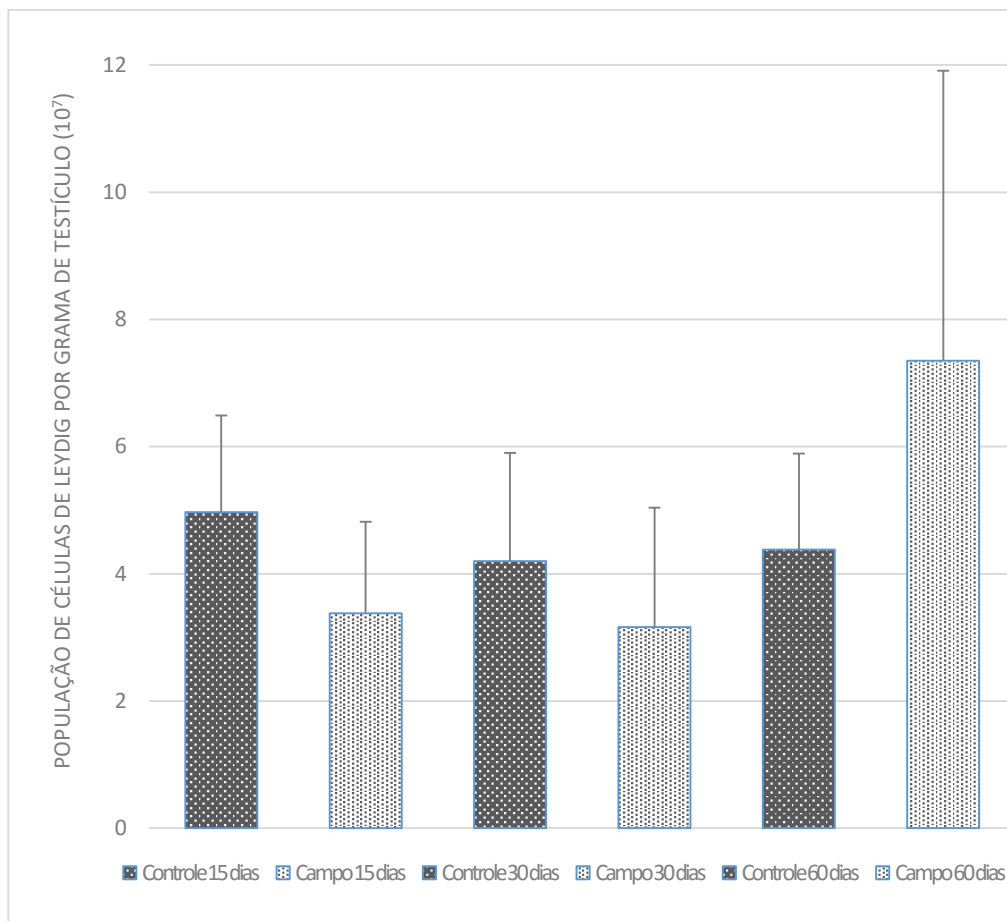


Figura 13: População total de células de Leydig por grama de testículo em animais expostos ao CEM de 27,12MHz e seus respectivos Controles. (valores expressos em $\times 10^7$).

4.5. Análise Histopatológica

A análise do parênquima testicular apresentaram poucas diferenças entre os animais expostos e os seus respectivos controles, foi observado um espessamento na túnica própria dos animais irradiados por 15 e 60 dias, no entanto não verificou-se nenhum achado que pudesse indicar lesão histológica ou indicativo de patologias, como vacualizações, formação de células gigantes, aspectos descamativos, neoplasias, ou mudanças nas concentrações intertubular de vasos sanguíneos, bem como não se identificou diminuição da área e altura do epitélio germinativo. Demonstrado nas figuras 14,15 e 16 em anexo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Peso corporal e o campo eletromagnético

Alguns autores submeteram os animais aos campos eletromagnéticos de diversas ordens e alguns deles avaliaram as mudanças na pesagem dos animais, como Aydin et al. (2007) utilizou o campo de 50Hz gerado por linhas de alta tensão durante o período de um a três meses e não identificou alterações do peso dos órgãos e dimensões do sistema reprodutor. Assim como o estudo de Tenório et al. (2011a) utilizando CEM de 60Hz e 1mT em exposições diárias não identificou mudança ponderal em animais adultos. Neste estudo foi demonstrado que embora tenha havido tendência de aumento nas médias de peso dos animais expostos por 15 e 30 dias, e uma redução da média do peso corporal dos animais submetidos a períodos mais longos de exposição mesmo esse não sendo estatisticamente significativo. Desta forma, aumentando o tempo de exposição diária ou mesmo a utilização da emissão contínua do campo eletromagnético de 27,12MHz e comprimento de onda de 11,02mT poderia surtir maiores efeitos devido ao aquecimento corporal produzido por este tipo de campo.

A tendência de variação corporal observada no presente experimento, pode ter sido por influência em outros tecidos, como os demais tipos de CEM também afetam outros sistemas, como muscular, conforme Canata; Frieri e Pugliese, (1982) *apud* Tenório et al. (2011b), ou o próprio CEM de ondas curtas afetando o tecido ósseo (MANJHI, 2009).

Neste trabalho não foi observada diferenças nos pesos testiculares totais, ou nos pesos líquidos dos testículos. O peso testicular fundamental na função reprodutiva, pois está relacionada à produção de espermatozóides (FRANÇA E RUSSELL, 1998). Tenório (2010) embora não tenha observado mudanças no peso testicular, identificou mudanças nos parâmetros espermáticos nos animais expostos, demonstrando que outros fatores exógenos podem estar relacionados ao estresse, como

choque térmico, e assim representar maior susceptibilidade do testículo aos efeitos da radiação dos campos eletromagnéticos.

A degeneração testicular pode se refletir como a deteriorização da estrutura testicular e conseqüentemente perda de sua função (TURNER, 2007). Apesar da redução do peso testicular, alguns estudos não observaram mudanças na produção de espermatozóides ou na eficiência da espermatogênese (TENÓRIO, 2011a).

A redução do peso testicular pode ser indicativo da debilidade da espermatogênese observada nos animais expostos por 30 e 60 dias, no entanto Tenório (2013) concordou com os achados deste trabalho com a irradiação pelo campo de 27,12MHz, onde no seu estudo em irradiação com 60Hz não observou mudança significativa no peso testicular em ratos adultos submetidos ao campo de baixa frequência desde o período da gestação, no entanto sua pesquisa identificou alguns fatores que podem comprometer a fertilidade.

5.2. Alterações na Pesagem da Próstata.

A próstata é fundamental na reprodução pois excreta os fluidos necessários para manutenção do esperma (HAYWARD, 2000; WILSON 2002). Campos eletromagnéticos de 60Hz produziram alterações sobre as células prostáticas, relacionadas ao crescimento celular e apoptose, sendo um possível agente indutor de câncer neste órgão (KOH et al., 2008).

Os animais submetidos ao CEM de 27,12 MHz apresentaram um aumento do peso prostático após os 15 e 30 dias de irradiação, no entanto, houve uma redução significativa do peso prostático no animais após os 60 dias de irradiação, em contraste, houve aumento da dosagem de testosterona plasmática neste período. Uma vez que a próstata é um órgão andrógeno-dependente, sendo assim depende da testosterona para seu crescimento, diferenciação e manutenção da estrutura e integridade funcional; neste órgão ocorre a conversão da testosterona ao seu metabólito mais ativo, 5 α -diidrotestosterona (LEE E JANULIS, 1998). A

perda de peso deste órgão pode estar relacionada com a redução dos níveis de testosterona, embora neste estudo não foi observado esta relação para os animais expostos após 60 dias contínuos.

5.3. Testosterona plasmática

Os níveis séricos de testosterona não diferiram com valores estatísticos entre os grupos nos diferentes tempos de exposição ao CEM. Mas observa-se que os animais submetidos a 15 dias tiveram uma tendência de aumento de 25%, já os animais expostos por 30 dias, também tiveram tendência de 26% de aumento, e os animais irradiados por 60 dias observou-se um aumento de 39%. Os valores podem estar relacionados com as alterações nas células de Leydig ou algum outro fator intrínseco do testículo como mecanismo compensatório.

Alguns autores como Kato et al. (1994) não observaram alterações nos níveis plasmáticos de testosterona em animais expostos ao campo de 50Hz de 1, 5 ou 50mT durante 6 semanas consecutivas. Já na sua pesquisa Forgács et al. (1998) também estudando efeito dos campos magnéticos de 50 Hz e 100 descobriu que estes podem estimular a produção de testosterona basal de rato em cultura primária de células de Leydig. No entanto, Al-Akhras et al. (2006), achou que em ratos machos adultos expostos a 50 Hz de campo magnético, que os níveis de testosterona diminuíram significativamente apenas após 6 e 12 semanas de exposição.

Há uma relação direta entre os níveis de testosterona plasmática e o volume das células de Leydig (EWING E KEENEY, 1993;. FRANÇA et al, 2005), uma vez que estas células apresentam grandes volumes de seus retículos endoplasmático, tendo correlação entre sua estrutura e função esteroidogênica (ZIRKIN et al., 1980).

Alguns estudos como o de Cleary (1995), demonstraram uma atuação direta do CEM de baixa frequência na membrana celular, influenciando no metabolismo celular, bem como nas respostas intracelulares. Neste estudo essa atividade do CEM de 27,12MHz aparenta

ter efeitos semelhantes nas células intersticiais, mas não nas células intratubulares do epitélio seminífero.

5.4. População e volumes das células de Leydig

As células de Leydig apresentaram aumento nos volumes celulares e estas alterações podem ter ocorrido como um mecanismo compensatório para decorrente diminuição das populações totais e por grama de testículo destas células, esta relação foi observada nos períodos de exposição por 15 e 30 dias consecutivos.

Da mesma forma nos estudos de Tenório (2013), os campos de baixa frequência (60Hz), a testosterona plasmática não sofreu alterações após 15, 30 e 60 dias de exposição, embora em condições fisiológicas esta testosterona esteja diretamente relacionada ao tamanho e ao número de células de Leydig. Este mesmo estudo concordando com seus estudos anteriores sobre campos de baixa frequência a testosterona plasmática parece concordar com o volume das células de Leydig, que devido a pequena variação deste hormônio, parece não ter interferido nestas células em suas capacidades estereoidogênicas. (Tenório 2011a, 2012)

As células de Leydig apresentam cinco células na sua linhagem (células precursoras mesenquimais, células progenitoras, novas formas adultas, células de Leydig imaturas e células de Leydig maduras) e que estas células são influenciadas por diversos fatores hormonais, como os fatores de crescimento (IGF-1, TGF α e TGF β) que estimulam as mitoses das células de Leydig quando na presença do LH (ARIYARATNE e MENDIS-HANDAGAMA, 2001). As células de Leydig produzem a maior parte da testosterona testicular e estas, atuam nos túbulos seminíferos. Apresentando um sistema de retroalimentação negativa com a glândula pituitária e hipotálamo no controle da testosterona (CARL, ASHWOOD e BRUNS, 2006).

Há uma relação linear entre os níveis de testosterona circulante com o número e o tamanho das células de Leydig, bem como do volume do retículo endoplasmático nestas células, uma vez que estes são bons

indicativos da capacidade destas células produzirem testosterona (FRANÇA et al., 2005).

Embora não tenham ocorrido respostas significativas na testosterona plasmática após os 60 dias de exposição ao CEM de ondas curtas, entre os grupos controles e tratados. Após este período, houve aumento das populações destas células e redução do volume das células de Leydig, mesmo tendo apresentado um aumento da testosterona no período de 60 dias de exposição.

Nos animais expostos ao CEM durante 60 dias, foi observado uma diminuição de 36,2% dos volumes das células de Leydig e de forma compensatória apresentaram aumentos nos números de células de Leydig por grama de testículo (67,8%) e na população total (65,5%), de forma estatisticamente significativa.

Meo, Al-drees e Husain (2010), demonstraram que as concentrações de testosterona e FSH diminuíram com 3 e 6 semanas de exposição à radiação de telefonia celular (900MHz), já na comparação entre a terceira e a sexta semana, a testosterona diminuiu enquanto o FSH aumentou quando comparado após essas três semanas.

Há evidências que o CEM de radiofrequência utilizado em telefonia celular reduz os níveis séricos de testosterona, promove retração do túbulo seminífero e redução da motilidade e contagem dos espermatozóides. É também possível que ocorram alterações na função das células de Leydig diminuindo os níveis de testosterona nos testículos, podendo gerar infertilidade (KESARI, 2013).

No trabalho de Tenório (2010) com campos de 60Hz, apresentou um aumento da população das células de Leydig e redução do volume dessas células sugerindo que esta resposta pode representar algum mecanismo compensatório, afim de manter os níveis séricos de testosterona e a concentração da área que estas células ocupam no espaço intertubular, contudo ao examinar através da microscopia eletrônica, demonstrou haver lesões patológicas em algumas das células de Leydig.

Hardy (2008), relata haver maior concentração de testosterona intratesticular nas células maduras de Leydig em prol do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, e das suas influências na espermatogênese. Sugerindo que os campos eletromagnéticos poderiam apresentar alterações mais significativas em ratos mais jovens quando comparado aos adultos, pois neste estudo todos os animais já iniciaram a exposição na fase adulta.

5.5. Histomorfometria testicular

Neste estudo, um achado interessante foi o aumento na produção espermática em todos os grupos tratados 15, 30 e 60 dias quando comparados aos seus respectivos controles, e de forma mais evidente, foi o aumento da produção espermática diária por grama do testículo no grupo de animais expostos ao Campo de 27,12 MHz durante 15 dias consecutivos, cujos valores tiveram significância estatística.

Em seu estudo Tenório, (2011a) observou redução significativa no volume do epitélio do lume dos túbulos seminíferos, porém não encontraram lesões que indicassem alterações patológicas nos testículos de ratos expostos a CEM de baixa frequência. Já Ozguner, (2002), demonstrou a influência do campo de 50Hz por 10 dias na diminuição da população das células germinativas, neste caso. Observaram a exposição após o choque térmico, mas não avaliaram o testículo em sua regeneração e sim a influência de alterações prévias que podem aumentar a sensibilidade dos testículos ao campo.

Em outros estudos com campos de baixa frequência, Tenório (2013) verificou algumas mudanças nos parâmetros morfométricos em animais expostos por 15 dias como redução do espaço ocupado pelos túbulos seminíferos, relacionados a descamação do epitélio seminífero, após 30 dias também observou redução do espaço linfático e intertubular e dos vasos sanguíneos, neste período também houve aumento da túnica própria, Com a exposição por 60 dias contínuos apresentaram redução do volume túbulo e epitélio seminífero, bem como aumento do volume tubular,

espaço linfático e intertubular, e das células do tecido conectivo, o que concorda com este trabalho no que se refere ao espessamento da túnica própria encontrado nos animais expostos após os 15 e 60 dias.

Analisando os parâmetros histomorfométricos nos animais adultos como a altura do epitélio seminífero, a quantidade de células de Sertoli por secção transversal, o peso líquido dos testículos revelaram não haver alterações estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Bem como, não houve alterações com relevância estatística para a população de células de Sertoli, o ICS, nem mesmo nas produções espermáticas por grama de testículo. Não houve nenhuma alteração estatística dos componentes testiculares na proporção volumétrica.

Neste estudo não foram observadas alterações em praticamente todas as pesagens dos órgãos de forma relevante, nem do índice gonadosomático (IGS), não influenciando na nos parâmetros morfométricos, no entanto a espermatogênese demonstrou uma tendência de aumento na produção nos animais expostos, embora tenha sido observado aumento significativo da túnica própria nos animais expostos ao CEM por 15 e 60 dias, que pode estar relacionado com outro fator de regulação da espermatogênese ou mesmo influência do campo em alguma região celular distinta. Estas alterações podem estar relacionadas com o espessamento do túbulo ou mesmo alteração na barreira hemato-testicular e pode ter apresentado uma alteração em alguma outra fase do ciclo do epitélio germinativo.

Nessa pesquisa, em ambos os grupos de 15 e 60 dias consecutivos não demonstraram alterações na contagem das células de Sertoli, mas um indicativo que estas podem ter sofrido alguma influência do campo de ondas curtas, pois observou-se variações nas populações das células de Leydig e estas apresentam relações com as células de Sertoli. Estas células tendem a ser os objetivos finais dos andrógenos, esta interação começa a acontecer pelos receptores androgênicos (AR), estes receptores modulam a concentração de testosterona intracelular (ITT) e estão relacionados com a manutenção, vida ou morte das células germinativas

(HILL et al., 2004), o que pode ter ocasionado aumento na produção espermática.

No estudo de Tenório (2010) demonstrou com sua análise histomorfométrica que CEM de 60Hz parece interferir na formação da barreira hematotesticular. Estas apresentam áreas que são especializações formadas também por junções de oclusões (HOLSTEIN et al., 2003). Os campos eletromagnéticos aparentam ter um efeito sobre os tecidos de conexões, estas apresentam diferentes mecanismos regulatórios entre estímulos químicos e mecânicos, diferentes tipos de enzimas quinases podem também estar presentes, alguma proteína associada LIKE L (Saha et al., 2001) ou proteínas de canais dependente de Ca^{+2} , que regulam a permeabilidade e resistência entre os epitélios adjacentes (ITALLIE VAN et al., 1995).

Os campos elétricos e magnéticos podem afetar diferentes mecanismos mediados por canais de íons Ca^{+2} (TONINI et al., 2001; MANIKONDA et al., 2007), é possível que em animais expostos no período de desenvolvimento embrionário tenham havido atrasos na formação de junções de oclusão promovido CEM de 60 Hz e estes estejam relacionados com o sistema de proteínas de canais dependente de Ca^{+2} (TENÓRIO, 2011b), como o campo de ondas curtas podem estimular a membrana celular na absorção de íons, podendo apresentar respostas relacionadas com a absorção de Ca^{+2} pelas membranas a partir do CEM de 27,12MHz (MANJHI, 2009).

A produção espermática diária variou entre 13 e 16 milhões, embora alguns autores relatarem dados para produção diária como França et al. (2005), que indica que a produção espermática diária normal em ratos é de 17 a 24 milhões de espermatozoides, mas não específica a idade dos animais. Outras pesquisas indicam uma relativa diminuição na espermatogênese através da análise quantitativa de túbulos seminíferos expostos a CEM (LEE et al., 2004). Neste estudo embora tenha havida uma variação entre os parâmetros pré-estabelecidos na literatura, mas com o comparativo em grupos de mesmo período, demonstrou uma tendência de aumento desta produção nos animais submetidos ao campo de ondas curtas.

5.6. Análise histopatológica

Alguns autores concordam com a informação de que os campos eletromagnéticos de baixa frequência podem promover alterações degenerativas no epitélio germinativo e desta forma, impedir ou reduzir a fertilidade, como nos estudos de De Vita et al. (1995), onde o campo de 50Hz induziu alterações na diferenciação das espermatogônias, sugerindo que estas células podem apresentar afinidade por estímulos distintos, como por exemplo a radiação não ionizante em frequência específica. Para Al-Akhras et al., (2001) além da especificidade celular, as variáveis bioeletromagnéticas podem estar relacionadas as linhagens dos animais.

Alguns fatores relacionados a influência dos campos eletromagnéticos podem gerar degeneração tecidual como a desestruturação do citoesqueleto quebrando as junções intercelulares de Sertoli com as células germinativas (TUNER, 2007). Tal fato pode provocar descamações do epitélio e aumento na apoptose dessas células (LEE et al., 2004; KIM et al., 2009).

Apesar de alguns estudos mostrarem alterações degenerativas no epitélio germinativo, neste trabalho não foi encontrado nenhum aspecto de descamação, degeneração e/ou má formação, como células polinucleadas gigantes, em nenhum dos grupos avaliados, desta forma o CEM de ondas curtas de 27,12 MHz durante aplicações diárias de 15 minutos não foi capaz de promover aspectos de degeneração ou do epitélio germinativo.

Outros estudos demonstraram que o CEM não promoveu alterações nos parâmetros espermáticos em ratos, como a pesquisa de Chung et al. (2005) que embora tenha sido um campo de baixa frequência e alta intensidade 5, 83.3 e 500mT mas de dose única, não encontraram respostas de lesões ou aspectos degenerativos sobre a espermatogênese em ratos adultos expostos a CEM de 60 Hz. Bem como nos estudos de Heredia-Rojas et. al. (2004), também não encontraram alterações na morfologia espermática que indicasse infertilidade.

Em um outro estudo foi observado um aumento significativo dos diâmetros dos túbulos seminíferos (DASDAG et al., 1999). Há também nas

pesquisas de Dasdag et. al. (2008), onde utilizaram os campos eletromagnéticos de alta frequência (telefonia celular), e avaliaram as apoptoses das espermatogônias e não identificaram diferenças significativas. No entanto, Ozguner et. Al. (2005), também realizando pesquisa com frequência de telefonia móvel, verificou diminuição significativa dos diâmetros tubulares e dos níveis de testosterona.

No estudo de Çelik et. al. (2012), cuja avaliação de 30 animais submetidos as radiações eletromagnéticas, observaram espessamento da lâmina própria, bem como aumento na densidade das fibras de colágeno e membranas celulares de contornos irregulares, observados via microscopia eletrônica. Mesmo não havendo diferenças significativas nos túbulos seminíferos a microscopia óptica.

Em campos eletromagnéticos de altíssimas frequências (30-300GHz), mostrou-se que os ratos expostos por 15 minutos diários, promoveu alterações da linhagem espermática, como polifomorfismo e degeneração dos espermatozoides (SUBBOTINA et. al., 2006). Bem como Yan et. al. (2007) demonstraram que o aumento da incidência de lesões testiculares pode estar relacionado ao tempo de exposição, pois em seu trabalho irradiou os animais com o CEM (1,9GHz) por 3 horas diárias, e observou maiores deformações e número de espermatozoides mortos. Logo, alguns fatores podem influenciar as respostas dos tecidos ao campo de ondas curtas como a dosagem de densidade de campo, a frequência utilizada, o tempo de exposição diário, fatores externos ou alguma patologia prévia podem ser primordiais na influência dos campos eletromagnéticos sobre os tecidos.

6. CONCLUSÕES

1. O CEM mostrou diferenças nas médias dos pesos dos animais para os grupos expostos por 15, 30 e 60 dias.
2. Houve diminuição no peso prostático após 60 dias de exposição ao CEM.

3. O ondas curtas promoveu aumento da testosterona plasmática entre os grupos exposto de 15, 30 e 60 dias
4. O Campo atuou diretamente aumentando os volumes das células de Leydig durante 15 e 30 dias de exposição, e reduzindo suas populações.
5. A ação do campo eletromagnético de promoveu uma redução dos volumes das células de Leydig após 60 dias de exposição com redução das populações.
6. As análises histomorfométricas demonstraram que este CEM não induziu alterações significativas nos parâmetros das células germinativas.
7. O Campo do Ondas curtas não promoveu alterações no parênquima testicular, nem alterações histopatológicas.
8. O CEM não afetou a quantidade de células de Sertoli, o diâmetro tubular, a altura do epitélio seminífero, portanto não comprometeu a produção espermática dos animais expostos.

7. REFERÊNCIAS

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

ABNEY OT. The potential roles of estrogens in regulating leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v.64, p.610-617, 1999.

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.

AGARWAL A, DESAI NR, RUFFOLLI R, CARPI A, Lifestyle and testicular dysfunction: a brief update. **Biomed pharmacother**, v.23, n.5, p.369-77, 2008.

AKDAG MZ, BILGIN MH, DASDAG S, TUMER C. Alteration of nitric oxide production in rats exposed to a prolonged, extremely low-frequency magnetic field. **Electromagn Biol Med**, v.26, n.2, p.99-106, 2007.

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.

AL-DAMEGH MA. Rat testicular impairment induced by electromagnetic radiation from a conventional cellular telephone and the protective effects of the antioxidants vitamins C and E. **Clinics**, v.67, n.7, p.785-792, 2012.

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.

ARIYARATNE HBS, MENDIS-HANDAGAMA SML. Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal test. **Biology of reproduction**, v.65, p.660-71, 1962.

ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys**, v.3, p.219-24, 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, p. 178-183, 2007.

BALBANI, A.P.S.; KRAWCZYK, A.L. Impacto do uso do telefone celular na saúde de crianças e adolescentes. **Rev Paul Pediatr**, v.29,n.3, p.430-436, 2011.

BAUMAN DR, STECKELBROECK S, PEEHL DM, PENNING TM. Transcript Profiling If The Androgen Signal In Normal Prostate, Benign Prostatic Hyperplasia, And Prostate Cancer. **Endocrinology**, v.147, n.12, p.5806-5816, 2006.

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.

BRINGEL SS, JUNIOR AAA, AMORIM MJAA, BRITO LT, MORAIS RN, TORRES SM, TENORIO BM, SILVA JUNIOR VA. Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. **J. App. Toxicol**. 2011

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**. p. 93, 2004.

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

CARL AB, ASHWOOD ER, BRUNS DE. Tietz text book of clinical chemistry and molecular diagnostics, p.191-218, 2006.

CIRELLI G, MOREIRA PHC. Efeitos da diatermia por ondas curtas na amplitude de movimento e força muscular. **Rev. Biocienc. Taubaté**, v.12, n.3-4, p.137-142, 2006.

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 f1 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.

ÇELİK S, ARIDOGAN IA, IZOL V, ERDOĞAN S, POLAT S, DORAN S. An evaluation of the effects long-term cell phone use on the testes via light and electro microscope analysis. **Urology**, v.79, n.2, p.346-50, 2012.

DASDAG S, KETANI MA, AKDAG Z, ERSAY AR, SAI I, DEMIRTAS OC, CELİK MS. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. **Urol Res**, v.27, n.3, p.219-223, 1999.

DASDAG S, AKDAG MZ, ULUKAYA E, UZUNLAR AK, YEGIN D. Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats. **Arch. Med. Res.**, v.39, n.1, p.957-964, 2008.

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.

DESAI N, SHARMA R, MAKKER K, SABANEĞH E, AGARWAL A. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertil Steril.**, v.92, n.5, p.1626-1631, 2009.

DESAI NR, KESARI KK, AGARWAL A. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. **Reprod. Biol Endocrinol.**, v.7, p.114, 2009

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

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, 2005.

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.

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.

FORGÁCS Z, THURÓCZY G, PAKSY K, SZABÓ. Effect of sinusoidal 50 Hz magnetic field on the testosterone production of mouse primary Leydig cell culture. **Bioelectromagnetics** 19: 429–431. 1998

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. v.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.

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, p.211, 1995.

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

GUYTON AC, HALL JE, Tratado de fisiologia médica, 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara koogan SA; 2006.

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. p.350, 1996.

HARDELL, L ; CARLBERG, M; OHLSON, C.G; WESTBERG, H; ERIKSSON, M; HANSSON K. Use of cellular and cordless telephones and risk of testicular cancer. International. **Journal of Andrology**, v.30, p.115–122, 2007.

HARDY M, GE RS. Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat leydig cells. **Endocrinology**. v.9 p.139, 2008.

HAYWARD SW, CUNHA GR. The prostate: development and physiology. **Radio Clin North Am.**, v.38, p.14, 2000.

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.

HILL CM, ANWAY MD, ZIRKIN BR, BROWN TR. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat sertoli cells. **Biology of reproduction**, v.71. p.1348-1358, 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.

ICNIRP-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.

IARC, International Agency Research on Cancer. **Interphone study reports on mobile phone use and brain cancer risk**. IARC. Press Release n. 200, 2010.

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.

KESARI KK, BEHARI J. Fifty-gigahertz microwave exposure effects of radiations on rat brain. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.158, p.126-139, 2009.

KESARI KK, KUMAR S, BEHARI J. Mobile phone usage and male infertility in Wistar rats. **Indian J. Exp. Biol**, v.48, n.10, p.987-992, 2010.

KESARI KK, KUMAR S, BEHARI J. Effects of radiofrequency electromagnetic wave exposure from cellular phones on the reproductive pattern in male Wistar rats. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.164, n.4, p.546-559, 2011.

KESARI, K.K.; KUMAR, S.; NIRALA, J.; SIDDIQUI, H.; BEHARI, J. . Biophysical Evaluation of Radiofrequency Electromagnetic Field Effects on Male Reproductive Pattern. **Cell Biochem Biophys**, v.65, p.85–96, 2013.

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.

KIRSCHENBAUM A, LIU XH, YAO S, et al. Sex steroids have differential effects on growth and gene expression in primary human prostatic epithelial cell cultures derived from peripheral versus transition zones. **Carcinogenesis**. v.27, n.2, p. 216-224, 2005.

KITCHEN S, BAZIN S. **Eletroterapia de Clayton**. 10ª edição. Edt. Manole.1998.

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.

KOH, E.K.; RYU, B.K.; JEONG, D.Y.; BANG, I.S.; NAM, M.H.; CHAE, K.S. A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species. **Int J Radiat Biol**, v.84, n.11, p. 945-955, 2008.

KOTNIK T.; MIKLAVC D. Theoretical Evaluation of the Distributed Power Dissipation in Biological Cells Exposed to Electric Fields. **Bioelectromagnetics**, v.21, p.385-394, 2000.

KRUEGER-BECK, E.; SCHEEREN, E.M.; NETO G.N.N.; NOHAMA,P. Campos elétricos e magnéticos aplicados à regeneração nervosa periférica. **Revista de Neurociencias** 2010

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

KUMAR S, KESARI KK, BEHARI J. Synergistic effects of 2.45GHz and pulsed magnetic field on reproductive pattern of male wistar rats. **Clinics.**, v.66, n.7, p.1237-1245, 2011.

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.

LEE HJ, PACK JK, KIM TH, KIM N, CHOI HD, LEE JS, KIM SH, LEE YS. The effects of simultaneous combined exposure to CDMA and WCDMA electromagnetic fields on rat testicular function. **Bioelectromagn.** 2011.

LEE CH, AKIN-OLUGBADE O, KIRSCHENBAUM A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Rev biocienc. Taubaté**. v.12, n.3-4, p.132-142, 2006.

LEITGEB N, OMERSPAHIC A, NIEDERMAYR F. Expousure Of Non-Target Tissues In Medical Diathermy. **Bioelectromagnetics**, v.31. p.12-19, 2010.

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. **Ed. Advances in electromagnetic fields in living systems**. New York. vol.1, 1994.

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. v. 1, cap. 23, p. 1435-1488, 1994.

MANJHI J, MATHUR R, BEHARI J. Effects of low level capacitive-coupled pulsed electric field stimulation on mineral profile of weight-bearing bones in ovariectomized rats. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v.92, n.1, p.189-195, 2009.

MANIKONDA PK, RAJENDRA P, DEVENDRANATH D, GUNASEKARAN B, CHANNAKESHAHA, ARADHYA RSS, SASHIDHAR RB, SUBRAMANYAM C. Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca²⁺ signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** **413**: 145–149. 2007

MARCILIO, I.; HABERMANN, M.; GOUVEIA, N. Campos magnéticos de frequência extremamente baixa e efeitos na saúde: **revisão da literatura**. **Rev Bras Epidemiol.**, v.12, n.2, p.105-123, 2009.

MARKOV MS. Dosimetry of magnetic field in the radio frequency range. **Radio frequency radiation dosimetry**, p.239-245, 2000.

MASKEY, D.; PRADHANB,J.; ARYALC, B.; LEED, C; CHOIA, I.; PARKA, K.; HYUNG, B. K.; KIMA,M. J.;. Chronic 835-MHz radiofrequency exposure to mice hippocampus alters the distribution of calbindin and GFAP immunoreactivity. **Brainresearch**, p. 237–246, 2010.

MEO SA, AL-DREES AM, HUSAIN S. Effects of mobile phone on serum testosterone in wistar albino rats. **Saudi Medical Journal**, v.31, n.8, p.869-873, 2010.

MEO, S.A.; ARIF, M.; RASHIED, S.; KHAN, M.M.; VOHRA, M.S.; USMANI, A.M.; IMRAN, M.B.; AL-DREES, A.M. Hypospermatogenesis and

spermatozoa maturation arrest in rats induced by mobile phone radiation. **J Coll Physicians Surg Pak.**, v.21, n.5, p.262-265, 2011.

MENDIS-HANDAGAMA SLMC, SHARMA OP. Effects of neonatal administration of reversible goitrogen propylthiouracil on the testis interstitium in adult rats. **J. Reprod. Fertil.**, v.100, p.85-92, 1994.

MESSIAS IA, OKUNO E, COLACIOPPO S. Exposição Ocupacional De Fisioterapeutas Aos Campos Elétrico E Magnético E A Eficácia Das Gaiolas De Faraday. **Rev Panam Salud Publica**, v.30, n.4, p.309-316, 2011.

OLSON BM, JOHNSON LE, MCNEEL DG. The Androgen Receptor: A Biologically Relevant Vaccine Target For The Treatment Of Prostate Cancer. **Cancer Immunol.**, v.62, p.585-596, 2013.

OZGUNER M, KOYU A, CESUR G, URAL M, OZGUNER F, GOKCIMEN A, DELIBAS N. Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. **Saud Med J.**, v.26, n.3, p.111-117, 2005.

PELLETIER, R.M. Blood-tissue barriers in the male reproductive system. In: MARTÍNEZ-GARCÍA, F.M.; REGADERA, J. **Male reproduction. A multidisciplinary overview**, 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.

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.

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

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

RIBEIRO,E.P; RHODEN,E.L.; HORN, M . M.; RHODEN, C.; LIMA, L. P.; TONIOLO, L. . Effects of Subchronic Exposure to Radio Frequency From a Conventional Cellular Telephone on Testicular Function in Adult Rats. **The Journal Of Urology.**, v.177, p.395-399, 2007.

SAYGIN, M.; CALISKAN, S.; KARAHAN, N.; KOYU, A.; GUMRAL, N.; UGUZ, A. Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. **Toxicol Ind Health**, v.27, n.5, p.455-463, 2011.

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.

SHAN LX, HARDY MP. Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. **Endocrinology.** v.131. p.1107-14, 1992.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E.; NEILL, J.D. Ed. **The physiology of reproduction.** V.1, cap. 22, p. 1363-1434, 1994.

SHIELDS, N.; O'HARE,N.; BOYLE,G.; GORMLEY,J. Development and application of a quality control procedure for short-wave diathermy units. **Med. Biol. Eng. Comput**, v.41, p.62-68, 2003.

SHIELDS N, O'HARE N, GORMLEY J. An evaluation of safety guidelines to restrict exposure to stray radiofrequency radiation from short-wave diathermy units. **Phys. Med. Biol.**, v.49 (13): p.2999-3015, 2004.

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

SLINEY, D.H.; PATTERSON, R.M. Guidelines for exposure to sub-radiofrequency electric and magnetic fields. **International Radiation Protection Association (IRPA).** 2007.

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.

TENORIO BM^a, JIMENEZ GC, MORAIS RN, TORRES SM, NOGUEIRA RA, SILVA JUNIOR VA. Testicular development evaluation in rats exposed to 60Hz 1mT electromagnetic field. **Jornal Applied Toxicology**, v.31: p.223-230, 2011.

TENÓRIO BM^b, JIMENEZ GC, DE MORAIS RN, PEIXOTO CA, ALBUQUERQUE NR, SILVA JUNIOR VA. Evaluation of testicular degeneration induced by low frequency electromagnetics fields. **J. App. Toxicol.**, v.32, n.3, p.210-8, 2012.

TENÓRIO BM, FILHO MBA, JIMENEZ GC, MORAIS RN, PEIXOTO CA, NOGUEIRA RA, SILVA JUNIOR VA. Extremely low frequency magnetic fields can impair spermatogenesis recovery after reversible testicular damage induced by heat. **Electromang Biol. Med.** Early online:1-8.2013

TURNER, R. M. O. Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. **Clin. Tech. Equine Pract.** 6: 278–284. 2007

VAN ITALLIE CM, BALDA MS, ANDERSON JM. Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junctions protein- ZO-1 in A341 cells. **J. Cell Sci.** 108: 1835–1842. 1995.

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 Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor. **Anim. Reprod.**, v.4, n.1/2, p.3-14, 2007.

ZIRKIN BR, EWING LL, KROMANN N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. **Endocrinology** 107: 1867–1874. 1980.

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.

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.

WILSON JD, LEIHY MW, SHAW G, RENFREE MB. Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. **Mol Cell Endocrinol.**, v.198, p.1-5, 2002.

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

YAN, J.G.; AGRETI, 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.

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.

ANEXO 1

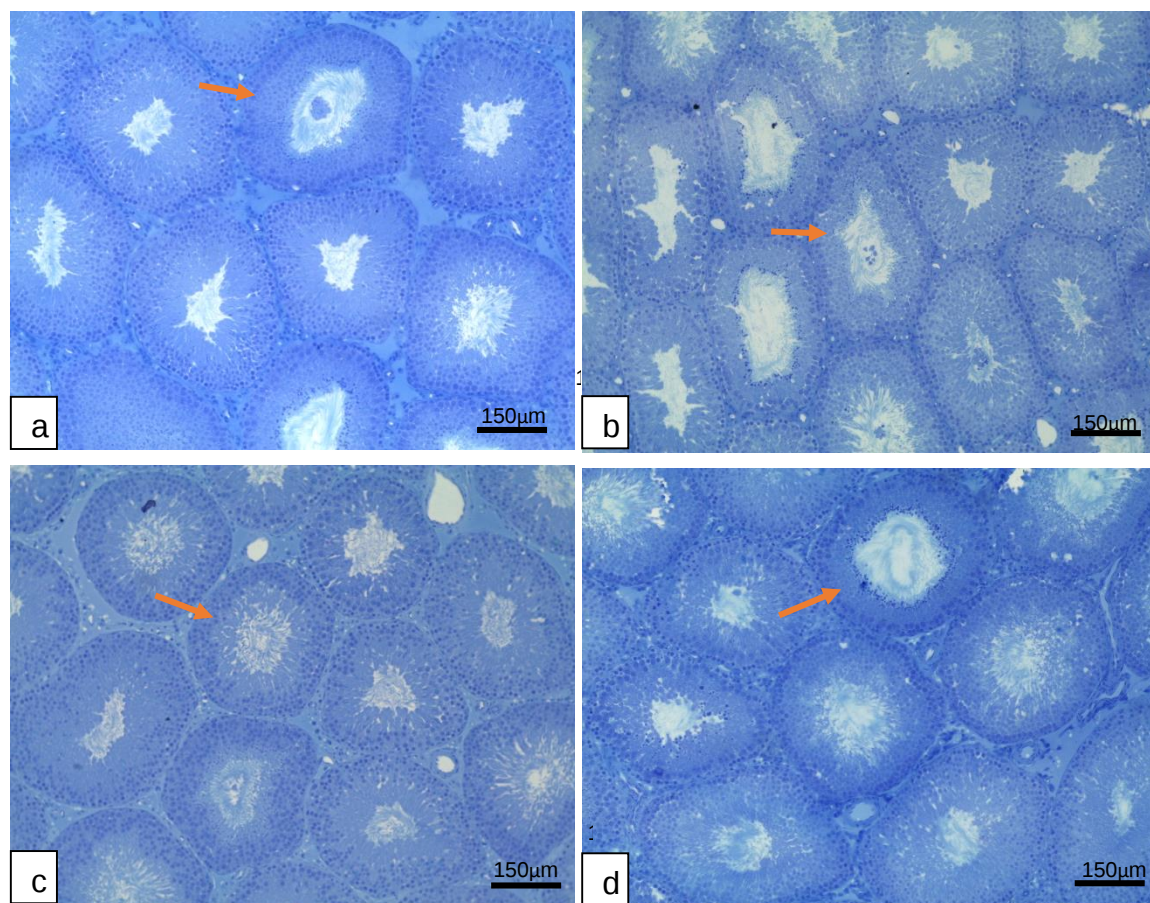


Figura 14: Fotomicrografias do parênquima testicular dos animais controle (14a), expostos ao CEM após 15 dias (14b), expostos por 30 dias (14c) e expostos ao CEM por 60 dias (14d). Notar ausência de alterações degenerativas testiculares tais como: células germinativas em descamação nem presença de vacuolizações em nenhum dos grupos analisados. Túbulos seminíferos no estágio VII (seta) (10mm = 150µm) .

ANEXO 2

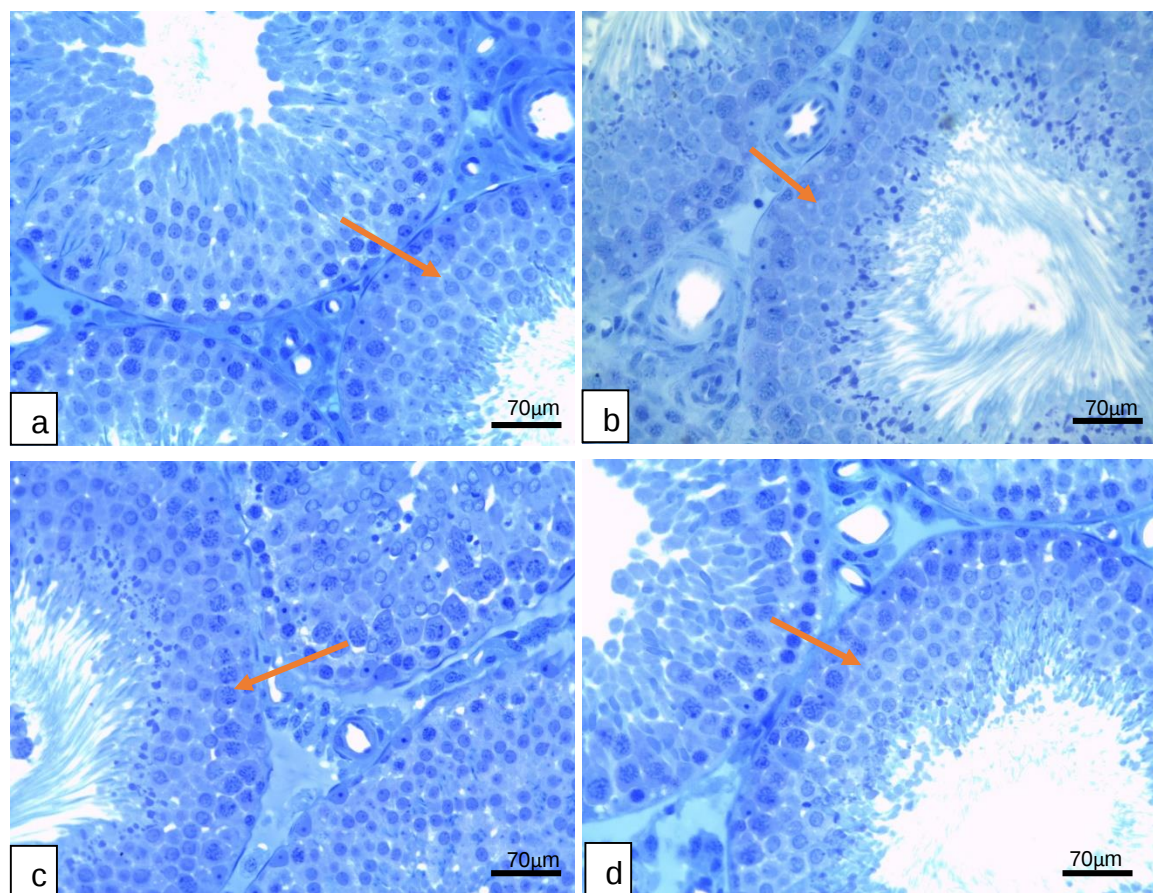


Figura 15: Fotomicrografias do epitélio seminífero no animal controle (15a) e dos animais expostos ao CEM após 15 dias (15b) animais expostos por 30 dias (15c) e dos animais expostos ao CEM por 60 dias (15d). Observar nas figuras que as células germinativas não apresentaram descamações, nem presença de vacuolizações, ou má formações indicativos de neoplasias ou indicativo de apoptoses em nenhum dos grupos analisados. As setas apresentam os epitélios germinativos no estágio VII, (10mm = 70μm).

ANEXO 3

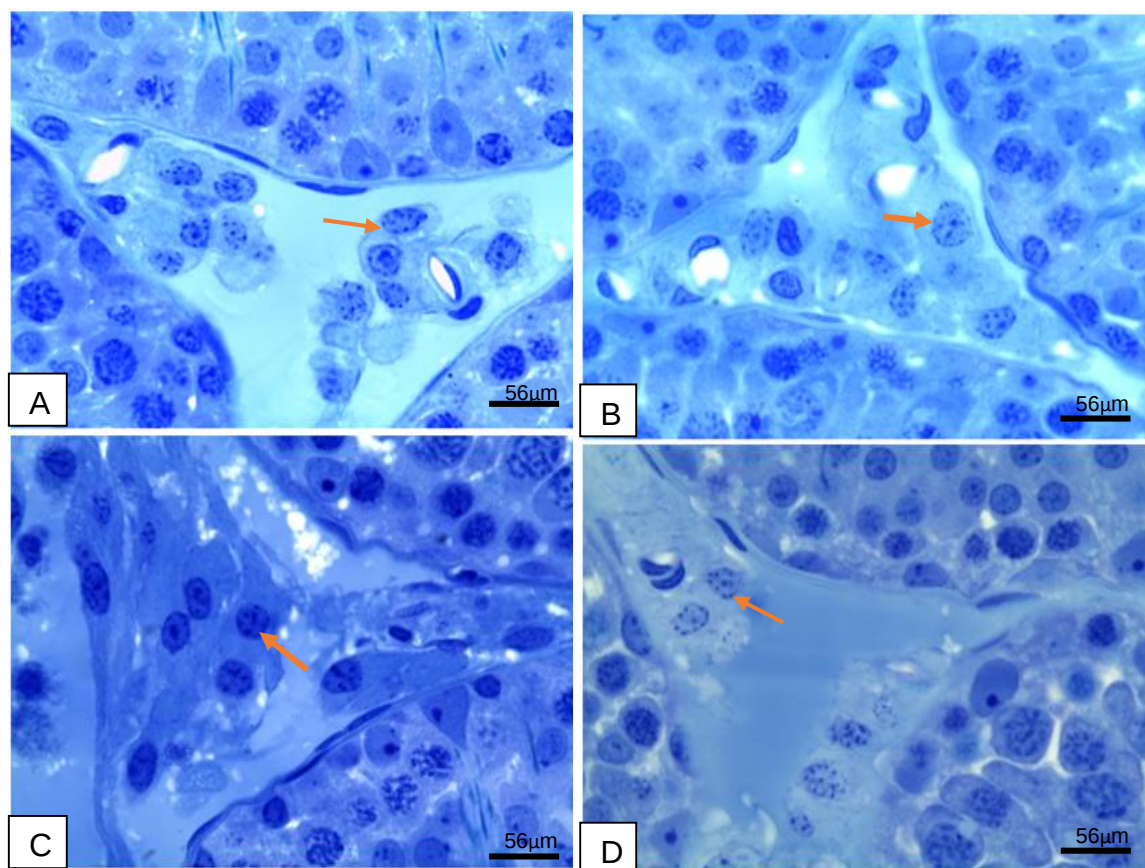


Figura 16: Fotomicrografias do interstício dos túbulos seminíferos no animal controle (16a) e dos animais expostos ao CEM após 15 dias (16b) animais expostos por 30 dias (16c) e dos animais expostos ao CEM por 60 dias (16d). Observar nas figuras que as células intersticiais não apresentaram características que indiquem degeneração, neoplasias ou indicativo de apoptoses em nenhum dos grupos analisados. As setas apresentam os as células de Leydig (10mm = 56 μm).

ANEXO 4

Tabela 1. Peso corporal de ratos Wistar submetidos ao CEM de 27,12 MHz durante 15 dias e seus respectivos controles, não mostrando variações diárias consideradas estatisticamente significante (Média $\pm$ desvio padrão). * Resultado estatisticamente significante para $p < 0,05$.

DIAS	CAMPO 15 DIAS			CONTROLE 15 DIAS			P
1	311,25	$\pm$	38,4	317,75	$\pm$	49,9	0,46
2	318,63	$\pm$	35,2	326,00	$\pm$	31,9	0,79
3	324,25	$\pm$	35,0	335,38	$\pm$	35,7	0,49
4	328,38	$\pm$	34,7	335,75	$\pm$	38,3	0,52
5	326,50	$\pm$	33,8	326,13	$\pm$	31,4	0,99
6	326,63	$\pm$	34,8	356,88	$\pm$	38,1	0,04
7	321,38	$\pm$	34,0	336,00	$\pm$	37,7	0,50
8	345,00	$\pm$	35,9	330,13	$\pm$	29,7	0,38
9	328,88	$\pm$	34,5	341,88	$\pm$	41,1	0,50
10	326,13	$\pm$	35,7	344,25	$\pm$	37,6	0,44
11	335,00	$\pm$	37,4	343,50	$\pm$	40,4	0,83
12	346,38	$\pm$	31,9	340,75	$\pm$	38,1	0,99
13	334,88	$\pm$	35,5	341,75	$\pm$	39,5	0,72
14	343,13	$\pm$	37,7	344,38	$\pm$	40,8	0,95
15	337,00	$\pm$	35,8	339,13	$\pm$	33,4	0,79

ANEXO 5

Tabela 2. Peso corporal dos animais submetidos ao CEM de 27,12 MHz durante 30 dias e seus respectivos controles, não mostrando variações diárias consideradas estatisticamente significante (Média $\pm$ desvio padrão). *Resultado estatisticamente significante para $p < 0,05$.

DIAS	CAMPO 30			CONTROLE 30			P
1	338,13	$\pm$	24,0	334,50	$\pm$	22,5	0,95
2	338,50	$\pm$	24,1	334,50	$\pm$	39,9	0,99
3	338,25	$\pm$	26,7	332,13	$\pm$	42,3	0,95
4	339,13	$\pm$	24,8	351,88	$\pm$	40,6	0,59
5	332,75	$\pm$	25,1	329,00	$\pm$	40,6	0,72
6	340,00	$\pm$	24,7	325,38	$\pm$	40,4	0,44
7	341,13	$\pm$	26,4	329,38	$\pm$	42,3	0,57
8	344,38	$\pm$	29,1	327,38	$\pm$	41,7	0,57
9	341,13	$\pm$	28,5	331,88	$\pm$	44,1	0,67
10	348,25	$\pm$	26,9	329,13	$\pm$	43,3	0,27
11	347,00	$\pm$	30,3	331,00	$\pm$	44,7	0,59
12	344,13	$\pm$	29,1	326,50	$\pm$	42,6	0,37
13	354,88	$\pm$	28,0	329,25	$\pm$	41,9	0,19
14	346,88	$\pm$	29,1	334,13	$\pm$	34,3	0,44
15	345,75	$\pm$	28,4	330,00	$\pm$	43,5	0,44
16	350,25	$\pm$	30,1	331,75	$\pm$	42,0	0,46
17	352,38	$\pm$	27,8	330,13	$\pm$	42,3	0,28
18	352,13	$\pm$	29,8	332,75	$\pm$	34,6	0,23
19	353,63	$\pm$	29,9	330,25	$\pm$	39,7	0,27
20	351,25	$\pm$	29,9	331,75	$\pm$	43,1	0,38
21	352,75	$\pm$	32,0	334,13	$\pm$	42,4	0,52
22	353,13	$\pm$	30,6	335,38	$\pm$	42,0	0,27
23	359,25	$\pm$	32,3	333,25	$\pm$	42,0	0,23
24	357,38	$\pm$	32,4	337,38	$\pm$	39,8	0,27
25	355,00	$\pm$	32,1	338,38	$\pm$	44,2	0,29
26	357,88	$\pm$	32,2	339,25	$\pm$	41,8	0,27
27	353,75	$\pm$	30,2	338,63	$\pm$	44,2	0,44
28	360,00	$\pm$	31,9	343,00	$\pm$	43,0	0,27
29	355,00	$\pm$	33,5	343,00	$\pm$	44,1	0,40
30	361,00	$\pm$	32,6	344,00	$\pm$	43,5	0,29

ANEXO 6

Tabela 3. Variação ponderal dos animais submetidos ao CEM de 27,12 MHz durante 60 dias e seus respectivos controles, não mostrando variações diárias consideradas estatisticamente significante (Média $\pm$ desvio padrão. *Resultado estatisticamente significante para $p < 0,05$.

DIAS	CAMPO 60	CONTROLE 60	P
1	319,86 $\pm$ 42,8	322,00 $\pm$ 36,6	0,90
2	320,57 $\pm$ 40,4	326,13 $\pm$ 30,8	0,86
3	320,71 $\pm$ 44,7	330,75 $\pm$ 33,6	0,72
4	322,43 $\pm$ 41,6	328,50 $\pm$ 34,7	0,86
5	322,71 $\pm$ 38,5	327,50 $\pm$ 31,4	0,95
6	326,43 $\pm$ 42,6	331,00 $\pm$ 32,2	0,72
7	325,86 $\pm$ 41,9	328,38 $\pm$ 33,6	0,81
8	328,71 $\pm$ 44,3	331,88 $\pm$ 37,2	0,95
9	328,71 $\pm$ 42,2	330,75 $\pm$ 33,0	0,77
10	325,57 $\pm$ 35,6	331,88 $\pm$ 33,7	0,56
11	334,14 $\pm$ 34,8	334,13 $\pm$ 34,2	0,86
12	335,43 $\pm$ 34,7	330,63 $\pm$ 36,2	0,95
13	325,57 $\pm$ 36,7	329,13 $\pm$ 26,6	0,64
14	326,43 $\pm$ 37,0	332,50 $\pm$ 35,3	0,61
15	328,71 $\pm$ 38,9	334,88 $\pm$ 36,8	0,61
16	331,00 $\pm$ 44,8	336,88 $\pm$ 35,6	0,61
17	333,71 $\pm$ 49,7	333,75 $\pm$ 35,6	0,90
18	333,43 $\pm$ 47,1	327,88 $\pm$ 43,2	0,90
19	333,57 $\pm$ 46,3	327,75 $\pm$ 30,9	0,86
20	337,86 $\pm$ 46,1	336,63 $\pm$ 34,9	0,86
21	336,57 $\pm$ 46,4	337,25 $\pm$ 35,5	0,61
22	336,71 $\pm$ 44,8	342,75 $\pm$ 35,9	0,69
23	342,57 $\pm$ 43,9	336,38 $\pm$ 35,6	0,86
24	339,00 $\pm$ 49,1	340,25 $\pm$ 36,5	0,86
25	337,14 $\pm$ 48,2	344,50 $\pm$ 41,6	0,46
26	327,00 $\pm$ 58,0	345,50 $\pm$ 36,8	0,39
27	341,43 $\pm$ 45,3	342,25 $\pm$ 38,4	0,81
28	342,57 $\pm$ 49,7	347,00 $\pm$ 38,2	0,77
29	344,86 $\pm$ 46,8	350,25 $\pm$ 41,6	0,77
30	348,00 $\pm$ 55,2	347,75 $\pm$ 38,4	0,86
31	341,29 $\pm$ 49,3	347,25 $\pm$ 39,6	0,53

32	340,71 ± 51,2	349,00 ± 36,3	0,69
33	342,14 ± 51,9	349,25 ± 33,7	0,77
34	337,29 ± 52,8	349,13 ± 39,1	0,53
35	342,71 ± 50,2	348,75 ± 35,0	0,69
36	336,57 ± 50,6	351,25 ± 39,8	0,33
37	336,71 ± 45,1	348,50 ± 38,6	0,46
38	335,71 ± 42,7	348,50 ± 37,1	0,41
39	336,57 ± 45,8	354,63 ± 39,3	0,28
40	335,57 ± 46,7	351,00 ± 38,7	0,28
41	340,00 ± 46,8	357,88 ± 42,8	0,33
42	338,14 ± 42,8	357,25 ± 40,2	0,23
43	339,29 ± 46,5	360,63 ± 44,1	0,23
44	338,14 ± 44,6	357,75 ± 40,5	0,23
45	342,86 ± 45,7	357,13 ± 42,7	0,41
46	343,14 ± 44,4	362,00 ± 41,8	0,22
47	343,29 ± 45,6	361,50 ± 42,5	0,23
48	349,29 ± 47,0	376,50 ± 34,0	0,29
49	348,71 ± 45,2	360,75 ± 40,3	0,33
50	350,71 ± 43,4	364,25 ± 41,9	0,33
51	346,29 ± 46,4	365,25 ± 41,0	0,23
52	346,14 ± 45,7	367,88 ± 43,3	0,27
53	349,86 ± 47,5	366,13 ± 41,6	0,33
54	346,71 ± 45,4	359,88 ± 28,5	0,35
55	348,57 ± 43,8	362,00 ± 29,1	0,28
56	350,29 ± 42,8	357,63 ± 22,8	0,46
57	350,00 ± 43,5	362,13 ± 25,5	0,28
58	347,57 ± 46,7	364,38 ± 29,5	0,24
59	351,57 ± 42,0	361,63 ± 31,1	0,41
60	352,43 ± 41,2	359,63 ± 30,3	0,61
