

**Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal**

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO DE
BAIXA FREQUÊNCIA E DO CHOQUE TÉRMICO NAS
CÉLULAS GONADAIS DE RATOS**

Bruno Mendes Tenorio

Recife, 2011



EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO DE BAIXA FREQUÊNCIA E DO CHOQUE TÉRMICO NAS CÉLULAS GONADAIS DE RATOS

Bruno Mendes Tenorio

Orientador

Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal)

Co-orientador

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal)

Tese 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 Doutor em Biociência Animal na área de Morfofisiologia.

Recife, 2011

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

(Modificado de Arntz et al., 2005)

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

(Whitehead, 2005)

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra, não temerei mal nenhum, porque tu estais comigo”

(Salmo 23.4)

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive em minha vida e por me iluminar nesta caminhada.

Dedico este trabalho aos meus pais Alcides e Lourdes, aos meus irmãos Alcides Jr. e Davi, bem como a minha companheira Fernanda.

Obrigado Família.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	12
Lista de Abreviaturas	15
1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. Espermatogênese	20
2.2. Efeito do Campo Eletromagnético nas Células Gonadais	25
2.2.1. Radiossensibilidade	29
2.3. Efeito do choque térmico nas Células Gonadais	31
2.4. Canais Iônicos	33
2.4.1. Canais de Cloreto	36
2.4.2. Canais de Sódio	38
2.4.3. Canais de Potássio	39
2.4.4. Canais de Cálcio	41
2.4.5. Canais Iônicos nas Células de Leydig	44
3. Objetivos	45

3.1. Objetivo Geral _____	46
3.2. Objetivos Específicos _____	46
4. Referências _____	47
5. Resultados e Discussão _____	61
5.1. Capítulo 1: Avaliação do desenvolvimento testicular em ratos expostos a CEM de 60 Hz e 1 mT _____	62
5.2. Capítulo 2: Avaliação da degeneração testicular induzida pelos CEM de baixa frequência _____	71
5.3. Capítulo 3: Efeito do estresse térmico e da inibição da Hsp90 nas correntes dos canais de cálcio $Cav3$ tipo-T e potássio BK_{Ca} em células de Leydig _____	81
6. Conclusão _____	106

Resumo

Nas últimas décadas, os seres humanos vêm sendo expostos a vários agentes físicos exógenos, como temperaturas elevadas induzidas por equipamentos industriais e a exposição aos campos eletromagnéticos (CEM) emitidos por aparelhos eletrônicos. Pesquisas vêm demonstrando que estes agentes podem gerar distúrbios reprodutivos. O objetivo do capítulo 1 do presente trabalho foi investigar o possível efeito da exposição ao CEM de baixa frequência de 60 Hz e 1 mT desde o 13º dia de gestação até a puberdade aos 21 dias pós-natal. Os resultados demonstraram que a exposição ao CEM reduziu os parâmetros relacionados ao lúmen, epitélio e túbulos seminíferos. Também foi observado o aumento no volume dos vasos sanguíneos e das células do tecido conjuntivo nos animais expostos ao CEM. A testosterona plasmática não se alterou devido à exposição ao CEM. A exposição ao CEM de 60 Hz e 1 mT desde a gestação até a puberdade pode induzir o retardo no desenvolvimento testicular. No capítulo 2, o objetivo foi avaliar o efeito da exposição ao CEM de baixa frequência (60 Hz e 1 mT) desde o 13º dia de gestação até os 90 dias pós-natal (adulto). A concentração da testosterona plasmática não foi alterada devido à exposição ao CEM. Entretanto, as análises histopatológicas e histomorfométricas demonstraram degeneração testicular em um sub-grupo dos animais expostos ao CEM. A gravidade do processo degenerativo variou entre os indivíduos afetados, indicando uma sensibilidade individual ao CEM. A análise de microscopia eletrônica também demonstrou degeneração testicular, sendo a principal alteração observada a presença de mitocôndrias eletrodensas e com perda da sua organização e cristas. A exposição ao CEM de 60 Hz e 1 mT parece alterar a espermatogênese e reduzir a fertilidade. No capítulo 3, o presente trabalho objetivou analisar os efeitos do choque térmico (43°C / 15 min.) e da inibição da Hsp90 nos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e potássio ativado por cálcio (BK_{Ca}) em células de Leydig. Os resultados obtidos revelaram que nos canais BK_{Ca} o choque térmico reduziu a corrente do estado estacionário em 49,8%, a condutância máxima em 68,9% e a constante de tempo de ativação em 31,9%. O choque térmico tornou mais lenta a ativação dos canais BK_{Ca} e reduziu sua dependência de voltagem. A inibição da Hsp90 não alterou os canais BK_{Ca} . A corrente dos canais Ca_v3 tipo-T não foi afetada pelo estresse térmico ou pela inibição da Hsp90. A exposição das células de Leydig à temperatura elevada pode inibir os canais BK_{Ca} , a Hsp90 parece não estar envolvida neste processo.

Palavras-chave: Campo eletromagnético de baixa frequência, espermatogênese, desenvolvimento testicular, temperatura elevada, células de Leydig, canais de cálcio e canais de potássio.

Abstract

In recent decades, humans have been exposed to various exogenous physical agents, such as high temperatures emitted by industrial devices and electromagnetic fields emitted by the electricity distribution networks and electronic devices. Researches demonstrated that these agents can cause reproductive disorders. The chapter 1 of this study aimed to investigate the possible effects of low frequency EMF exposure of 60 Hz and 1 mT from day 13 of gestation up to puberty at 21 postnatal days. The results showed that exposure to EMF reduced parameters related to the lumen, epithelium and seminiferous tubules. It was also observed an increase in the volume of blood vessels and connective tissue cells in animals exposed to EMF. The plasma testosterone did not change due to EMF exposure. The exposure to EMF of 60 Hz and 1 mT from gestation to puberty can induce a delay in testicular development. In chapter 2, the aim was to evaluate the effects of exposure to low frequency EMF (60 Hz and 1 mT) from the 13th day of gestation up to 90 postnatal days (adult). The plasma testosterone concentration was not changed by EMF exposure. However, the histopathological and histomorphometrical analysis showed testicular degeneration in a subset of animals exposed to EMF. The degenerative process severity varied among affected animals, indicating an individual sensitivity to EMF. The electron microscopy analysis also showed testicular degeneration, the main change was high electron dense mitochondria with loss of normal organization and cristae. The exposure to EMF of 60 Hz and 1 mT seems to alter spermatogenesis and reduce the fertility. Chapter 3 aimed to analyze the effects of heat shock (43 °C / 15 min.) and Hsp90 inhibition on Ca_v3 T-type calcium channels and calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) in Leydig cells. The results showed that exposure to heat shock induced a reduction in BK_{Ca} channels steady-state current (49.8%), maximum conductance (68.9%) and activation time constant (31.9%). Heat shock slowed the BK_{Ca} channels activation and reduced its voltage dependence. Hsp90 inhibition did not change BK_{Ca} channels. The Ca_v3 channels current was not affected by heat shock or Hsp90 inhibition. The heat shock can inhibit BK_{Ca} channels, the Hsp90 does not seem to be involved in this process.

Keywords: Low-frequency electromagnetic field, spermatogenesis, testicular development, high temperature, Leydig cells, calcium channels and potassium channels.

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem esquemática de uma secção transversal de túbulo seminífero fértil demonstrando vários estágios de maturação das células germinativas. Modificado de Holstein et al. (2003). _____ p.21

Figura 2. Composição do parênquima testicular. Notar as células de Sertoli no túbulo seminífero e as células de Leydig no espaço intertubular. Modificado de França et al. (2005). _____ p.24

Figura 3. Modelo de onda plana, notar que os vetores campo elétrico (E), campo magnético (B) e a direção de propagação (C) são perpendiculares entre si. _____ p.26

Figura 4. Espectro eletromagnético, notar o CEM de baixa frequência emitido pelo uso da energia elétrica com 60 Hz (marcado com círculo). _____ p.27

Figura 5. Imagem ilustrativa simplificada de um canal iônico transportando potássio (K^+) através da membrana. _____ p.34

Figura 6. Imagem esquemática de um canal de cloreto (ANOL) com 8 domínios transmembrana. O poro do canal é formado pelos domínios transmembrana 5 - 6 e pelo segmento curvo com reentrância na membrana. Notar os domínios citoplasmáticos N (NH_2) e C ($COOH$) terminais. Modificado de Duran et al. (2010). _____ p.38

Figura 7. Imagem esquemática da estrutura do canal BK. Notar o poro formado por S5 e S6, o domínio sensor de voltagem (SV) e os domínios reguladores citoplasmáticos RCK1 e RCK2. Modificado de Lee e Cui (2010). _____ p.41

Capítulo 1: Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field (Avaliação do desenvolvimento testicular de ratos expostos ao campo eletromagnético de 60 Hz e 1 mT).

Figura 1. Photomicrographs of the testis in rats at 21 postnatal days. Control group (1A, 1C and 1E) and group exposed to EMF from 13 days of gestation to 21 postnatal days (1B, 1D and 1F). _____ p.67

Capítulo 2: Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields (Avaliação da degeneração testicular induzida pelo campo eletromagnético de baixa frequência).

Figura 1. Photomicrographs of testes in control animals (1A) and exposed to low frequency EMF of 60 Hz and 1mT from gestation to 21 (1B) or 90 (1C, 1D, 1E and 1F) postnatal days. _____ p.74

Figura 2. Transmission electronmicrograph of testis in rats exposed to EMF from gestation up to 21(Figures 2A, 2B) or 90 (Figures 2C, 2D) postnatal days. _____ p.75

Figura 3. Standard deviation comparisons of biometric and histomorphometric parameters in control animals (100%) and exposed to EMF from 13th day of gestation to 90 postnatal days. Due to different units and scales, values of standard deviations were transformed into percentage (%). _____ p.77

Capítulo 3: Efeito do choque térmico e da inibição da Hsp90 nas correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e potássio BK_{Ca} em células de Leydig.

Figura 1. Correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T de células de Leydig obtidas usando pulsos de voltagem de -80mV a +40mV. _____ p.89

Figura 2. Corrente dos canais Ca_v3 tipo-T de células de Leydig em resposta a pulsos de voltagem de -20mV em holding de -40mV. Os valores foram normalizados pela corrente média. Aplicação da geldanamicina (inibidor da Hsp90) na seta. _____ p.90

Figura 3. Correntes dos canais BK_{Ca} de células de Leydig obtidas usando pulsos de voltagem de -80mV a +80mV. _____ p.92

Figura 4. Corrente dos canais BK_{Ca} de células de Leydig em resposta a pulsos de voltagem de +80mV em holding de -40mV. Os valores foram normalizados pela corrente média. Aplicação da geldanamicina (inibidor da Hsp90) na seta. _____ p.93

Figura 5. Transiente do cálcio intracelular em célula de Leydig antes e depois da aplicação de 10 μ M de 17-DMAP-geldanamicina (inibidor da Hsp90). Barra de escala: 10 μ m, s: segundos. _____ p.94

Lista de Tabelas

Capítulo 1: Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field (Avaliação do desenvolvimento testicular de ratos expostos ao campo eletromagnético de 60 Hz e 1 mT).

Tabela 1. Biometric and morphometric parameters of the testis in rats exposed to EMF from the 13th day of gestation to 21 postnatal days and control animals. _____ p.65

Tabela 2. Volume (ml) of testicular components in rats exposed to EMF from the 13th day of gestation to 21 postnatal days and control animals. _____ p.66

Tabela 3. Computational morphometric parameters of the testis in rats at 21 postnatal days exposed to EMF from day 13 of gestation to 21 postnatal days and control animals. ____ p.67

Tabela 4. Plasma testosterone analysis of rats at 21 postnatal days exposed to EMF from day 13 of gestation to 21 postnatal days and control animals. _____ p.68

Capítulo 2: Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields (Avaliação da degeneração testicular induzida pelo campo eletromagnético de baixa frequência).

Tabela 1. Testicular volume (μL) and histomorphometric parameters at 90 postnatal days. Animals were submitted to experimental handling (control group) and not submitted to handling (negative control). _____ p.76

Tabela 2. Testicular biometric and histomorphometric parameters of rats at 90 postnatal days exposed to electromagnetic fields (60 Hz and 1mT, 3 daily treatments of 30min) from day 13 of gestation to postnatal days 21 or 90, control and negative control animals. _____ p.76

Tabela 3. Testicular components volume (μL) of rats at 90 postnatal days exposed to electromagnetic fields (60 Hz and 1mT, 3 daily treatments of 30min) from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90, control and negative control animals. _____ p.77

Tabela 4. Area and perimeter of the seminiferous tubules in testes of rats at 90 postnatal days exposed to electromagnetic fields (60 Hz and 1mT, 3 daily treatments of 30 min) from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90, control and negative control animals. _____ p.78

Tabela 5. Area and perimeter of the seminiferous tubules in testes of control group, negative control group and rats exposed to electromagnetic fields of 60 Hz and 1mT from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90 that showed testicular degeneration or did not show testicular degeneration. _____ p.78

Table 6. Plasma testosterone analysis of rats at 90 postnatal days exposed to Electromagnetic Fields (60Hz and 1mT, 3 daily treatments of 30min) from day 13 of gestation to 21 or 90 postnatal days, controls and negative control animals. _____ p.78

Capítulo 3: Efeito do choque térmico e da inibição da Hsp90 nas correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e potássio BK_{Ca} em células de Leydig.

Tabela 1. Parâmetros da cinética da corrente dos canais Ca_v3 tipo-T em células de Leydig submetidas ou não ao estresse celular induzido pela temperatura elevada e/ou ao pré-tratamento com $10\mu M$ de 17-DMAP-GA durante 2 horas (R^2 médio = 0.99). _____ p.90

Tabela 2. Parâmetros da cinética das correntes dos canais Ca_v3 tipo-T em células de Leydig submetidas ou não ao choque térmico. O tratamento com $10\mu M$ de 17-DMAP-GA foi realizado logo após o registro controle. Estas células são controles delas mesmas, foi realizado o teste pareado de Wilcoxon (R^2 médio = 0.99). _____ p.91

Tabela 3. Parâmetros da cinética da corrente dos canais BK_{Ca} em células de Leydig submetidas ou não à temperatura elevada e/ou ao pré-tratamento com $10\mu M$ de 17-DMAP-GA durante 2 horas (R^2 médio = 0.99). _____ p.93

Tabela 4. Parâmetros da cinética das correntes dos canais BK_{Ca} em células de Leydig submetidas ou não ao choque térmico. O tratamento com $10\mu M$ de 17-DMAP-GA foi

realizado logo após o registro controle. Estas células são controles delas mesmas, foi realizado o teste pareado de Wilcoxon (R^2 médio = 0.99). _____ p.94

Lista de Abreviaturas

17-DMAP-GA = 17-Dimethylaminopropilamino-17-demethoxy-geldanamicina

ATP = Trifosfato de adenosina

A = Ampère

BK_{Ca} = Canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio

Br⁻ = Bromo

°C = Grau Celcius

Ca²⁺ = Cálcio

cAMP = Monofosfato cíclico de adenosina

Ca_v = Canal de cálcio ativado por voltagem

CE = Campo elétrico

CM = Campo magnético

CEM = Campo eletromagnético

cGMP = Monofosfato cíclico de guanosina

Cl⁻ = Cloreto

ClC = Canal de cloreto

CV% = Concentração por volume

D1 – D4 = Domínio 1 – 4

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DSP = Daily sperm production (produção espermática diária)

EMF = Eletromagnetic field (campo eletromagnético)

E_r = Potencial de reversão

F₀, F₁ e F₂ = Gerações de descendentes

F = Faraday

FSH = Hormônio folículo estimulante

FTX = Funnel-web spider toxin (toxina da teia da aranha funil)

g = Grama

G = Gauss

GA = Geldanamicina

G_{min} = Condutância mínima

G_{max} = Condutância máxima

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina

H1 – H6 = hélices transmembrana 1 – 6

H⁺ = Íon Hidrogênio

hCG = Gonadotrofina coriônica humana

HEK-293 = Human embryonic kidney cell (célula do rim embrionário humano)

HEPES = Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineethanesulfônico

hERG = Human ether-a-go-go related gene (gene humano relacionado ao éter-a-go-go)

Hsp = Heat shock protein (Proteína de choque térmico)

Hsp90 = Proteína de choque térmico com peso de 90 kDa

Hz = Hertz

I⁻ = Íon Iodo

I-V = Corrente por voltagem

K = fator da dependência de voltagem do sistema

K⁺ = Íon Potássio

LDH-X = Lactato desidrogenase – X

LH = Hormônio luteinizante

L = Litro

m = Metro

Na⁺ = Íon Sódio

NO = Óxido nítrico

P53 = proteína supressora de tumor

pH = Potencial hidrogênio iônico

RNA = Ácido ribonucléico

ROS = Espécie reativa de oxigênio

S = Siemens

SCI = Sertoli cell index (Índice de célula de Sertoli)

T = Tesla

UI = Unidade internacional

V = Voltagem

V₀ = voltagem para a qual a metade dos canais estão abertos

ΔF = Fluorescência normalizada

τ_{ativação / inativação} = Constante de tempo da ativação / inativação

1. Introdução

Os organismos vivos evoluíram ao longo dos tempos sendo expostos a agentes físicos naturais, tais como o calor e as radiações eletromagnéticas emitidas pelo sol e pelo campo magnético da terra. Entretanto, os seres humanos introduziram na sociedade diversas fontes artificiais de agentes físicos, o que despertou o interesse da comunidade científica em identificar os possíveis efeitos deletérios destes agentes na reprodução. Um importante perigo ambiental para a fertilidade dos machos é o estresse térmico (JUNG e SCHUPPE, 2007). O aumento na temperatura testicular pode ocorrer devido à exposição ocupacional, estilo de vida ou desordem clínica (AKTAS e KANTER, 2009). Outro possível fator de risco ambiental para a fertilidade é a presença dos campos eletromagnéticos (CEM) de baixa frequência, pois estes são gerados pela produção, distribuição e a utilização de energia elétrica (CHUNG et al., 2005).

Aproximadamente 8% dos homens apresentam problemas de infertilidade, destes, 10% possuem causas reversíveis afetando seu potencial fértil (ESTEVES et al., 2011). A ocorrência de alterações na espermatogênese está aumentando; fatores genéticos podem ter função secundária, as principais hipóteses sugerem que o testículo pode ser danificado pelo ambiente e por fatores relacionados com estilo de vida, inclusive exposição à temperatura elevada e ao CEM (radiação não-ionizante) (AGARWAL et al., 2008). A temperatura elevada e as radiações são agentes físicos que podem interferir na fertilidade dos machos e desencadear o processo de degeneração testicular (TURNER, 2007).

A espermatogênese é um processo complexo que depende do código genético das células germinativas, da comunicação com as células somáticas do testículo (VERHOEVEN et al., 2007) e de uma complexa e interligada rede de interações endócrina, parácrina e autócrina (ROSER, 2008). Este processo resulta na produção dos espermatozóides, gametas masculinos que caso apresentem defeito podem não fecundar o oócito (gameta feminino), fracassando no processo reprodutivo.

Devido a interdisciplinaridade dos temas abordados neste trabalho, faz-se necessária uma breve revisão sobre os principais aspectos relacionados à espermatogênese, aos campos eletromagnéticos de baixa frequência e à temperatura elevada.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Espermatogênese

A base celular da reprodução nos machos é o espermatozóide, o qual se desenvolve de células tronco testiculares através da proliferação e diferenciação celular, processo chamado espermatogênese (SCHULZ e MIURA, 2002). Iniciando de um reservatório renovável de células tronco, as células germinativas masculinas se desenvolvem nos túbulos seminíferos dos testículos da puberdade até a vida senil (HOLSTEIN et al., 2003). A espermatogênese é um processo complexo que depende do código genético das células germinativas, de uma rede de comunicação com as células somáticas do testículo (VERHOEVEN et al., 2007) e de uma complexa e interligada rede de interação endócrina, parácrina e autócrina (ROSER, 2008).

A espermatogênese dos mamíferos requer diversos peptídeos e hormônios esteróides, necessários para o desenvolvimento e funcionamento das células germinativas e somáticas do testículo (HOLDCRAFT e BRAUN, 2004). A pineal secreta a melatonina que age no hipotálamo para regular a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), este age na hipófise regulando o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH se liga aos receptores nas células de Leydig estimulando a produção de andrógenos e estrógenos, enquanto que o FSH se liga as células de Sertoli para estimular qualitativamente a espermatogênese e modular a produção de estrógenos, inibina e activina (MCLACHLAN, 2000; FRANÇA et al., 2005; ROSER, 2008).

O LH (via testosterona) e o FSH são os principais reguladores da espermatogênese (VERHOEVEN et al., 2007). A modulação dos hormônios gonadotróficos é realizada através do processo de feedback negativo: o LH é modulado pela ação da testosterona no hipotálamo (inibindo o GnRH) e hipófise (inibindo o LH); a modulação do FSH é realizada pela inibina (que atua inibindo) e activina (que atua estimulando) na hipófise (MCLACHLAN, 2000; HOLDCRAFT e BRAUN, 2004; ROSER, 2008). Nos machos, a expressão dos receptores para FSH é limitada às células de Sertoli e os receptores para LH são encontrados principalmente nas células de Leydig, apesar de também serem observados em células germinativas (HOLDCRAFT e BRAUN, 2004).

O processo espermatogênico é funcional e morfológicamente dividido em 3 fases: espermatogonial, espermatocitária e espermiogênica; cada fase é controlada por mecanismos reguladores específicos (FRANÇA et al., 2005).

1. Fase espermatogonial: Nesta fase ocorre a proliferação das células germinativas. As espermatogônias tipo A são o reservatório de células tronco da espermatogênese e as espermatogônias tipo B dão início ao desenvolvimento das células germinativas. As espermatogônias se multiplicam continuamente em sucessivas mitoses e as células filhas permanecem interconectadas por pontes citoplasmáticas (HOLSTEIN et al., 2003). As espermatogônias são classificadas em quatro tipos: Espermatogônia indiferenciada tipo A (única, pareada, alinhada), espermatogônia diferenciada tipo A (A1, A2, A3, A4), espermatogônia intermediária e espermatogônia tipo B (FRANÇA et al., 2005).

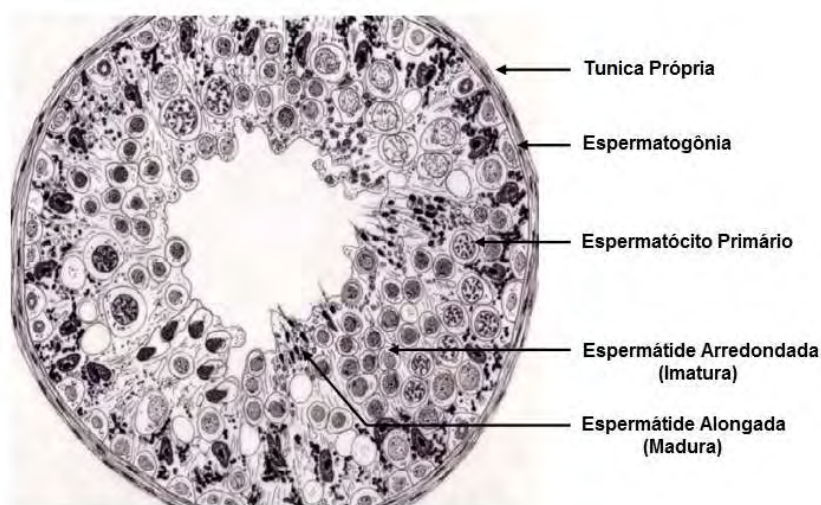


Figura 1. Imagem esquemática de uma secção transversal de túbulo seminífero fértil demonstrando vários estágios de maturação das células germinativas. Modificado de Holstein et al. (2003).

2. Fase espermatocitária: Esta fase é caracterizada por duas divisões meióticas das células germinativas. As células germinativas em meiose são denominadas espermatócitos, antes da primeira divisão espermatócito primário e antes da segunda divisão espermatócito secundário (SCHULZ e MIURA, 2002). A meiose dos espermatócitos começa com a fase de leptóteno da prófase no compartimento basal do epitélio seminífero. Após passar a junção de oclusão das células de Sertoli, os espermatócitos continuam as fases de zigóteno, paquíteno e diplóteno, ocorrendo a reduplicação do DNA, condensação da cromatina, pareamento dos cromossomos homólogos e “crossing over” (HOLSTEIN et al., 2003). A primeira meiose é caracterizada pela separação dos cromossomos paternos e maternos, que ocorre durante a

meta-, ana- e telófase da primeira divisão meiótica, produzindo os espermatócitos secundários (SCHULZ e MIURA, 2002). Na segunda divisão meiótica os espermatócitos secundários não replicam o DNA e se dividem rapidamente para formar as espermatídes haplóides; as duas divisões de cada espermatócito resultam em quatro espermatídes (HOLSTEIN et al., 2003).

3. Fase espermiogênica: Nesta fase ocorre a diferenciação da espermatíde para formação do espermatozóide sem divisão celular, este processo é caracterizado pela perda de 80-90% do volume celular (SCHULZ e MIURA, 2002) e 98% do volume nuclear (FRANÇA et al., 2005). A diferenciação da espermatíde ocorre devido a condensação da cromatina nuclear, formação do capus acrossômico pelo aparelho de Golgi e seu ajuste ao núcleo, desenvolvimento do flagelo e sua implantação no núcleo. Posteriormente, as espermatídes alongadas são liberadas no lúmen dos túbulos seminíferos através do processo de espermição. Os filamentos intermediários e os túbulos citoplasmáticos das células de Sertoli movimentam as espermatídes em direção ao lúmen tubular, as espermatídes alongadas aproximam suas pontes intercelulares, se desconectam do epitélio seminífero e se tornam espermatozoides livres no lúmen dos túbulos seminíferos (HOLSTEIN et al., 2003).

As células germinativas formam arranjos em associações específicas chamadas estágios do ciclo do epitélio seminífero, estes podem ser segmentados (um estágio por secção transversal de túbulo) ou helicoidais (em alguns primatas incluindo o homem) (FRANÇA et al., 2005). Estas associações celulares podem ser classificadas de acordo com as características morfológicas do núcleo das espermatídes (FRANÇA e RUSSEL, 1998) ou pelo método do desenvolvimento do sistema acrossômico (RUSSEL et al., 1990). No primeiro método, oito estágios são obtidos para todas as espécies, enquanto que no segundo, o número de estágios é variado para cada espécie. O ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie-específica sob controle do genótipo de cada célula germinativa (FRANÇA et al., 1998; FRANÇA et al., 2005).

As células de Sertoli estão localizadas nos túbulos seminíferos e formam as junções de oclusão (barreira hemato-testicular), constituídas de desmossomos, junções do tipo “gap” e junções à base de actina. A barreira hemato-testicular divide fisicamente o epitélio seminífero nos compartimentos basal e apical, esta barreira regula a passagem de proteínas e outras biomoléculas, mantém a polaridade celular e separa as células germinativas pós-meióticas da circulação sistêmica, evitando uma resposta autoimune (LUI e CHENG, 2007). A barreira hemato-testicular forma um micro-ambiente adequado ao desenvolvimento das células germinativas (FRANÇA et al., 2005).

No compartimento basal estão localizadas as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica e no compartimento adluminal estão localizados os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermatídes (SHARPE, 1994). As células de Sertoli também desempenham funções como o fornecimento de nutrientes, suporte físico (sustentação) para as células germinativas, mediação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese, participação ativa no processo de espermição, fagocitose das células germinativas em apoptose (RUSSEL et al., 1990; JÉGOU, 1992; HOLDCRAFT e BRAUN, 2004). Pequenos fragmentos das espermatídes contendo grânulos de RNA, mitocôndrias, gotículas de lipídeos e membranas liberados durante a espermição (corpos residuais) são incorporados e digeridos pelas células de Sertoli (HOLSTEIN et al., 2003). As células de Sertoli também secretam fluidos no lúmen tubular, que possuem função de veículo para o transporte dos espermatozoides, maturação espermática e possui importante função no epidídimo. A secreção de fluidos também ocorre em direção ao compartimento intertubular, participando de mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares, como as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, células peritubulares mióides e as células de Leydig (SHARPE, 1994; FRANÇA e RUSSEL, 1998). A inibina e a activina são glicoproteínas produzidas pelas células de Sertoli que possuem atividade endócrina, paracrina e autócrina, influenciando a folostatina, o FSH da hipófise, a esteroidogênese nas células de Leydig e a espermatogênese. As células de Sertoli também produzem a transferrina, uma proteína que fornece ferro como componente nutricional para células germinativas, a ausência de transferrina reduz a quantidade de células germinativas e a espermição (ROSER, 2008).

As células de Leydig estão localizadas no compartimento intertubular e possuem como principal função a produção de andrógenos (VERHOEVEN et al., 2007). No macho, a testosterona é o principal andrógeno responsável pela função reprodutiva (HOLDCRAFT e BRAUN, 2004), dentre suas funções pode-se citar: A ativação do eixo hipófise-testículo, masculinização do cérebro, comportamento sexual, início, processamento e manutenção quantitativa da espermatogênese, diferenciação dos órgãos genitais masculinos, características sexuais secundárias, manutenção funcional do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias (MCLACHLAN, 2000; HOLSTEIN et al., 2003; HOLDCRAFT e BRAUN, 2004; FRANÇA et al., 2005). As células de Leydig sintetizam e secretam testosterona em resposta ao acoplamento do hormônio luteinizante (LH) ao seu receptor na membrana (SVECHNIKOV et al., 2010), induzindo o aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular através de canais Ca_v3 tipo-T

localizados na membrana plasmática (COSTA et al., 2010) e a repolarização da membrana devido ao efluxo de potássio (K^+) através de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) (CARNIO e VARANDA, 1995).

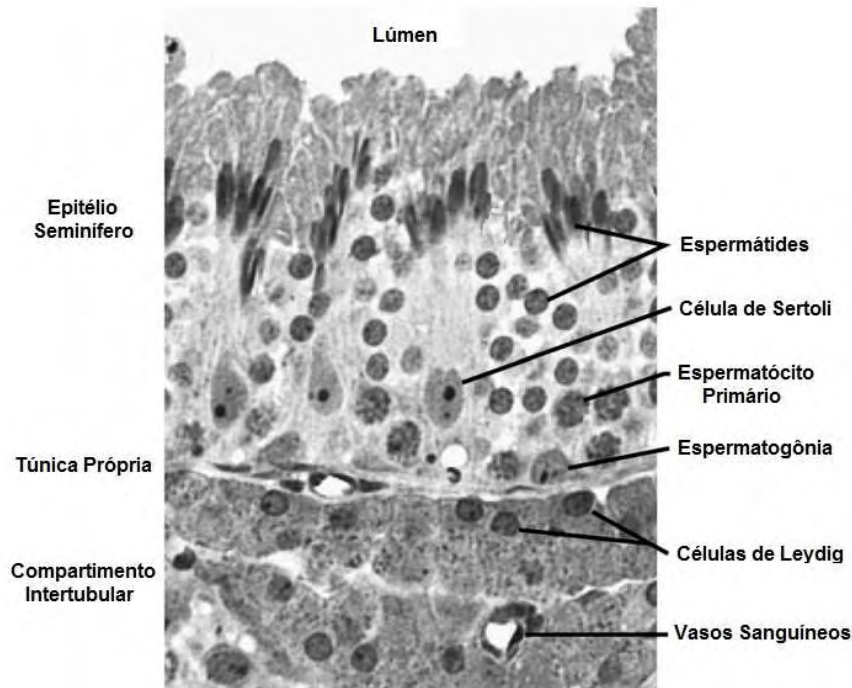


Figura 2. Composição do parênquima testicular. Notar as células de Sertoli no túbulo seminífero e as células de Leydig no espaço intertubular. Modificado de França et al. (2005).

A produção de testosterona é estimulada pelo LH e inibida através de um processo de retroalimentação negativa realizada pela própria testosterona na adenohipófise e no hipotálamo (MCLACHLAN, 2000; ROSER, 2008).

Recentemente, as células de Leydig vêm sendo consideradas parte do sistema neuroendócrino geral, sendo classificadas como células não-divisoras neuroendócrinas com propriedades pluripotentes. Dentre suas propriedades neuroendócrinas, pode-se citar: a expressão de serotonina, enzimas sintetizadoras de catecolamina, antígenos característicos de células nervosas (neuro-hormônios e seus receptores, neuropeptídeos, moléculas de adesão celular, componentes dos sistemas NO/cGMP e renina/angiotensina, proteínas de neuro-filamentos, proteínas de vesículas sinápticas e vários fatores de crescimento. Diversos antígenos neurais estão envolvidos na regulação de mecanismos autocrinos e parácrinos do testículo, tais como produção e liberação de testosterona, comunicação entre as células

somáticas testiculares, regulação do fluxo sanguíneo no testículo, permeabilidade de hormônios e substâncias nutritivas, bem como a contratilidade dos túbulos seminíferos e da túnica albugínea (HOLSTEIN et al., 2003).

Outros tipos celulares também estão presentes no testículo, tais como células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células que compõem fibras nervosas, vasos linfáticos e vasos sanguíneos; os linfócitos normalmente estão ausentes no testículo, podendo ser encontrados na forma de infiltrados em casos de lesões patológicas (HOLSTEIN et al., 2003; FRANÇA et al., 2005).

Tendo em vista a importância da espermatogênese na reprodução e que diariamente grande segmento da sociedade é exposto a agentes físicos como os campos eletromagnéticos (CEM) de baixa frequência; faz-se necessário o estudo dos possíveis efeitos adversos causados por estes agentes na espermatogênese.

2.2. Efeito dos campos eletromagnéticos nas células gonadais

Uma carga elétrica gera campo elétrico, porém, cargas elétricas em movimento produzem corrente elétrica e geram campos eletromagnéticos (INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION, 1998; BOORMAN et al., 1999). Apesar da corrente contínua gerar campo magnético em seu entorno, somente correntes alternadas geram ondas eletromagnéticas. Uma onda eletromagnética distante da fonte geradora pode ser descrita (aproximadamente) através do modelo de onda plana (Figura 1): As frentes de onda possuem uma geometria plana, os vetores campo elétrico (CE), campo magnético (CM) e a direção de propagação são perpendiculares entre si e as fases do campo elétrico e campo magnético são as mesmas (FREY, 1995; HALLIDAY, 1996).

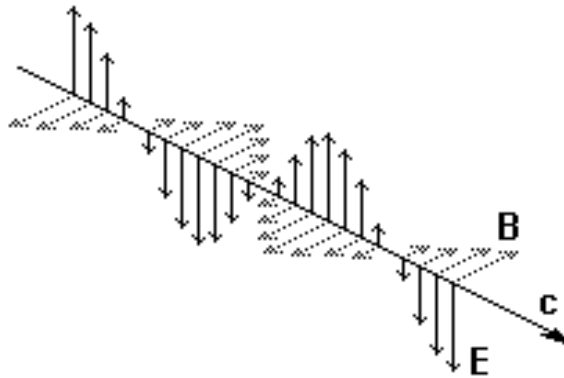


Figura 3. Modelo de onda plana, notar que os vetores campo elétrico (E), campo magnético (B) e a direção de propagação (C) são perpendiculares entre si.

Fonte: www.ufsm.br/gef (Acessado em 12.09.2011).

As radiações eletromagnéticas podem ser classificadas por seu efeito ao interagir com a matéria em ionizantes e não-ionizantes: 1. Radiações ionizantes: O produto da interação com a matéria é a remoção de elétrons dos átomos e consequente formação de íons. Fazem parte desta classificação os raios gama, raios-X e parte do espectro ultravioleta; 2. Radiações não-ionizantes: A energia destas radiações não é suficiente para quebrar as ligações atômicas, ou seja, não produzem ionização nos átomos atingidos. O restante do espectro eletromagnético faz parte deste tipo de radiação (LIN, 1994; LEE et al., 2004; GENUIS, 2008).

Na Figura 2 pode-se observar que o espectro eletromagnético varia das frequências de onda das FEB (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. As frequências utilizadas rotineiramente pelo homem variam das FEB (3Hz - 3KHz) às microondas (300 - 2000MHz) (FREY, 1995; SCHÜZ e AHLBOM, 2008).

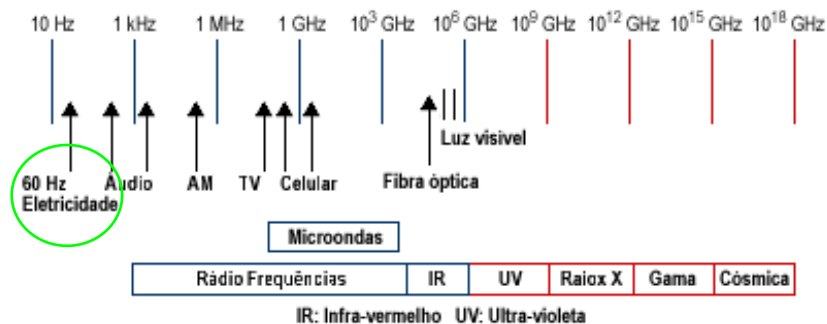


Figura 4. Espectro eletromagnético, notar o CEM de baixa frequência emitido pelo uso da energia elétrica com 60 Hz (marcado com círculo).

Fonte: www.teleco.com.br/imagens/tutoriais/espectro (Acessado em 12.09.2011).

Além da frequência dos CEM, outra característica fundamental é a densidade de fluxo magnético. A indução magnética ou densidade do fluxo magnético é o número de linhas de fluxo por unidade de área que permeiam o campo magnético (HALLIDAY, 1996). No presente estudo foi utilizado o CEM senoidal alternado com 60 Hz de frequência e 1 mT de densidade de fluxo magnético.

Pesquisas vêm sendo realizadas abordando possíveis efeitos adversos na reprodução devido à exposição a campos elétricos e magnéticos (GENUIS, 2008). O sistema reprodutivo masculino vem sendo relatado como possível alvo dos CEM de baixa frequência (RAMADAN et al., 2002), pois o testículo é um dos órgãos mais radiosensíveis devido à sua localização superficial e presença de células que se proliferam rapidamente (células germinativas) (BALIGA e RAO, 2010).

A exposição a CEM de baixa frequência (60 Hz e 0,5 mT) 24 horas por dia em camundongos adultos durante oito semanas não alterou o peso corporal nem o dos testículos, porém, aumentou a incidência de morte das células germinativas induzidas por apoptose, reduziu o escore dos parâmetros da biópsia testicular e a espermatogênese nos túbulos seminíferos (LEE et al., 2004). A exposição de camundongos a campos magnéticos de 60 Hz e 14 μ T durante 16 semanas também induziu uma maior taxa de apoptose nas células germinativas (KIM et al., 2009). Ramadan et al. (2002) observaram que camundongos adultos expostos a campos magnéticos de 50 Hz e 20 mT (30 minutos por dia, 3 vezes por semana, durante 2 semanas) sofreram redução na contagem, motilidade e produção diária de espermatozoides e alterações na largura dos túbulos seminíferos; também foi observada a ausência de espermatogônias e espermatogênese em algumas regiões do testículo e redução na

atividade da enzima LDH-X (marcador da maturação de células germinativas). Al-Akhras et al. (2001) observaram redução de fertilidade em ratos machos adultos expostos a campos magnéticos de 50 Hz e 25 μ T durante 90 dias. De acordo com Bruyn e Jager (2010), camundongos continuamente expostos a campos magnéticos de 77 μ T durante duas gerações demonstraram redução no número de espermatozóides vivos e na qualidade da motilidade espermática. A exposição de espermatozóides a campos magnéticos de 50 Hz e 1 mT durante uma hora alterou a homeostase do Ca^{2+} intracelular, reduziu a motilidade espermática, os espermatozóides demonstraram uma modesta reatividade quando coincubado com a zona pelúcida e reduziram sua habilidade de penetrar o oócito; após 2 ou 4 horas de exposição ao campo magnético os espermatozóides demonstraram alterações morfológicas na membrana plasmática e acrossomo (BERNABÒ et al., 2007).

De Vita et al. (1995) observaram possíveis efeitos citotóxicos ou citoestáticos dos campos magnéticos de 50 Hz e 1,7 mT irradiados durante 2 ou 4 horas nas espermatogônias diferenciadas e redução na quantidade de espermátides alongadas nos túbulos seminíferos. CEM de 50 Hz e 48,21 mG gerados por linhas de alta tensão de 170 kV irradiados continuamente em ratos durante 1, 2 e 3 meses reduziram a atividade da catalase testicular e corporal; a biópsia testicular revelou menores escores nos animais expostos aos CEM, o exame histopatológico do testículo demonstrou desaceleração da espermatogênese e degeneração de células germinativas (AYDIN et al., 2007). Além das alterações na espermatogênese citadas anteriormente, Khaki et al. (2006) observou alterações no tecido inter-tubular (entre os túbulos seminíferos) de animais expostos ao CEM de 50 Hz e 80 G desde a gestação até 5 semanas pós-natal. Li et al. (2010) observaram um elevado risco de baixa qualidade espermática, bem como uma redução na densidade, vitalidade, morfologia e motilidade espermática em um estudo populacional em humanos avaliando a exposição diária relativamente longa (>2.4 h/dia) a campos magnéticos com frequência da energia elétrica (50-60 Hz) e intensidade \geq 1.6 mG.

Apesar de diversos estudos verificarem efeitos adversos na espermatogênese devido a exposição a CEM, outros trabalhos não observaram alterações nos parâmetros reprodutivos em machos expostos ao CEM. Chung et al. (2005) não encontrou efeitos deletérios na espermatogênese e fertilidade de ratos adultos expostos a CEM de 60 Hz e intensidades de 5, 83,3 e 500 mT durante o período de 21 horas por dia do 6º dia de gestação até os 21 dias de idade. Camundongos expostos por 1 hora ou continuamente a campos magnéticos de 0,5 e 0,7 T não demonstraram alterações no peso corporal, testicular e epididimário, bem como na

avaliação histopatológica dos testículos e epidídimos nos dias 1, 5, 15 e 35 pós-natal (TABLADO et al., 2000). Ryan et al. (1999) avaliou a toxicidade reprodutiva de campos magnéticos de 60 Hz e 0,02 G, 2 G e 10 G irradiados continuamente e 10 G intermitentemente (1 hora ligado e 1 hora desligado), estes autores não observaram alterações nas gerações F0, F1 e F2 em relação a capacidade reprodutiva e desenvolvimento dos fetos e dos animais neonatos. A exposição de camundongos a campos magnéticos de 60 Hz e 2 mT durante 72 horas ou 10 dias (8 horas por dia) não induziu aberrações cromossômicas e não alterou a morfologia espermática (HEREDIA-ROJAS et al., 2004). De acordo com Elbetieha et al. (2002), camundongos machos e fêmeas adultos expostos a campos magnéticos de 50 Hz e 25 μ T durante 90 dias antes de acasalarem com seus parceiros não demonstraram alterações significativas na fertilidade.

As referências existentes abordando os possíveis efeitos de campos elétricos e magnéticos na espermatogênese ainda são contraditórias. Segundo Al-Akhras et al. (2001), De Vita et al. (1995) e Chung et al. (2005), é necessário mais pesquisas e informações acerca do possível efeito deletério na fertilidade devido a exposição por longos períodos de tempo a CEM de baixa frequência. Diante disso, faz-se necessária uma padronização dos parâmetros de controle dos experimentos envolvendo exposição ao CEM, que devem ser bem regulados quanto às oscilações de temperatura, protocolo experimental e estresse nos animais.

Considerando que a espermatogênese possui uma alta taxa de proliferação celular e que este processo está localizado em um órgão superficial (testículo), sendo um processo radiosensível; faz-se necessário uma breve revisão dos fatores relacionados à radiosensibilidade.

2.2.1. Radiosensibilidade

A radiosensibilidade pode ser definida como a susceptibilidade da célula a exposição à radiação (COLPI et al., 2004). Fatores físicos, químicos e biológicos podem influenciar a resposta do organismo a radiação. Diversos estudos indicam que o impacto da radiação ionizante difere entre os indivíduos e entre os tipos celulares (PEACOCK et al., 2000; GOODARZI e JEGGO, 2011). Podem existir diferenças na radiosensibilidade entre as espécies e entre as linhagens (MAUDUIT et al., 2001). Os seres humanos também podem variar a resposta em seu tecido normal devido a exposição a radiação ionizante, por exemplo,

durante a radioterapia (HOWE et al., 2009). Diversos estudos vêm indicando que a variação na resposta dos tecidos normais e tumorais a radioterapia pode estar relacionada com diferenças na radiosensibilidade (TANG et al., 2008). De acordo com Knox et al. (1981), fatores genéticos e ambientais podem predispor certos humanos a patologias induzidas pela radiação ionizante. A radiosensibilidade celular pode ser determinada por fatores genéticos e /ou epigenéticos (PEACOCK et al., 2000). Andreassen et al. (2003) também sugeriram que variações genéticas podem influenciar a radiosensibilidade no tecido normal. A sensibilidade celular a radiação pode refletir a habilidade da célula em integrar mecanismos como o reparo do DNA, a fidelidade na checagem do ciclo celular e a apoptose (MAUDUIT et al., 2001).

Pessoas com imunodeficiência primária são mais sensíveis à radiação ionizante (AGHAMOHAMMADI et al., 2008), além destes, pacientes afetados por algumas síndromes genéticas desenvolvem uma elevada radiosensibilidade (STREFFER, 2009). Anemia de Fanconi, ataxia, telangiectasia, síndrome de Bloom e xenoderma pigmentosum são alterações genéticas acompanhadas em grau variado de radiosensibilidade elevada (KNOX et al., 1981). Higurashi e Conen (1971) observaram que cromossomos de linfócitos e fibroblastos cultivados *in-vitro* de crianças com anemia de Fanconi são mais radiosensíveis. Alsbeih et al. (2007) sugeriram que variações individuais na radiosensibilidade também estão relacionadas com os níveis de TP53 e CDKN1A.

Bergonie e Tribondeau postularam em 1906 a relação entre a taxa de multiplicação do tecido e a resposta a radiação ionizante, ou seja, quanto maior a velocidade de proliferação celular, maior a sensibilidade da célula a danos causados pela radiação (MALAISE et al., 1972). A radiação é especialmente deletéria nas células que se proliferam rapidamente nos tecidos mais radiosensíveis, tais como órgãos linfóides, medula óssea, ovário e testículo (BALIGA e RAO, 2010). No testículo, a sensibilidade das células germinativas depende do seu estado de maturação e do período do ciclo celular. As células de Sertoli e de Leydig adultas são mais resistentes à radiação, pois são células altamente diferenciadas e com baixa atividade mitótica (MAUDUIT et al., 2001; SEDLMAYER et al., 2001). A espermatogênese no homem é 3,1 vezes mais sensível a radiação ionizante que a do camundongo (CLIFTON e BREMNER, 1983).

A temperatura elevada decorrente do efeito térmico de ondas eletromagnéticas ou do aquecimento direto de um tecido é outro importante agente físico que pode desencadear o estresse celular e interferir no processo espermatogênico. Dependendo da temperatura em sua

função ocupacional, estilo de vida ou alterações patológicas, o homem pode ter seu desempenho reprodutivo afetado pela temperatura elevada.

2.3. Efeito do choque térmico nas células gonadais

Todos os tecidos são susceptíveis a danos pelo calor. Contudo, os testículos são especialmente sensíveis e são danificados pela exposição a temperaturas normalmente encontradas dentro do abdômen, pois o seu funcionamento normal ocorre 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal (JENSEN et al., 2006; SAKALLIOGLU et al., 2007). Diversos mecanismos estão envolvidos na termorregulação testicular, tais como a contração da túnica dartus, a contração e o relaxamento do músculo cremaster, troca de calor entre veia e artéria do plexo pampiniforme, regulação do fluxo sanguíneo e a perda de calor por irradiação (BARTH, 1993).

O aumento da temperatura testicular devido a elevação da temperatura ambiental ou doenças que levam a febre (pirexia) podem causar degeneração testicular e reduzir a porcentagem de espermatozoides normais e férteis na ejaculação (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995). A temperatura testicular elevada interfere nas etapas de formação dos espermatozoides, bem como nos espermatozoides em trânsito pelo epidídimo (MIES FILHO, 1975). Temperaturas ambientais elevadas podem interferir negativamente na qualidade espermática, motilidade individual progressiva e percentual de células morfologicamente anormais (COELHO et al., 2006; DONIN et al., 2007; RAHMAN et al., 2011). A exposição ao estresse térmico pode desencadear a degeneração do epitélio seminífero, é geralmente aceito que o efeito do calor no testículo é totalmente reversível, entretanto, estudos recentes vem relatando efeitos adversos durante longos períodos (SETCHELL, 2006). Em humanos, a exposição ocupacional à temperatura elevada pode reduzir a fertilidade (BONDE, 2010). O aumento na temperatura escrotal pode ocorrer devido a exposição ocupacional, estilo de vida ou alterações patológicas (AKTAS e KANTER, 2009); principalmente fatores ambientais (AGARWAL et al., 2008).

Segundo Yin et al. (1997), espermátocitos primários e espermátides arredondadas entraram em apoptose nos testículos de camundongos expostos ao estresse térmico. O principal mecanismo de morte celular relacionado ao estresse térmico é a apoptose e pode envolver espécies de oxigênio reativo (ROS), proteína supressora de tumor (p53), óxido

nítrico sintase (NOS), translocação do fator pró-apoptótico Bax do citoplasma para a posição perinuclear, liberação do citocromo C da mitocôndria e diversas caspases (SETCHELL, 2006).

Todos os estágios da espermatogênese são susceptíveis à temperatura elevada, a gravidade da lesão depende da extensão e da duração do estresse térmico. A regeneração da espermatogênese depende da divisão contínua das espermatogônias, linhagem de célula germinativa altamente resistente (WAITES et al., 1990; SETCHELL, 1998). As células germinativas são mais sensíveis a alterações na temperatura testicular, sendo as células de Sertoli e as células de Leydig mais resistentes ao calor (SETCHELL, 2006). A literatura geralmente considera que as células de Leydig não são diretamente afetadas pelo calor (SETCHELL, 2006). Porém, estudos vêm demonstrando que estas células e a produção de testosterona podem ser alteradas em condições adversas que levam ao estresse celular, tais como o calor (MURPHY et al., 2001; GOROSTIZAGA et al., 2005; KUROWICKA et al., 2007; AKTAS e KANTER, 2009).

A alteração na homeostase celular é comumente denominada estresse celular (HERR e DEBATIN, 2001). As respostas do estresse celular são mecanismos universais de extraordinária significância fisiológica e patológica; estas respostas representam reações de defesa das células a danos ambientais em suas macromoléculas (KÜLTZ, 2005). Diversos fatores estão envolvidos na resposta das células durante e após a exposição a condições adversas que levam ao estresse celular (HERR e DEBATIN, 2001). Vários aspectos da resposta do estresse celular não são específicos ao agente estressante, pois as células monitoram o estresse baseada no dano a macromoléculas sem relação a que tipo de estresse causou o dano celular (KÜLTZ, 2005).

As proteínas de choque térmico (Hsp) são fatores de resposta celular ao estresse muito conservado entre as espécies (das bactérias aos mamíferos), são expressas em níveis baixos em condição fisiológica e níveis altos durante o estresse celular. As Hsp's são chaperonas moleculares, ubíquas, que facilitam o empacotamento de proteínas e regulam seu controle de qualidade, previnem a agregação protéica e induzem proteínas inapropriadamente empacotadas a seguirem seu caminho específico de degradação, ajudando as células a sobreviverem a desafios ambientais (KALMAR e GREENSMITH, 2009). As Hsp's orquestram quando e onde as proteínas celulares são empacotadas e desempacotadas; se houver alterações graves no empacotamento e agregação protéica causada por estressores ambientais ou patológicos, estas proteínas podem servir como sensores e conduzir para

apoptose, influenciando na decisão de vida e morte da célula (SAIBIL, 2008). As Hsp's são classificadas em subfamílias de acordo com seu peso molecular (kDa): Hsp16, Hsp30, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp110 (KALMAR e GREENSMITH, 2009).

A proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) é uma chaperona molecular que funciona como regulador do empacotamento, estabilidade e atividade de uma grande variedade de proteínas (PORTER et al., 2010). A Hsp90 pode interagir fisicamente ou geneticamente com até 10% das proteínas da célula, sendo considerado o maior regulador de processos celulares (ZHAO et al., 2005). A Hsp90 constitui 1% a 2% das proteínas no citoplasma, os níveis desta proteína aumentam devido ao estresse ambiental e sua função muda de acordo com as necessidades da célula (MCCLELLAN et al., 2007).

Devido a necessidade de informações acerca do comportamento das células de Leydig em condições adversas que levem ao estresse celular, o presente trabalho também objetivou avaliar o efeito do choque térmico e da inibição da Hsp90 nos canais de potássio e cálcio das células de Leydig. A seguir, está escrita uma breve revisão sobre canais iônicos e células de Leydig.

2.4. Canais iônicos

As células estão expostas a sinais intrínsecos e extrínsecos na forma de agentes químicos e/ou físicos presentes em ambos os lados da membrana plasmática. Estes sinais são convertidos em mensageiros através da ação de canais iônicos, receptores e enzimas; sendo fundamentais para a sinalização celular (ZHU et al., 2010).

O transporte através da membrana pode ser classificado termodinamicamente com base em sua habilidade “ativa” ou “passiva” de mediar o transporte. O transporte ativo pode bombear substâncias através da membrana na direção de seus gradientes eletroquímicos, consumindo energia livre do sistema. Este tipo de transporte converte uma forma de energia (Ex: potencial químico do ATP) em outra (Ex: gradiente eletroquímico através da membrana celular). Ao contrário, o transporte passivo move substâncias através da membrana de um lado com maior potencial eletroquímico para outro lado de menor potencial eletroquímico. Dois tipos de proteínas podem transportar substâncias através da membrana, os transportadores e os canais iônicos. Os transportadores facilitam o trânsito através da

membrana se ligando ao substrato, o que induz uma mudança conformacional e expõe o substrato ao outro lado da membrana, resultando em uma passagem lenta de substâncias através da membrana; já os canais iônicos contêm em sua proteína poros aquosos que permitem uma rápida difusão do substrato através da membrana (CHEN e HWANG, 2008).

Os canais iônicos são proteínas integrais formadoras de poros em membranas que permitem o fluxo de íons através delas em direção contrária aos seus gradientes eletroquímicos, assumindo diferentes estados conformacionais abertos e fechados (BANDEIRA et al., 2008). Estes canais formam um diverso grupo de proteínas encontradas na membrana plasmática e membranas de compartimentos internos, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo; tendo função em processos fisiológicos, patológicos e toxicológicos em diversos tipos celulares (RESTREPO-ANGULO et al., 2010). Os canais iônicos também podem ser reproduzidos artificialmente, introduzindo complexos protéicos macromoleculares em bi-camadas lipídicas (LUNDGREN et al., 2011).

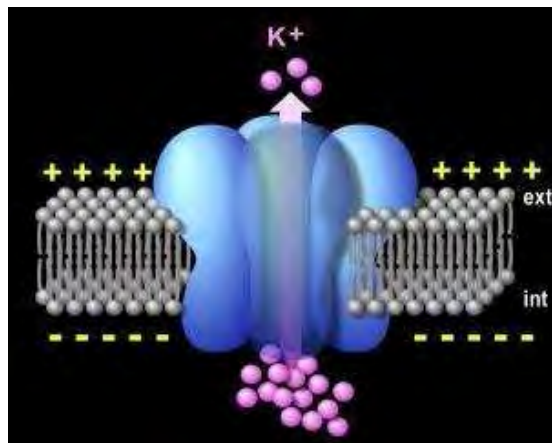


Figura 5. Imagem ilustrativa simplificada de um canal iônico transportando potássio (K^+) através da membrana. Fonte: www.physorg.com (Acessado em 18.11.2011).

Os canais iônicos são geralmente regulados por agentes químicos (ex: canal colinérgico), voltagem (ex: canais de Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) ou ondas eletromagnéticas (ex: canais de células fotoreceptoras), mas também podem ser regulados por outros fatores (ex: canais dos antibióticos nistatina e anfotericina) (COSTA, 1997). Além da sua clássica função de regular a excitabilidade elétrica da célula, os canais iônicos podem participar da sinalização

intracelular, servir como moléculas de adesão celular ou componentes do cito-esqueleto e alterar a expressão de genes específicos (KACZMAREK, 2006). Os canais iônicos podem participar da excitabilidade e contratilidade celular, secreção hormonal, imunidade inata, apoptose, proliferação e migração celular (KUNZELMANN, 2005; BURG et al., 2006; GHATTA et al., 2006).

Os canais iônicos geralmente apresentam 3 estados cinéticos: aberto, fechado em repouso e fechado inativado (CELESIA, 2001). Estes canais transitam entre os seus diferentes estados devido a flutuações térmicas, campos elétricos e/ou ligantes (VARANDA et al., 2000). A abertura do canal iônico ocorre quando um regulador atua numa estrutura sensor, que pode ser um conjunto de cargas, sítio de ligação ou sítio foto-sensível. As alterações nestes sensores induzem uma estrutura chamada “gate” ou comporta, que ao se deslocar causa mudanças conformacionais na estrutura da proteína do canal, permitindo a passagem dos íons (COSTA, 1997). A abertura do poro do canal pode ser considerada um processo de vários passos: 1. Percepção do sensor; 2. Transmissão da alteração conformacional para a região do poro; 3. Abertura do poro (HERING et al., 2008). Vale salientar que existem canais, especialmente toxinas, que não possuem gate, os chamados “non-gated channels”, que abrem e fecham dependendo simplesmente do gradiente de concentração iônica (HUSARU et al., 2005). Os canais iônicos podem ser classificados em três tipos: “non-gated”, diretamente ativados e ativados por segundo mensageiro. Estes canais são divididos em unidades protéicas distintas, chamadas subunidades. Cada subunidade possui funções e localizações específicas e são codificadas por diversos genes (CELESIA, 2001).

Diversas técnicas vêm descrevendo as transições entre os diferentes estados cinéticos do canal (aberto – fechado), os principais modelos utilizados são: 1. Markoviano, este é o modelo clássico e mais referenciado, postula que a probabilidade de transição entre os estados em unidade de tempo (constantes cinéticas) depende apenas do estado atual do canal e não dos estados anteriores, sendo um processo aleatório e probabilístico; 2. No modelo fractal a taxa de transição entre os estados dos canais iônicos dependem da resolução temporal e a corrente através de um canal é auto-similar em diferentes escalas de tempo; 3. O modelo caótico descreve que as transições entre os estados cinéticos aparecem de forças determinísticas em vez das flutuações de probabilidade do modelo Markoviano. O modelo caótico é baseado na interação de um mapa linear por partes, descrevendo que as funções determinísticas dependem de um pequeno número de variáveis independentes que simulam o comportamento aleatório dos canais iônicos. Diversos estudos experimentais e de simulação

computacional demonstraram que a cinética de alguns canais iônicos apresenta correlação de curto e longo alcance, indicando que os canais podem ter memória na cinética entre os estados aberto e fechado (VARANDA et al., 2000; BANDEIRA et al., 2008).

Os íons em solução aquosa encontram-se solvatados (cobertos por camadas moleculares de água), portanto não conseguem passar por canais com diâmetro pequeno. Estes íons precisam de energia livre para que a camada de água seja removida e os íons possam entrar em contato com o canal (com exceção dos canais grandes em que o íon passa hidratado). Considerando que os lipídeos da membrana plasmática possuem uma baixa constante dielétrica, sendo praticamente impermeável a íons, as vias hidrofílicas de alta constante dielétrica dos canais iônicos se tornam o caminho mais viável. A constante dielétrica no interior dos canais é semelhante a da água, portanto, os requisitos de energia livre contida nos gradientes eletroquímicos na célula são suficientes para o transporte dos íons através dos canais (COSTA, 1997).

Alterações na expressão e atividade dos canais iônicos podem resultar em diversas patologias: Arritmias cardíacas, epilepsia, fibrose cística, surdez, câncer, desordens renal e muscular. Estes canais também estão envolvidos na toxicologia, pois diversos animais venenosos possuem toxinas que atuam nos canais iônicos. Além disso, diversos agentes encontrados no ar, solo e água também podem regular os canais iônicos sendo potenciais riscos para a saúde (RESTREPO-ANGULO et al., 2010). Portanto, o estudo dos canais iônicos em situações fisiológicas, patológicas e de estresse celular é importante para identificação de possíveis alvos terapêuticos que possam incrementar a qualidade de vida de animais e humanos.

Os principais canais iônicos encontrados nas células dos mamíferos são os canais de sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}). Geralmente se utiliza para designar a nomenclatura de um canal a combinação do símbolo do principal íon permeável com o principal modulador do canal (URBANO et al., 2008). Por exemplo: K_{Ca} = Canal de potássio ativado por cálcio, Ca_v = Canal de cálcio ativado por voltagem.

2.4.1. Canais de Cloreto

Os canais de cloreto compreendem uma grande família de proteínas presentes em várias espécies, desde as bactérias até os humanos (CHEN e HWANG, 2008). Estes canais estão presentes em vários tipos celulares, tais como neurônios, células epiteliais, células musculares lisas e esqueléticas, sendo encontrados na membrana plasmática, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e núcleo (RESTREPO-ANGULO et al., 2010). Os canais de Cl^- estão envolvidos em diversas funções biológicas, incluindo secreção epitelial, regulação do volume celular, neuroexcitação, contração no músculo liso e acidificação de organelas intracelulares. Devido a sua importância fisiológica, alterações nestes canais podem causar diversas patologias: fibrose cística, degeneração macular, miotonia, pedras no rim, desperdício renal de sal, hiperecplexia, distrofia macular da retina, osteopetrose, disfunção dos túbulos proximais dos rins e alterações na angiogênese (VERKMAN e GALIETTA, 2009; EDWARDS e KAHL, 2010).

Na maioria das células o Cl^- é transportado através da membrana, este íon não está em equilíbrio eletroquímico e também funciona como sinalização celular. Os canais de cloreto possuem baixa seletividade entre os ânions inorgânicos (Br^- , I^- , Cl^-) e alguns canais permitem a passagem de grandes ânions orgânicos. Portanto, estes canais podem ser mais precisamente chamados de canais de ânions; entretanto, convencionou-se chamar de canais de Cl^- porque este é o ânion predominante nos sistemas biológicos (DURAN et al., 2010). Os canais de Cl^- podem ser ativados pelo volume celular, potencial de membrana, ligantes extracelulares, íons intracelulares (H^+ e Ca^{2+}) e proteínas kinase (RESTREPO-ANGULO et al., 2010).

Os canais de Cl^- em mamíferos são amplamente classificados com base na sua regulação em cinco grandes grupos: 1. Canais de cloreto regulados por volume; 2. Canais de cloreto ativados por cálcio; 3. Canais de cloreto dependentes de voltagem; 4. Canais de cloreto dependentes de ligante; 5. Canais de cloreto reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística (VERKMAN e GALIETTA, 2009). Os canais de Cl^- codificados pelo gene CIC são subdivididos em 3 subfamílias devido a sua homologia genética: 1. CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-Ka e CIC-Kb, estes canais estão presentes na membrana celular e controlam o fluxo de Cl^- e o potencial de membrana; 2. CIC-3, CIC-4 e CIC-5, estes canais estão localizados em membranas de vesículas intracelulares e auxiliam na manutenção do pH (com exceção do CIC-3 que também pode ser encontrado na membrana plasmática de neurônios); 3. CIC-6 e CIC-7, estes canais podem ser expressos em organelas intracelulares (lisossomos e endossomos) e na membrana plasmática dos osteoclastos (CHEN e HWANG, 2008; EDWARDS e KAHL, 2010).

A estrutura dos canais de Cl^- é muito diversificada, por exemplo, o canal de Cl^- ativados por cálcio possui 4 ou 5 domínios transmembrana, enquanto que o canal regulador da condutância na fibrose cística possuem 12 domínios transmembrana (RESTREPO-ANGULO et al., 2010). Os canais Cl^- são (homo)dímeros no qual cada uma das suas 2 subunidades tem seu próprio poro, este modelo é chamado “barril-duplo”. Cada subunidade possui 17 α hélices intramembrana, 3 áreas de ligação do cloreto foram identificados em cada subunidade. A área central é o filtro seletivo, onde os anions são direcionados por dipolos positivos ao final de 4 α hélices (JENTSCH et al., 2005).

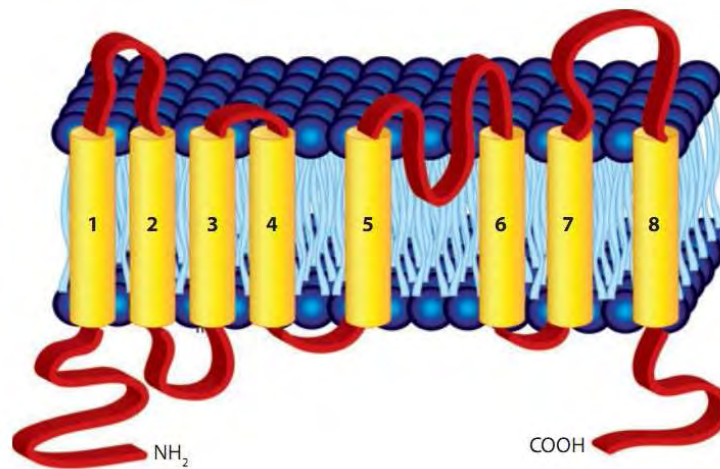


Figura 6. Imagem esquemática de um canal de cloreto (ANOL) com 8 domínios transmembrana. O poro do canal é formado pelos domínios transmembrana 5 - 6 e pelo segmento curvo com reentrância na membrana. Notar os domínios citoplasmáticos N (NH_2) e C (COOH) terminais. Modificado de Duran et al. (2010).

2.4.2. Canais de Sódio

Em geral, existem duas classes de canais iônicos Na^+ -seletivos em humanos: 1. Canais de Na^+ ativados por voltagem, estes são transientemente ativados em resposta a um pequeno estímulo despolarizante de membrana. A ativação destes canais leva a uma grande e transiente despolarização da membrana; 2. Canais de Na^+ não ativados por voltagem, podem ser citados, como exemplo, os canais de Na^+ ácido sensíveis e os canais de sódio epiteliais; estes canais facilitam o trânsito de Na^+ através da monocamada epitelial e sua abertura e fechamento pode

ser regulada pelo hormônio vasopressina e oxitocina (PEARCE e KLEYMAN, 2007; RESTREPO-ANGULO et al., 2010). Os canais de sódio dependentes de voltagem participam do início do potencial de ação e propagação de estímulos em células excitáveis, além de serem expressos em células não excitáveis, onde sua função fisiológica ainda não está bem descrita (CATTERALL et al., 2005).

Os canais de sódio voltagem dependentes alteram sua conformação quando a membrana celular é despolarizada (DUCLOHIER, 2009). Os canais de Na⁺ são formados por subunidades α (aproximadamente 260 kDa) associadas a subunidades auxiliares β . A subunidade α da proteína é suficiente para a expressão funcional do poro, mas a cinética e a dependência de voltagem para o disparo do canal são moduladas pelas subunidades β . As subunidades β também estão envolvidas na localização do canal e interação com moléculas de adesão, matriz extracelular e citoesqueleto intracelular (CATTERALL et al., 2005; LETERRIER et al., 2010).

A subunidade α dos canais de Na⁺ são organizadas em 4 domínios homólogos (D1 - D4), cada um destes domínios contém 6 hélices transmembrana (H1 - H6) e um segmento curvo localizado entre H5 e H6. Este segmento curvo faz fronteira com a entrada do poro na face extracelular e H5 - H6 fazem fronteira com a saída do poro na face intracelular (CATTERALL et al., 2005). O segmento H4 de cada domínio contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente (arginina e lisina) ocorrendo a cada três aminoácidos e separados por dois resíduos não polar. Esta estrutura funciona como cargas de disparo (sensores) e se movem para a face extracelular da membrana para iniciar a ativação do canal em resposta a despolarização (DUCLOHIER, 2009). Conectando D3 e D4 existe outra curvatura do canal que serve como estrutura de inativação e se dobra para dentro do canal bloqueando o poro por dentro durante a despolarização da membrana (CATTERALL et al., 2005).

2.4.3. Canais de Potássio

Os canais de K⁺ existem em células excitáveis e não excitáveis. Estes canais estão envolvidos em diversos processos celulares: excitabilidade neuronal, função no tecido muscular liso, secreção hormonal, imunidade inata, modulação do tônus vascular, proliferação celular e apoptose (BURG et al., 2006; GHATTA et al., 2006; JENKINSON, 2006).

Os canais seletivos para K^+ formam a maior classe de canais iônicos, mais de cem genes codificam as subunidades destes canais, enquanto que nove genes foram descritos para os canais de Na^+ dependentes de voltagem e dez genes para os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (BROWN e LEONARD, 2011). Os canais de K^+ podem ser classificados primariamente de acordo com o número de segmentos transmembrana (dois, quatro ou seis) em três grandes famílias: 1. Canais de K^+ retificadores de corrente, estes canais possuem dois segmentos transmembrana e uma curvatura formadora de poro em cada subunidade. Cada canal possui quatro subunidades formadoras de poro e podem interagir com outras proteínas de membrana; 2. Canais de K^+ ativados por voltagem ou cálcio, cada subunidade deste canal contém seis a sete segmentos transmembrana e uma curvatura formando o poro entre os dois últimos segmentos. Cada canal contém quatro subunidades formadoras de poro; 3. Canais de K^+ com domínios de dois poros, nestes canais cada subunidade contém quatro segmentos transmembrana e duas curvaturas formadoras de poro. Cada canal é formado por duas subunidades, a maioria destes canais geram correntes com pequena dependência de voltagem e tempo, formando canais de K^+ de vazamento (JENKINSON, 2006; HEITZMANN e WARTH, 2008; GU e BARRY, 2011).

Os domínios transmembrana do canal contém todos os elementos estruturais necessários para a ativação dependente de voltagem, particularmente o poro seletivo para K^+ e a estrutura que funciona como sensor de voltagem. Os domínios citoplasmáticos dos canais de K^+ possuem função de mediar a montagem do canal e sua associação com as subunidades auxiliares, além de definir a especificidade da subfamília do canal (KURATA e FEDIDA, 2006). Os canais de K^+ podem ser ativados por diversos fatores, tais como voltagem, liberação intracelular de Ca^{2+} , corrente de Ca^{2+} para o interior da célula, proteínas-G e ATP (GHATTA et al., 2006).

No presente trabalho foi avaliado o canal de K^+ ativado por Ca^{2+} tipo BK em células de Leydig. Estes canais foram previamente descritos por Carnio e Varanda (1995) e apresentam condutância individual de 187,9 pS. A família dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) é dividida de acordo com sua condutância em: Canais K_{Ca} de grande condutância, também chamado de BK ou MaxiK, apresentam condutância de 100 a 300 pS; canais de K_{Ca} de condutância intermediária, IK1 ou IK4 (25 – 100 pS); e canais K_{Ca} de pequena condutância, SK1, SK2 e SK3(2 – 25 pS) (GHATTA et al., 2006; FÉLÉTOU, 2009).

Os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} tipo BK possuem uma grande condutância unitária (100 – 300 pS) e ativam em resposta a despolarização da membrana e ligação ao Ca^{2+} ou

Mg²⁺ intracelular. O canal é formado por quatro subunidades α formadoras de poro que possuem seis segmentos transmembrana (S1 - S6) e são codificadas pelo gene Slo1 (tetramerização das proteínas Slo1) (LEE e CUI, 2010). A diversidade do canal BK ocorre devido a numerosas isoformas das subunidades α devido ao “splicing” alternativo do gene Slo1 e modulação das subunidades auxiliares β ($\beta 1 - \beta 4$). As subunidades β possuem diferentes padrões de expressão entre os tipos celulares e modificam as propriedades de ativação do canal (FÉLÉTOU, 2009). Cada subunidade codificada pelo Slo1 possui três domínios: 1. Sensor de voltagem (S1 - S4), formado por segmentos transmembrana que são sensíveis a modificações no potencial de membrana; 2. O domínio de ativação do poro (S5 - S6) que abre e fecha para controlar a permeabilidade ao K⁺; 3. O domínio citosólico grande (~800 aminoácidos) contém locais de ligação para o Ca²⁺. Os canais BK também possuem uma estrutura transmembrana adicional S0, que confere um segmento N-terminal para o lado extracelular (CUI et al., 2009; CUI, 2010).

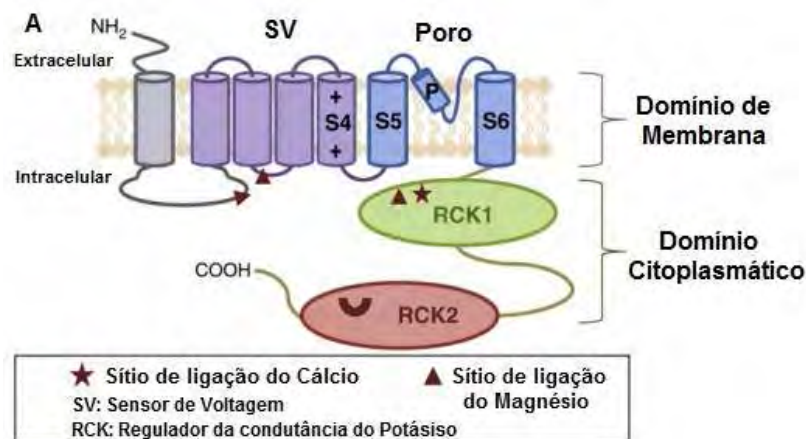


Figura 7. Imagem esquemática da estrutura do canal BK. Notar o poro formado por S5 e S6, o domínio sensor de voltagem (SV) e os domínios reguladores citoplasmáticos RCK1 e RCK2. Modificado de Lee e Cui (2010).

2.4.4. Canais de Cálcio

O Ca²⁺ é um dos mensageiros fundamentais para a transdução de sinais na célula. Eventos discretos e localizados envolvendo sinais de Ca²⁺ podem ser convertidos (ou não) na propagação de grandes ondas sinalizadoras que podem atravessar a célula inteira (ZHU et al.,

2010). A versatilidade do Ca^{2+} como mensageiro intracelular ocorre devido à ampla organização espacial dos sinais envolvendo este íon, que podem regular quase todos os aspectos da atividade celular. A maioria da sinalização do Ca^{2+} é gerada e regulada pela ativação de canais permeáveis ao Ca^{2+} localizados transversalmente na membrana plasmática ou na membrana de organelas intracelulares (TAYLOR et al., 2009). Os canais de Ca^{2+} estão presentes em diversos tipos celulares e podem ser ativados durante a despolarização da membrana. O influxo de Ca^{2+} pode ser mediado por canais dependentes de voltagem existentes em células excitáveis e não excitáveis (CATTERALL, 2000; URBANO et al., 2008).

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_V) podem ser classificados de acordo com as similaridades estruturais das subunidades formadoras de poro $\alpha 1$ em Ca_V1 , Ca_V2 e Ca_V3 . Estes canais também podem ser subdivididos em canais de alta (Ca_V1 e Ca_V2) ou baixa voltagem de ativação (Ca_V3), ou ainda ser subdivididos de acordo com suas características funcionais e farmacológicas em: tipo-L (corrente longa e duradoura); tipo-T (corrente transiente); tipo-N (predominante em neurônios, resistente a dihidropiridinas e sensível a conotoxina); tipo-P (predominante em células de Purkinje, sensível a toxina FTX, mas resistente a conotoxina e dihidropiridinas); tipo-Q (predominante nos neurônios granulosos do cerebelo, possui características farmacológicas semelhantes ao tipo-P); tipo-R (corrente transiente rápida com ativação em potencial mais positivo, resistente a conotoxina e dihidropiridinas, mas sensível a agatoxina IIIA) (CORRY e HOOL, 2007; PARK e LUO, 2010).

O poro do canal Ca_V é formado pela subunidade $\alpha 1$, a qual determina as principais características biofísicas (condutância, ativação e inativação) e farmacológicas do canal (STRIESSNIG e KOSCHAK, 2008). A subunidade $\alpha 1$ consiste de quatro domínios homólogos (D1 – D4), cada domínio possui seis hélices transmembrana (H1 – H6) e juntas formam o poro condutor de Ca^{2+} , o sensor de voltagem e a estrutura do gate. O domínio H4 possui aminoácidos carregados positivamente que funcionam como o sensor de voltagem (PARK e LUO, 2010). O canal possui uma curvatura entre H5 e H6 que delimita o poro de cada domínio, é proposto que esta curvatura também determine a seletividade iônica e propriedades de condutância (URBANO et al., 2008). Os canais Ca_V também podem ter subunidades β ($\beta 1$ – $\beta 4$), estas são estruturas intracelulares que aumentam a expressão das subunidades $\alpha 1$ e modulam propriedades de ativação dos canais. Quatro subunidades $\alpha 2\delta$ também foram identificadas, estas subunidades também promovem e estabilizam a expressão

dos canais (STRIESSNIG e KOSCHAK, 2008; PARK e LUO, 2010). Nas subfamílias de canais de Ca^{2+} ativados em altas voltagens Ca_v1 e Ca_v2 a subunidade $\alpha1$ geralmente está associada com a subunidade $\alpha2\delta$ que fica ancorada na membrana (predominantemente extracelular) e a subunidade citoplasmática β . Acredita-se que a subunidade β aumente o trânsito de canais para a membrana plasmática através da facilitação do dobramento correto dos canais e promovendo a saída dos componentes dos canais do retículo endoplasmático (DOLPHIN, 2009). Também vem sendo relatado que as subunidades $\beta1 - \beta4$ podem modular a taxa de inativação dos canais (URBANO et al., 2008). A subunidade $\alpha2\delta$ promove o trânsito dos canais de Ca^{2+} por um mecanismo que envolve o domínio VWA, entretanto, ainda precisam ser estabelecidos maiores detalhes sobre este processo. Também foram identificadas subunidades γ em alguns canais de Ca^{2+} , porém sua função ainda permanece desconhecida (DOLPHIN, 2009).

No presente trabalho foi avaliado o canal Ca_v3 tipo-T em células de Leydig. Estes canais foram previamente descritos em Costa e Varanda (2007). As correntes de cálcio tipo-T estão presentes em uma grande variedade de células, inclusive durante processos patológicos. Os canais tipo-T são ativados e abrem em voltagens próximas ao potencial de repouso, por isto são chamados de canais ativados em baixa voltagem (HUC et al., 2009). A ativação dos canais tipo-T ocorre próximo a um limiar de -65 a -50 mV e sua inativação ocorre com a membrana moderadamente despolarizada. Os canais tipo-T precisam de um período de hiperpolarização para se recuperar da inativação e se prepararem para abrir novamente (CUENI et al., 2009).

Foram identificados três genes (CACNA1G, CACNA1H e CACNA1I) codificando os canais tipo-T $\text{Ca}_v3.1/\alpha_{1G}$, $\text{Ca}_v3.2/\alpha_{1H}$ e $\text{Ca}_v3.3/\alpha_{1I}$. Existe uma grande diversidade molecular e funcional dos canais tipo-T em células nativas devido à expressão de variantes “splicing” nas subunidades Ca_v3 (HUC et al., 2009). Apesar dos canais de Ca^{2+} ativados em alta voltagem apresentarem quatro tipos de subunidades ($\alpha1$, γ , β , e $\alpha2\delta$), apenas a subunidade $\alpha1$ foi confirmada para os canais tipo-T; ainda não está claro se estes canais possuem subunidades auxiliares (ONO e IJIMA, 2010). A atividade dos canais tipo-T não estão associadas com as subunidades β , bem como não precisam destas para sua atividade (BURAEI e YANG, 2010).

2.4.5. Canais Iônicos nas Células de Leydig

A produção de testosterona nas células de Leydig ocorre devido ao acoplamento do hormônio luteinizante (LH) ao receptor 7-transmembrana G-proteína (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$), resultando no aumento do cAMP (SHIRAISHI e ASCOLI, 2008; SVECHNIKOV et al., 2010) e do Ca^{2+} intracelular (COSTA e VARANDA, 2007). O aumento do Ca^{2+} intracelular ocorre devido a entrada dos íons através de canais Ca_v3 tipo-T localizados na membrana plasmática (COSTA et al., 2010). Em resposta a entrada de Ca^{2+} na célula de Leydig, ocorre um feedback negativo através da repolarização da membrana devido a saída de K^+ através de canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}) (CARNIO e VARANDA, 1995). De acordo com Corsso e Varanda (2003), o potencial de repouso das células de Leydig é de -32,2 mV e este potencial de repouso é sensível a alterações na concentração extracelular de K^+ e Cl^- .

As células de Leydig apresentam correntes de Cl^- e K^+ dependentes de Ca^{2+} (DUCHATELLE e JOFFRE, 1987). As correntes de cloreto ($I_{Cl,swell}$) das células de Leydig influenciam o processo esteroidogênico, os canais de cloreto VRAC podem estar relacionados com a liberação de ATP nestas células (CHAVES e VARANDA, 2008). Também foi observado que células de Leydig apresentam receptores purinérgicos $P2X_2$, $P2X_4$ e $P2X_6$, o receptor $P2X$ é um canal iônico ligante dependente ativado por ATP (CHAVES et al., 2006; ANTONIO et al., 2009).

Em experimentos *in-vivo* também foi verificada a participação de canais iônicos nas células de Leydig. Em experimento imuno-reativo, Zhou et al. (2011) observou que as células de Leydig em ratos apresentavam reação moderada a intensa para as subunidades do canal de K^+ ATP dependente Kir6.1, Kir6.2, SUR2A and SUR2B. A administração em camundongos de bloqueadores dos canais de Ca^{2+} tipo-T e L reduziram o número de células de Leydig e os níveis de testosterona plasmática (LEE et al., 2011).

Considerando que a produção de testosterona pelas células de Leydig é fundamental para a ativação do eixo hipófise-testículo, masculinização do cérebro, comportamento sexual, início, processamento e manutenção quantitativa da espermatogênese, diferenciação dos órgãos genitais masculinos, características sexuais secundárias, manutenção funcional do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias (MCLACHLAN, 2000; HOLSTEIN et al., 2003; HOLDCRAFT e BRAUN, 2004; FRANÇA et al., 2005) existem poucas informações disponíveis acerca da fisiopatologia dos canais iônicos das células de Leydig.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos da exposição ao CEM de baixa frequência na espermatogênese e do choque térmico nos canais iônicos das células de Leydig em ratos.

3.2. Objetivos Específicos

Capítulo 1: Avaliação do desenvolvimento testicular em ratos expostos a CEM de 60 Hz e 1 mT

Avaliar o efeito da exposição ao CEM de 60 Hz e 1 mT do 13º dia de gestação até o 21º dia pós-natal (puberdade).

Capítulo 2: Avaliação da degeneração testicular induzida pelo CEM de baixa frequência

Avaliar o efeito da exposição ao CEM de 60 Hz e 1 mT do 13º dia de gestação até o 90º dia pós-natal (adulto).

Capítulo 3: Efeito do choque térmico e da inibição da Hsp90 nas correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e potássio BK_{Ca} em células de Leydig

Avaliar o efeito do choque térmico (43 °C durante 15 minutos) e da inibição da Hsp90 nas correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e dos canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}) em células de Leydig frescas.

4. Referências

AGARWAL, A.; DESAI, N.R.; RUFFOLI, R.; CARPI, A. Lifestyle and testicular dysfunction: A brief update. **Biomed Pharmacother.** n. 62, p. 550-553, 2008. DOI:10.1016/j.biopha.2008.07.052

AKTAS, C.; KANTER, M. Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: A histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats. **J Mol Hist.** n. 40, p. 123-130, 2009. DOI: 10.1007/s10735-009-9222-5

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.

ANTONIO, L.S.; COSTA, R.R.; GOMES, M.D.; VARANDA, W.A. Mouse Leydig cells express multiple P2X receptor subunits. **Purinergic Signalling.** n. 5, p. 277-287, 2009. DOI: 10.1007/s11302-008-9128-9

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.

BANDEIRA, H.T.; BARBOSA, C.T.F.; OLIVEIRA, R.A.C.; AGUIAR, J.F.; NOGUEIRA, R.A. Chaotic model and memory in single calcium-activated potassium channel kinetics. **Chaos.** n. 18, 033136, 2008. DOI: 10.1063/1.2944980

BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Rev Bras Repr Anim.** n. 1, p. 1-11, 1993.

BERNABÒ, N.; TETTAMANTI, E.; PISTILLI, M.G.; NARDINOCCHI, D.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Effects of 50 Hz extremely low frequency magnetic field on the morphology and function of boar spermatozoa capacitated in vitro. **Theriogenology.** n. 67, p. 801-815, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.10.014

BONDE, J.P. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. **Asian J Androl**. n. 12, p. 152-156, 2010. DOI: 10.1038/aja.2009.83

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. **Toxicol Pathol**. n. 27, v. 3, p. 267-278, 1999.

BURAEI, Z.; YANG, J. The β Subunit of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. **Physiol Rev**. n. 90, p. 1461-1506, 2010. DOI: 10.1152/physrev.00057.2009

BROWN, M.R.; KACZMAREK, L.K. Potassium channel modulation and auditory processing. **Hearing Res**. n. 279, p. 32-42, 2011. DOI: doi:10.1016/j.heares.2011.03.004

BRUYN, L.; JAGER, L. Effect of Long-Term Exposure to a Randomly Varied 50Hz Power Frequency Magnetic Field on the Fertility of the Mouse. **Electromag Biol Med**. n. 29, p. 52-61, 2010. DOI: 10.3109/15368371003776659

BURG, E.D.; REMILLARD, C.V.; YUAN, J.X. K^+ channels in apoptosis. **J Membr Biol**. n. 209, p. 3-20, 2006. DOI: 10.1007/s00232-005-0838-4

CARNIO,E.C.; VARANDA,W. A. Calcium-activated potassium channels are involved in the response of mouse Leydig cells to human chorionic gonadotropin. **Braz J Med Biol Res**. n. 28, p. 813-824, 1995.

CATTERALL. W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annu Rev Cell Dev Biol**. n. 16, p. 521-55, 2000.

CATTERALL, W.A.; GOLDIN, A.L.; WAXMAN, S.G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. **Pharmacol Rev**. n. 57, p. 397-409, 2005. DOI: 10.1124/pr.57.4.4

CELESIA, G.G. Disorders of membrane channels or channelopathies. **Clin Neurophysiol.** n. 112, p. 2-18, 2001.

CHAVES, L.A.P.; PONTELLI, E.P.; VARANDA, W.A. P2X receptors in mouse Leydig cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** n. 290, C1009-C1017, 2006. DOI: 10.1152/ajpcell.00506.2005

CHAVES, L.A.P.; VARANDA, W.A. Volume-activated chloride channels in mice Leydig cells. **Pflugers Arch Eur J Physiol.** n. 457, p. 493-504, 2008. DOI: 10.1007/s00424-008-0525-2

CHEN, T-Y.; HWANG, T-C. CLC-0 and CFTR: Chloride Channels Evolved From Transporters. **Physiol Rev.** n. 88, p. 351-387, 2008. DOI: 10.1152/physrev.00058.2006

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.** n. 7, v. 2, p.189-194, 2005.

COELHO, L.A.; SASA, A.; NADER, C.E.; CELEGUINI, E.C.C. Sperm characteristics of bucks under heat stress in climatic chamber. **Arq Bras Med Vet Zootec.** n. 58, v. 4, p. 544-549, 2006.

CORRY, B.; HOOL, L. Calcium Channels. In: CHUNG, S.H.; ANDERSEN, O.S.; KRISHNAMURTHY, V. Ed. *Biological Membrane Ion Channels: Dynamics, Structure and Applications*. New York: Springer Science. cap. 7, p. 241-300, 2007.

CORSSO, C.D.; VARANDA, W.A. The Resting Potential of Mouse Leydig Cells: Role of an Electrogenic Na⁺/K⁺ Pump. **J Membrane Biol.** n. 191, p. 123-131, 2003. DOI: 10.1007/s00232-002-1048-y

COSTA, J.G. *Biofísica das membranas*. Recife: Editora Universitária UFPE. 173p, 1997.

COSTA, R.R.; VARANDA, W.A.; FRANCI, C.R. A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. n. 299, p. 316-323, 2010. DOI: 10.1152/ajpcell.00521.2009

COSTA, R.R.; VARANDA, W.A. Intracellular calcium changes in mice Leydig cells are dependent on calcium entry through T-type calcium channels. **J Physiol**. n. 585, v. 2, p. 339-349, 2007. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.137950

CUENI, L.; CANEPARI, M.; ADELMAN, J.P.; LÜTHI, A. Ca²⁺ signaling by T-type Ca²⁺ channels in neurons. **Pflugers Arch Eur J Physiol**. n. 457, p. 1161-1172, 2009. DOI: 10.1007/s00424-008-0582-6

CUI, J.; YANG, H.; LEE, U.S. Molecular mechanisms of BK channel activation. **Cell Mol Life Sci**. n. 66, p. 852-875, 2009. DOI: 10.1007/s00018-008-8609-x

CUI, J. BK-type calcium-activated potassium channels: coupling of metal ions and voltage sensing. **J Physiol**. n. 588, v. 23, p. 4651-4658, 2010.

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.

DOLPHIN, A.C. Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. **Curr Opin Neurobiol**. n. 19, p. 237-244, 2009. DOI: 10.1016/j.conb.2009.06.006

DONIN, D.S.; HEINEMANN, R.; MOREIRA, N. Thermal stress and its consequences on seminal characteristics of boars. **Rev Bras Reprod Anim**. n. 31, v. 4, p. 456-461, 2007.

DUCHATELLE, P.; JOFFRE, M. Ca-dependent-chloride and potassium currents in rat Leydig cells. **FEBS Letters**. n. 217, v. 1, p. 11-15, 1987.

DUCLOHIER, H. Structure–function studies on the voltage-gated sodium channel. **Biochim Biophys Acta**. n. 1788, p. 2374-2379, 2009. DOI:10.1016/j.bbamem.2009.08.017

DURAN, C.; THOMPSON, C.H.; XIAO, Q.; HARTZELL, H.C. Chloride Channels: Often Enigmatic, Rarely Predictable. **Annu Rev Physiol.** n. 72, p. 95-121, 2010. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135811

EDWARDS, J.C.; KAHL, C.R. Chloride channels of intracellular membranes. **FEBS Letters.** n. 584, p. 2102-2111, 2010. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.01.037

ELBETIEHA, A.; AL-AKHRAS, M-A.; DARMANI, H. Long-term exposure of male and female mice to 50 Hz magnetic field: Effects on fertility. **Bioelectromagnetics.** n. 23, v. 2: p. 168-172, 2002. DOI: 10.1002/bem.109

ESTEVES, S.C.; MIYAOKA, R.; AGARWAL, A. An update on the clinical assessment of the infertile male. **Clinics.** n. 66, v. 4, p. 691-700, 2011. DOI: 10.1590/S1807-59322011000400026.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?. **British J Pharmacol.** n. 156, p. 545-562, 2009. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x

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

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

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

GHATTA, S.; NIMMAGADDA, D.; XU, X.; O'ROURKE, S.T. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. **Pharmacol Therap.** n. 110, p. 103-116, 2006. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.10.007

GENUIS, S. J. Fielding a current idea: exploring the public health impact of electromagnetic radiation. **Public Health.** n. 122, p. 113-124, 2008. DOI: 10.1016/j.puhe.2007.04.008

GOROSTIZAGA, A.; BRION, L.; MALOBERTI, P.; MACIEL, F.C.; PODESTA, E.J.; PAZ, C. Heat shock triggers MAPK activation and MKP-1 induction in Leydig testicular cells. **Biochem Biophys Res Com.** n. 327, p. 23-28, 2005. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.129

GU, C.; BARRY, J. Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. **Progress Neurobiol.** n. 94, p. 115-132, 2011. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.04.009

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

HUSARU, L.; SCHULZE, R.; STEINER, G.; WOLFF, T.; HABICHER, W. D.; SALZER, R. Potential analytical applications of gated artificial ion channels. **Anal Bioanal Chem.** n. 382, p. 1882-1888, 2005. DOI: 10.1007/s00216-005-3380-4

HEITZMANN, D.; WARTH, R. Physiology and Pathophysiology of Potassium Channels in Gastrointestinal Epithelia. **Physiol Rev.** n. 88, p. 1119-1182, 2008. DOI: 10.1152/physrev.00020.2007.

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.

HERING, S.; BEYL, S.; STARY, A.; KUDRNAC, M.; HOHAUS, A.; GUY, H.R.; TIMIN, E. Pore stability and gating in voltage-activated calcium channels. **Channels**. n. 2, v. 2, p. 61-69, 2008.

HERR, I.; DEBATIN, K-M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**. n. 98, v. 9, p. 2603-2614, 2001. DOI: 10.1182/blood.V98.9.2603

HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. **Int J Androl**. n. 27, p. 335-342, 2004.

HOLSTEIN, A-F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reprod Biol Endocrinol**. n. 1, p. 107, 2003.

HUC, S.; MONTEIL, A.; BIDAUD, I.; BARBARA, G.; CHEMIN, J.; LORY, P. Regulation of T-type calcium channels: Signalling pathways and functional implications. **Biochim Biophys Acta**. n. 1793, p. 947-952, 2009. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.003

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

INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION. Guidelines for Limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic and Electromagnetic fields (up to 300 GHz). **Health Physics**. n. 74, v. 4, p. 494-522, 1998.

JAINUDEEN, M.R, HAFEZ, E.S.E. Distúrbios reprodutivos nos machos. In: HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. 6.ed. São Paulo: Editora Manole, p. 291-301, 1995.

JEGÓU, B. The Sertoli cell in vivo and in vitro. **Cell Biol Toxicol**. n. 8, v. 3 p. 49-54, 1992.

JENKINSON, D.H. Potassium channels - multiplicity and challenges. **British J Pharmacol**. n. 147, S63-S71, 2006. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706447

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

JENTSCH, T.J.; NEAGOE, I.; SCHEEL, O. CLC chloride channels and transporters. **Cur Opin Neurobiol.** n. 15, p. 319-325, 2005. DOI: 10.1016/j.conb.2005.05.002

KACZMAREK, L.K. Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. **Nature Rev Neurosci.** n. 7, p. 761-771, 2006. DOI: 10.1038/nrn1988

KALMAR, B.; GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. **Adv Drug Deliv Rev.** n. 61, p. 310-318, 2009. DOI: 10.1016/j.addr.2009.02.003

KHAKI, A.A.; TUBBS, R.S.; SHOJA, M.M.; RAD, J.S.; KHAKI, A.; FARAHANI, R.M.; ZARRINTAN, S.; NAG, T.C. The effects of an electromagnetic field on the boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat: a light and transmission electron microscope study. **Folia Morphol.** n. 65, v. 3, p. 188-194, 2006.

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. DOI: 10.1002/bem.20448

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu Rev Physiol.** n. 67, p. 225-57, 2005. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635

KUNZELMANN, K. Ion Channels and Cancer. **J Membrane Biol.** n. 205, p. 159-173, 2005. DOI: 10.1007/s00232-005-0781-4

KURATA, H.T.; FEDIDA, D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. **Progress Biophys Mol Biol.** n. 92, p. 185-208, 2006. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2005.10.001

KUROWICKA, B.; GAJEWSKA, A.; AMAROWICZ, R.; KOTWICA G. Effect of warm-rearing and heat acclimation on pituitary-gonadal axis in male rats. **Int J Androl.** n. 31, p. 579-587, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00812.x

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, U.S.; CUI, J. BK channel activation: structural and functional insights. **Trends Neurosci.** n. 33, p. 415-423, 2010. DOI: 10.1016/j.tins.2010.06.004

LEE, J.H.; AHN, H.J.; LEE, S.J.; GYE, M.C.; MIN, C.K. Effects of L- and T-type Ca²⁺ channel blockers on spermatogenesis and steroidogenesis in the prepubertal mouse testis. **J Assist Reprod Genet.** 28:23-30, 2011. DOI: 10.1007/s10815-010-9480-x

LETERRIERA, C.; BRACHETA, A.; FACHEA, M-P.; DARGENTA, B. Voltage-gated sodium channel organization in neurons: Protein interactions and trafficking pathways. **Neurosci Letters.** n. 486, p. 92-100, 2010. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.08.079

LI D-K, YAN B, LI Z, GAO E, MIAO M, GONG D, WENG XP, FERBER JR, YUAN W. 2010. Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality. **Reprod Toxicol.** n. 29, p. 86-92. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.09.004

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

LUNDGREN, A.; HEDLUND, J.; ANDERSSON, O.; BRÄNDÉN, M.; KUNZE, A.; ELWING, H.; HÖÖK, F. Resonance-Mode Electrochemical Impedance Measurements of Silicon Dioxide Supported Lipid Bilayer Formation and Ion Channel Mediated Charge Transport. **Anal Chem.** n. 83, p. 7800-7806, 2011. DOI: dx.doi.org/10.1021/ac201273t

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

MCLACHLAN, R.I. The endocrine control of spermatogenesis. **Baillière's Clin Endocrinol Metabol.** n. 14, v. 3, p. 345-362, 2000. DOI: 10.1053/beem.2000.0084

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino: função espermatogênica e função endócrina do testículo. In: MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 3.ed. Porto Alegre: Sulina, p.99-133, 1975.

MURPHY, B.D.; LALLI, E.; WALSH, L.P.; LIU, Z.; SOH, J.; STOCCO, D.M.; SASSONE-CORSI, P. Heat Shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. **Mol Endocrinol.** n. 15, v. 8, p. 1255-1263, 2001.

ONO, K.; IJIMA, T. Cardiac T-type Ca channels in the heart. **J Mol Cell Cardiol.** n. 48, p. 65-70, 2010. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.021

PARK, J.F.; LUO, Z.D. Calcium channel functions in pain processing. **Channels.** n. 4, v. 6, p. 510-517, 2010. DOI: 10.4161/chan.4.6.12869

PEARCE, D.; KLEYMAN, T.R. Salt, sodium channels, and SGK1. **J Clin Invest.** n. 117, p. 592-595, 2007. DOI:10.1172/JCI31538

RAHMAN, M.B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J.J.; SOOM, A.V. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology.** n. 76, p. 1246-1257, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.031

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. **Pharmacol Res.** n. 46, v. 4, 2002. DOI: 10.1016/S1043-6618(02)00171-8

ROSER, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Anim Reprod Sci.** n. 107, p. 179-196, 2008. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.004

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Ed. Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta: Cache River Press. cap. 1, p. 1-40, 1990.

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

SAIBIL, H.R. Chaperone machines in action. **Curr Opin Struct Biol.** n. 18, p. 35-42, 2008. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.11.006

SAKALLIOGLU, A.E.; OZDEMIR, B.H.; BASARAN, O.; NACAR, A.; SUREN, D.; HABERLA, M.A. Ultrastructural study of severe testicular damage following acute scrotal thermal injury. **Burns.** n. 33, p. 328-333, 2007. DOI: 10.1016/j.burns.2006.07.020

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

SCHULZ, R.W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiol Biochem.** n. 26, p. 43-56, 2002.

SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **J Reprod Fertil.** n. 114, p. 179-194, 1998.

SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. **Anim Reprod.** n. 3, v. 2, p. 81-91, 2006.

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

SHAW, G.M.; CROEN, L.A. Human adverse reproductive outcomes and electromagnetic field exposures: Review of epidemiologic studies. **Environm Health Perspect Supp.** n. 101, v. 4, p.107-119, 1993.

SHIRAIISHI, K.; ASCOLI, M. A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the lutropin receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells. **Experim Cell Res.** n. 314, p. 25-37, 2008. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.06.025

STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A. Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca²⁺ channels with gene Knockout models. **Channels.** n. 2, v. 4, p. 1-19; 2008.

SVECHNIKOV, K.; IZZO, G.; LANDREH, L.; WEISSER, J.; SÖDER, O. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. **J Biomed Biotechnol.** ID 684504, 2010. DOI: 10.1155/2010/684504

TABLADO, L.; SOLER, C.; NÚÑEZ, M.; NÚÑEZ, J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F. Development of mousetestis and epididymis following intrauterine exposure to a static magnetic field. **Bioelectromagnetics.** n. 21, p. 19-24, 2000.

TURNER, R.M.O. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. **Clin Tech Equine Pract.** n. 6: p. 278-284, 2007. DOI: 10.1053/j.ctep.2007.09.006

URBANO, F.J.; PAGANI, M.R.; UCHITEL, O.D. Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. **J Neuroimmunol.** n. 201, v. 202, p. 136-144, 2008. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.06.031

VERHOEVEN, G.; DENOLET, E.; SWINNEN, J.V.; WILLEMS, A.; SAUDERS, P.T.K.; SHARPE, R.M.; DE GENDT, K. The role of androgens in the control of spermatogenesis:

lessons from transgenic models involving s Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor. **Anim Reprod.** n. 4, v. ½, p. 3-14, 2007.

VARANDA, W.A.; LIEBOVITCH, L.S.; FIGUEIROA, J.N.; NOGUEIRA, R.A. Hurst Analysis Applied to the Study of Single Calcium-activated Potassium Channel Kinetics. **J Theor Biol.** n. 206, p. 343-353, 2000. DOI: 10.1006/jtbi.2000.2131

VERKMAN, A.S.; GALIETTA, L.J.V. Chloride channels as drug targets. **Nature Rev.** n. 8, p. 153-171, 2009. DOI: 10.1038/nrd2780

WAITES, G.W.H.; SETCHELL, B.P. Physiology of the mammalian testis. In: LAMMING, G.E. Marshall's physiology of reproduction. 1ed., Londres: Churchill Livingstone, 4° ed. v.2, p. 1-105, 1990.

YIN, Y.; HAWKINS, K.L.; DEWOLF, W.C.; MORGENTALER, A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **J Androl.** n. 18, p. 159-165, 1997.

ZHOU, M.; HE, H-J.; TANAKA, O.; SEKIGUCHI, M.; KAWAHARA, K.; ABE, H. Different Localization of ATP Sensitive K⁺ Channel Subunits in Rat Testis. **Anatom Record.** n. 294, p. 729-737, 2011. DOI: 10.1002/ar.21348

ZHU, M.X.; MA, J.; PARRINGTON, J.; CALCRAFT, P.J.; GALIONE, A.; EVANS, A.M. Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. **Am J Physiol Cell Physiol.** n. 298, C430-C441, 2010. DOI: 10.1152/ajpcell.00475.2009

5. Resultados e Discussão

5.1. Capítulo 1:

Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field

Avaliação do desenvolvimento testicular de ratos expostos ao
campo eletromagnético de 60 Hz e 1 mT

Publicado em:

TENORIO, B.M.; JIMENEZ, G.C.; MORAIS, R.N.; TORRES, S.M.; NOGUEIRA, R.A.;
SILVA JUNIOR, V.A. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT
electromagnetic field. *Journal of Applied Toxicology*. 31: 223–230, 2011.

DOI: 10.1002/jat.1584

Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field

Bruno Mendes Tenorio,^a George Chaves Jimenez,^a
Rosana Nogueira Morais,^b Sandra Maria Torres,^a
Romildo Albuquerque Nogueira^a and Valdemiro Amaro Silva Junior^{a*}

ABSTRACT: Society has been increasingly exposed to low-frequency electromagnetic fields (EMF), mainly from electricity distribution networks and electro-electronic devices. Aiming to clarify the extension of possible interactions between EMF and testicular development, this study evaluated the effects of exposure to 60 Hz and 1 mT EMF in the maturation of testicular components. Wistar rats were exposed to EMF three times per day for 30 min, between the 13th day of gestation and the 21st postnatal day. Results showed a decrease in the following parameters: tubular diameter and seminiferous tubules area; seminiferous epithelium height; total volume of seminiferous tubule; tubular lumen; seminiferous epithelium; and Leydig cells. On the other hand, an increase was observed in connective tissue cells and blood vessels volume. Plasma testosterone, Sertoli cells population, tubular length and gonadosomatic index did not change when exposed to EMF. Histomorphometric analysis showed that exposure to EMF can promote a delay in testicular development. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: non-ionizing radiation; electromagnetic waves; testicular development; spermatogenesis; histomorphometry; testosterone

INTRODUCTION

In the three last decades a great increase has occurred in the use of equipment that works with electrical energy. The production, distribution and use of electricity generate low-frequency electromagnetic fields (EMF). Research has shown that the male reproductive system is vulnerable to external chemicals and physical agents, which can generate reproductive disorders (Kumar, 2004). Despite several studies on the interaction of EMF with biological systems, various aspects are yet to be clarified, principally related to the extension and action mechanisms of EMF effects.

The effects of EMF during gestation are still controversial. It has been reported that electric and magnetic fields can interact with the fetus; therefore, EMF may be able to affect testicular development, which starts at 13.5 days post-conception in rats (Orth, 1993). Huuskonen *et al.* (2001) showed that exposure of female Wistar rats to sinusoidal 10 or 100 A m⁻¹ and 50 Hz magnetic field from fertilization to end of the implantation period (70–176 h after ovulation) may produce borderline changes in the transport and development of embryos. Exposure to EMF of 33 or 50 Hz and 1.5 mT might impair the reproductive potential in mammalian females by reducing the developmental follicular capacity (Cecconi *et al.*, 2000). High doses of static magnetic fields of 400 mT for 1 h caused malformations in mouse fetuses, such as polydactylism, fused rib, brain hernia and curled tail (Saito *et al.*, 2006). Nevertheless studies by Negishi *et al.* (2002) using low EMF intensity showed that rats exposed to 50 Hz magnetic field of 7, 70 or 350 μ T for 22 h per day, during the preimplantation period

(gestational day 0–7) or fetal organogenesis (gestational day 8–15) did not show effects on reproduction and embryo–fetal development. The exposure of rats to 60 Hz and 5, 83.3 or 500 μ T magnetic field between the 6th and 20th day of gestation did not produce any biological significant effects on either dams or fetuses (Chung *et al.*, 2003).

EMF effects on male reproduction are also being investigated, but most of these results are still controversial. Male and female rats exposed to 50 Hz and 25 μ T magnetic fields for 90 days showed reduced fertility (Al-Akhras *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2004) showed that the exposure of mice to 60 Hz EMF of 0.5 mT increased the incidence of germ cell death and produced a higher apoptotic rate. Kim *et al.* (2009) also observed that apoptosis may be induced in spermatogenic cells exposed to a 60 Hz magnetic field of 14 μ T. Rats irradiated continuously during 1, 2 and 3 months using an EMF of 50 Hz and 48.21 mG showed a deceleration of the spermatogenesis and degeneration of germ cells dependent on the exposure time (Aydin *et al.*, 2007). Ramadan *et al.* (2002) showed that exposure of mice to fractionated doses of 50 Hz and 20 mT caused a significant decrease in sperm count,

*Correspondence to: V.A. Silva Junior, Federal Rural University of Pernambuco, Department of Animal Morphology and Physiology, Recife, Brazil.
E-mail: vajunior@dmfa.ufpe.br

^aFederal Rural University of Pernambuco, Department of Animal Morphology and Physiology, Recife, Brazil

^bFederal University of Paraná, Department of Physiology, Curitiba, Brazil

motility and daily sperm production and changes in testicular components. In humans, a daily exposure to power frequency magnetic fields (≥ 1.6 mG) for a relative long duration (>2.4 h/day) produced a higher risk of poor sperm quality, as well as decreased sperm density, vitality, morphology and motility (Li *et al.*, 2010).

Several studies reported no changes in male reproductive system related to exposure to electric and magnetic fields (Ryan *et al.*, 1999; Tablado *et al.*, 2000; Heredia-Rojas *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2005). Therefore, new studies are necessary to elucidate the effects of EMF on testicular development. The present study aims to investigate the effects of rat exposure to low-frequency EMF during the critical period of testicular development, from day 13 of gestation to the 21st postnatal day (Orth, 1982).

METHODS

Experimental Design

Wistar rats (*Rattus norvegicus*, var. *Albinos*) from the biotery of the Animal Morphology and Physiology Department of the Federal Rural University of Pernambuco were kept in an environment with controlled temperature (22 °C), humidity (50%) and light conditions (12 h light–dark cycle). Standard pellet food (Labina Purina) and water were available *ad libitum*. Male and females at 90 days old were mated. After confirmation of mating by vaginal cytology and estimated pups birth date, 13 pregnant females were housed in individual cages. These females were separated into two groups, a control ($n = 6$) and exposed to EMF from the 13th day of gestation ($n = 7$). After birth, 24 male pups were randomly chosen and remained separated into two groups: (i) 12 neonatal male rats that continued to be exposed to EMF up to 21st postnatal day; and (ii) 12 male rats that were maintained in the same experimental conditions, except for exposure to EMF (control group).

The experimental protocol was approved by Ethics Committee of the Animal Morphology and Physiology Department of the Federal Rural University of Pernambuco (CEEA-DMFA/UFRPE no. 06587/2006).

Electromagnetic Fields Exposure

The treated group was exposed to EMF with a frequency of 60 Hz and magnetic flux intensity of 1 mT. EMF were irradiated by a series of Helmholtz coils (PHYWE, Germany), connected in parallel to a voltage generator (Stufentrafo power supply 14 V/a.c., PHYWE, Germany), emitting electromagnetic sinusoidal waves.

Animals were placed in a cylindrical compartment of polyvinyl chloride (PVC), centrally located between two Helmholtz coils. These were characterized by pairs of circular coils, containing a certain number of turns and the separation between coils was equal to the common radius of both (Robert, 2003). Helmholtz coil central location provides a uniform electromagnetic field and allows the electric and magnetic field lines transversely across the animals. The pups were exposed to EMF during the early postnatal period using a structure similar to a PVC drawer attached to the cylinder centrally located in the coils.

EMF was monitored by a Teslameter (PHYWE, Germany) to measure the magnetic flux density and an oscilloscope (MIMIPA MO-125 OS 50 MHz, Triefield Broadband Meter, USA) to monitor the frequency of the waves emitted by the coils. The exposure to

EMF was performed during the experimental period in three applications of 30 min per day. We used EMF in fractionated doses once the exposure of fractionated doses revealed more potential testicular impairment than acute dose (Ramadan *et al.*, 2002).

Most residential electrical distribution networks and electro-electronic devices usually generate EMF flux less than 0.2 mT, although some areas may exceed this intensity (Boorman *et al.*, 1999). According to the International Non-Ionizing Radiation Committee, the limits for magnetic field density for occupational exposure were set at 0.5 mT for the entire workday, 5 mT for 2 h or less and 25 mT for exposure to limbs (Slinney and Patterson, 2010). The exposure to EMF used in the present study was within the limits described in the literature.

Perfusion and Weight Evaluation

The rats were anesthetized (sodium thiopental, 50 mg kg⁻¹), heparinized (sodium heparin, 125 IU per 100 g) and submitted to an intracardiac perfusion with NaCl 0.9% solution plus heparin (50 IU l⁻¹) on the 21st postnatal day. After perfusion of the vascular system, the animals were perfused with 4% glutaraldehyde solution in phosphate buffer (0.01 M and pH 7.2). Both testes were dissected and weighted on 21st postnatal day (testicular gross weight) using a balance BEL Engineering (MARK 500/BRA) with 0.001 g of precision. The value of testicular liquid weight was obtained by subtracting 9.2% (relative to the albuginea) of the testicular gross weight (Russell and França, 1995). The gonadosomatic index (GSI) was calculated by the fraction between the medium weights of both testes and the total body weight. In the testicular weight evaluations, 12 animals were used from each experimental group.

Histomorfometrical Analysis

Testicular histomorphometrical analysis was performed on 21st postnatal day. The testes were removed and fixed in the same solution used for perfusion for 2 h. We used one testis per animal for microscopic analysis. Testicular fragments were cut with a thickness of 2 mm. These fragments remained immersed in phosphate buffer for 2 h and then dehydrated in crescent series of alcohols and embedded in plastic resin composed of glycol methacrylate (Leica). Histological sections 4 μ m thick were stained with 1% toluidine blue/sodium borate and analyzed morphologically and morphometrically.

Tubular diameter was measured at 100 \times using linear micrometer reticle (Olympus U-OCM 10 mm/100) calibrated with a standard micrometer. The mean tubule diameter for each animal was obtained from the measurement of 15 tubules, randomly chosen with round or rounded shape. To do this, two diametrically opposed measures were performed using as reference the tunica propria.

Volumetric density (%) of the testicular parenchyma was obtained using point counting by systematic allocation through micrometer graticule (Olympus U-OCMSQ 10 mm/100) with 441 intersection points on the histological preparation of the testis in 400 \times magnification. Fifteen fields were counted randomly, totaling 6615 points for each animal. The volume of each component of the testis expressed in microliters was established from the product of the volume density of testicular components (%), and testicular liquid weight calculated in milligrams (Silva *et al.*, 2006).

As the density of testis is approximately 1.03–1.04 (Rocha *et al.*, 1999), the testis weight was considered equal to its volume. The total length of seminiferous tubules (TL) was expressed in meters and estimated from the following formula (Silva *et al.*, 2006):

$$TL = \frac{TVS}{\pi R^2}$$

where TVS = total volume of seminiferous tubules and πR^2 = the cross sectional area of seminiferous tubules (R = tubular diameter/2).

The numbers of Sertoli cells were corrected for the nuclear diameter (ND) and thickness of the histological section (Silva *et al.*, 2006):

$$CN = CC \times \frac{\text{slice thickness}}{\text{slice thickness} + \sqrt{\left(\frac{ND^2}{2}\right) - \left(\frac{ND^2}{4}\right)}}$$

where CN = corrected number and CC = crude count.

The total population of Sertoli cells per testis was obtained from the corrected number of Sertoli cells nucleus per cross section of seminiferous tubule and the total length of seminiferous tubules per testis (Silva *et al.*, 2006):

$$NSC/\text{Testis} = \frac{TLST (\mu\text{m}) \times CNSC}{\text{slice thickness} (\mu\text{m})}$$

where NSC/Testis = Number of Sertoli cells per testis, TLST = total length of seminiferous tubules (μm) and CNSC = corrected number of Sertoli cells.

Microscopic histomorphometrical analysis used 12 animals from each experimental group.

Computational Histomorphometry

The height of seminiferous epithelium and seminiferous tubules area per cross section was measured at 100 \times and individual Leydig cell area was measured at 1000 \times . The height of the epithelium was performed through two diametrically opposed measures, using as reference the tunica propria and the boundary between lumen and seminiferous epithelium. The mean area of seminiferous tubules per cross section and the height of the seminiferous epithelium were obtained from the measurement of 15 randomly chosen tubules, but with round or rounded shape. Mean individual Leydig cell area was obtained from measurement of 30 cells.

After production of the testicular histological sections, the capture of the images was performed through an optical microscope, MOTIC® BA300, coupled to a digital camera, MOTICAM® 2300, connected to a microcomputer. All histometric computational analysis was conducted using of the biometric software Motic Images Plus 2.0® (2007). Computer histomorphometrical analysis used 12 animals from each experimental group.

Plasma Testosterone

Blood samples were collected before intracardiac perfusion by puncturing the convergence of the vena cava cranial and caudal. The plasma was separated by centrifugation and packed in Eppendorf plastic containers (two per sample). The samples were maintained in a freezer at -20°C . The dosage of plasma testosterone was performed by enzyme-immunoassay (ELISA, enzyme linked immuno sorbent assay), with absorbance reading at 405 nm, as described by Brown *et al.* (2004). All samples were read in duplicate, with a coefficient of variation intra- and inter-assay less than 10%. In plasma testosterone analysis six animals were used, randomly chosen from different litters from each experimental group.

Statistical Analysis

The Shapiro–Wilks test was used to check the tendency to normality of the obtained data. Subsequently, depending on the normal trend of the results, we used a parametric or nonparametric test. When data were considered normal we used the t -independent test. If it did not follow a normal trend, we used the Mann–Whitney test. The data were expressed as mean and (\pm) standard deviation. All statistical analysis was outlined for $P < 0.05$.

RESULTS

Testicular Histomorphometry

Table 1 shows the biometric and morphometric parameters of the testis in rats exposed to EMF from the 13th day of gestation to the 21st postnatal day and without EMF exposure (control). In Table 2 is showed the volume (μL) of testicular components in the same experimental conditions. The statistical analysis showed that the diameter of the seminiferous tubules was significantly reduced in animals exposed to EMF (Table 1, Fig. 1A, B). The rats

Table 1. Biometric and morphometric parameters of the testis in rats exposed to EMF from the 13th day of gestation to 21 postnatal days and control animals

	Control ($n = 12$)	Exposed to EMF ($n = 12$)	t/P
Testicular gross weight (g)	0.128 \pm 0.009	0.118 \pm 0.014	$t = 1.980/P = 0.060$
Gonadosomatic index ($\times 10^3$)	2.230 \pm 0.197	2.347 \pm 0.312	$t = 1.100/P = 0.283$
Testicular liquid weight (g)	0.116 \pm 0.008	0.108 \pm 0.013	$t = 1.898/P = 0.070$
Tubular length (m)	5.617 \pm 0.530	6.167 \pm 1.008	$t = 1.673/P = 0.108$
Sertoli cells per cross section	13.792 \pm 1.075	12.990 \pm 0.988	$t = 1.903/P = 0.070$
Sertoli cells population ($\times 10^7$)	1.939 \pm 0.124	2.017 \pm 0.227	$t = 0.563/P = 0.578$
Tubular diameter (μm)	155.10 \pm 3.463	141.48 \pm 4.954	$t = 7.809/P < 0.001^*$

*Statistically significant ($P < 0.05$).

Table 2. Volume (μl) of testicular components in rats exposed to EMF from the 13th day of gestation to 21 postnatal days and control animals

	Control ($n = 12$)	Exposed to EMF ($n = 12$)	t/P
Seminiferous tubules	106.422 \pm 7.645	96.816 \pm 1.402	$t = 2.089/P = 0.048^*$
Seminiferous epithelium	92.835 \pm 7.788	83.88 \pm 12.63	$t = 2.091/P = 0.048^*$
Lumen	7.270 \pm 3.025	4.110 \pm 1.363	$t = 2.255/P = 0.034^*$
Tunica propria	8.007 \pm 1.538	8.820 \pm 2.746	$t = 1.995/P = 0.058$
Intertubular space	10.985 \pm 2.657	11.694 \pm 1.957	$t = 0.747/P = 0.462$
Leydig cells	3.011 \pm 0.481	2.225 \pm 0.584	$t = 3.596/P = 0.001^*$
Connective tissue cells	0.943 \pm 0.301	1.263 \pm 0.365	$t = 2.336/P = 0.029^*$
Blood vessels	0.714 \pm 0.278	1.014 \pm 0.379	$t = 2.412/P = 0.024^*$
Lymphatic space	6.094 \pm 2.702	6.791 \pm 1.852	$t = 0.737/P = 0.468$

*Statistically significant ($P < 0.05$).

exposed to EMF had a significant reduction in volume of the seminiferous epithelium and tubular lumen, resulting in a significant reduction in the volume occupied by the seminiferous tubules (Table 2). In this table can be noted a significant decrease in the volume occupied by Leydig cells in interstitial tissue. In Fig. 1 can be observed the testicular components evaluated in the present study. No pathological changes were observed in the testis of rats exposed to EMF (Fig. 1B, D and F).

There were no significant changes in the total population of Sertoli cells and number of Sertoli cells per cross section. Thus, apparently EMF does not influence quantitatively the Sertoli cells. The total length of the seminiferous tubules, volume of tunica propria, lymphatic space and intertubular space did not show statistical difference between animals exposed or not to EMF (Tables 1 and 2).

Computational Histometry

In Table 3 it is shown that EMF reduced the seminiferous tubules area and epithelium height. The present study showed that computational histometry results are in agreement with the volumetric results, since all parameters related to seminiferous tubules are reduced in animals exposed to EMF. In animals exposed to EMF a significant increase was observed on individual Leydig cell area, when compared with control animals (Table 3).

Plasma Testosterone

The results obtained for plasma testosterone assay can be seen in Table 4. There was no statistically significant difference between animals exposed to EMF and the control group, both in nmol l^{-1} and in ng ml^{-1} or in the ratio of concentration and volume (%).

DISCUSSION

Testicular Histomorphometry

Histomorphometric parameters analysis indicated a testicular development delay in animals exposed to 60 Hz and 1 mT EMF from the 13th day of gestation to the 21st postnatal day, the period in which the maturation of Sertoli and Leydig cells occurs in rats (Orth, 1982). This EMF irradiation caused the following changes: decrease in the volume occupied by seminiferous

tubules, tubular lumen volume and seminiferous epithelium volume, tubular diameter, epithelium height and area of seminiferous tubule per cross section. All these results suggest that exposure to EMF may promote a delay in testicular development, slowing the transition of non-lumined spermatogenic cords to lumined seminiferous tubules.

Sertoli cells have many important functions in adult testis, including direct functions in the proliferation and differentiation of germ cells during spermatogenesis (França and Chiarini-Garcia, 2005). These cells also have an essential role during testis differentiation in the fetuses since this period is crucial for establishment of adult testis pattern (Orth, 1993). Therefore, blocking cell proliferation during this period has been shown to prevent Sertoli cell differentiation and spermatogenic cord formation (Ross and Capel, 2005).

Maturation of Sertoli cells is characterized by appearance of the blood–testis barrier and as consequence the appearance of tubular lumen and progression of germ cells beyond the stage of primary spermatocytes. In rats, this event occurs between 14 and 20 days after birth (Pelletier, 1998; Griswold, 1998; França and Chiarini-Garcia, 2005). Immature Sertoli cells do not have the tight junctions (blood–testis barrier) completely formed (Jégou, 1992); therefore, these cells would not be able to support the entry of germ cells in meiotic division. This could reduce the number of germ cells in the epithelium of seminiferous tubules, justifying the results observed in animals exposed to EMF in the present study. Another well-characterized event of the Sertoli cells maturation is the formation of tubular lumen due to the secretion of seminal fluid in a polarized mode by Sertoli cells (Orth, 1993). We observed a reduction of tubular lumen volume in animals exposed to EMF; this can also be considered as indicative of retardation of the blood–testis barrier formation.

The delay of the spermatogenic process usually does not occur because there is a restricted control that does not permit or allows only a slight delay in the spermatogenesis development (Russell *et al.*, 1990). In the deficiency of vitamin A there is a delay in spermatogenic process once A1 spermatogonia are piled up inside seminiferous tubule (Russell *et al.*, 1990). Hypothyroidism also slows spermatogenesis, resulting in delayed maturation of Sertoli cells, apoptosis of germ cells and peritubular myoid cells remaining immature (França and Chiarini-Garcia, 2005). These histological patterns were not observed with optical microscopy after exposure to 60 Hz and 1 mT EMF. Therefore, other mecha-

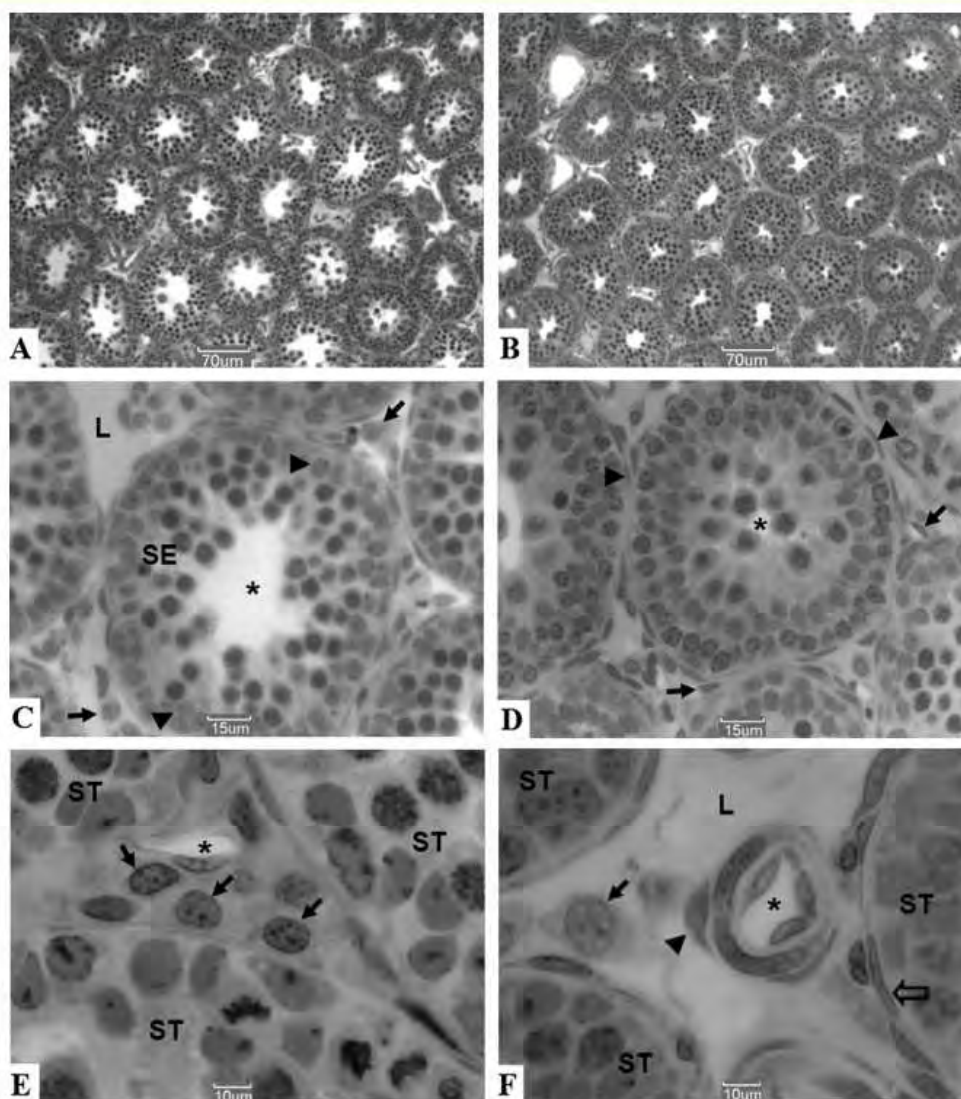


Figure 1. Photomicrographs of the testis in rats at 21 postnatal days. Control group (1A, 1C and 1E) and group exposed to EMF from 13 days of gestation to 21 postnatal days (1B, 1D and 1F). Figure 1B shows seminiferous tubules of EMF exposed rats with a reduced size than control animals (1A). Figure 1C shows the seminiferous epithelium (SE), tubular lumen (*), Sertoli cells (arrow head), Leydig cells (arrow) and lymphatic space (L). Note in figure 1D a seminiferous tubule in lamination process (*), tunica propria (arrow head) and connective tissue cells (arrow). In figure 1E can be observed seminiferous tubules (ST), blood vessels (*) and Leydig cells (arrow). Figure 1F shows in detail seminiferous tubules (ST) and blood vessels (*), note Leydig cell (arrow), connective tissue cell (arrow head) and tunica propria (large arrow). In figure 1A and 1B was used 100X, 1C and 1D was used 400X, 1E and 1F was used 1000X.

Table 3. Computational morphometric parameters of the testis in rats at 21 postnatal days exposed to EMF from day 13 of gestation to 21 postnatal days and control animals

	Control (n = 12)	Exposed to EMF (n = 12)	t/P
Seminiferous tubule area (μm^2)	15380 \pm 1046	13926 \pm 780	t = 3.862/p < 0.001*
Epithelium height (μm)	49.152 \pm 1.610	45.371 \pm 2.202	t = 4.802/p < 0.001*
Individual Leydig cell area (μm^2)	397.985 \pm 13.201	454.204 \pm 20.604	t = 5.955/p < 0.001*

*Statistically significant ($P < 0.05$).

Table 4. Plasma testosterone analysis of rats at 21 postnatal days exposed to EMF from day 13 of gestation to 21 postnatal days and control animals

	Control (n = 6)	Exposed to EMF (n = 6)	U/P
Testosterone (nmol l ⁻¹)	13.65 ± 3.08	12.96 ± 3.52	U = 21/P = 0.69
Testosterone (ng ml ⁻¹)	3.93 ± 0.88	3.73 ± 1.01	U = 21/P = 0.69
Testosterone (CV%)	4.04 ± 3.26	4.25 ± 3.28	U = 18/P = 0.99

*Statistically significant (P < 0.05).

nisms could be involved in hold back the incoming germ cell to meiotic stage due to exposure to EMF.

Histomorphometric analysis in the present study showed that EMF seems to interfere with the formation of the blood–testis barrier. These specialized zones are formed by tight junctions (Holstein *et al.*, 2003). These junctions are complex structures formed from several families of proteins in different degrees of association, in both the extracellular and intracellular domains (Nusrat *et al.*, 2000a). The function of tight junctions is regulated by different mechanisms, involving the participation of different cell types and chemical stimuli, such as the presence of cytokines and proinflammatory mediators (Nusrat *et al.*, 2000b; Usami *et al.*, 2001; Gassler *et al.*, 2001). Different types of enzymes kinases may also be present, some associated with protein G (Saha *et al.*, 2001) or Ca²⁺-dependent, regulating the permeability and paracellular transepithelial resistance (Van Itallie *et al.*, 1995). Considering that electric and magnetic fields can affect different mechanisms mediated by Ca²⁺ (Rusovan and Kanje, 1992; Lednev, 1995; Tonini *et al.*, 2001; Manikonda *et al.*, 2007), it is possible that the delay of the formation of tight junctions promoted by 1 mT and 60 Hz EMF could be related to the Ca²⁺-dependent protein system.

Previously, Somosy *et al.* (2004) showed that 50 Hz and 500 μ T magnetic field exposure increased the amount of occludin, cadherins and β -catenin in the junctional area of Madin Darby canine kidney cells (MDCK), indicating that magnetic field can modify the distribution of tight junctions structural proteins. Wang *et al.* (2008) using electromagnetic pulses at 200 kV m⁻¹ for 200 pulses with a 2 s interval, observed an increased permeability of the blood–testis barrier in Sertoli cells of adult mice. Therefore, it has been reported that electric and magnetic stimulation can interact with the tight junctions in animals. However, further studies are necessary to elucidate the relationship between the EMF and blood–testis barrier formation in Sertoli cells.

EMF (60 Hz and 1 mT) seems to influence Sertoli cells qualitatively, causing the delay of the appearance of tubular lumen; however not quantitatively, since Sertoli cell number per testis was not altered. Sertoli cells per cross section and Sertoli cell population remained similar in control and exposed animals.

Research carried out to evaluate possible effects of electric and magnetic fields on biological systems is still controversial. Several studies have reported adverse effects caused by electric and magnetic fields in spermatogenesis and male fertility, such as cytotoxic effects on spermatogonia, increased incidence of apoptosis, deceleration of spermatogenesis, degeneration of germ cells, decreased testicular biopsy score, reduction in the count, motility and daily sperm production, reduction of the fertility in rats and adverse effect on sperm quality in humans (De Vita *et al.*, 1995; Al-Akhras *et al.*, 2001; Ramadan *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Aydin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Huuskonen *et al.* (2001) observed that 50 Hz and 130 μ T magnetic fields did not impair implantation, but may be able to

promote some changes in the transport and development of embryos and associated endocrinologic parameters. However, Tablado *et al.* (2000) showed that *in utero* exposure to 500–700 mT static magnetic fields from the 7th day of gestation to the day of birth, applied 1 h per day or continually, did not affect testis and epididymis development in mice, and did not change histopathology evaluation of testis and epididymis in pups of 1, 5, 15 and 35 days of age. Chung *et al.* (2005) observed that exposure of rats to a 60 Hz EMF of 5, 83.3 or 500 mT from the 6th day of gestation to the 21st day of lactation (21 h/day) did not produce any detectable alterations in testis weight, testicular histology, sperm count, daily sperm production, sperm motility, sperm morphology and reproductive capacity of F1 offspring. Most of the analysis carried out in these studies was not as sensitive as the histomorphometric measurements of spermatogenesis parameters to detect disorders in testicular development. This fact may help to explain the differences observed between results in the present study and previous studies.

Most of the studies cited previously used protocols of continuous exposure to electric and magnetic fields or for long periods of exposure. According to Kwee and Raskmark (1998), a longer exposure time than that at which the maximum effect was reached did not result in a higher effect. This could be due to adaptation and also could explain why no effect on cell proliferation was detected if cells cultures were exposed for hours, days or weeks to a magnetic field.

Ramadan *et al.* (2002) observed that exposure to fractionated doses of the magnetic field revealed more potential for testicular impairment than acute doses. Therefore, three daily doses of EMF may have influenced in different results observed in this experiment and other works previously cited that had applied only one dose.

We also observed an increase in the volume occupied by blood vessels in the testis of animals exposed to EMF. The response of the blood vessels due to irradiation has already been described in the literature. Tepper *et al.* (2004) observed that 15 Hz EMF and magnetic flux density of 12 G may increase angiogenesis in mice and in cell cultures by stimulating the release of FGF-2 (fibroblast growth factor-2). We did not find other reports of adverse effects in testicular angiogenesis related to electric and magnetic field exposure, but EMF also seems to influence testicular blood vessel formation.

Plasma Testosterone

In the present study, there was no change in plasma levels of testosterone in animals exposed to EMF compared with controls. According to Kato *et al.* (1994), 6 weeks of continuous exposure to 50 Hz magnetic field of 1, 5 or 50 μ T did not change plasma testosterone concentration in rats. McGivern *et al.* (1990) showed that circulating levels of testosterone, luteinizing hormone and

Electromagnetic field effects on testicular development

follicle-stimulating hormone were normal due to the exposition to EMF of 15 Hz (0.3 ms duration, peak intensity 8 Gauss) for 15 min twice per day, from the 15th to 20th day of gestation. According to Al-Akhras *et al.* (2006), in adult male rats exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic field at approximately 25 mT for 18 consecutive weeks there were no significant effects on the serum levels of male follicle stimulating hormone. However, there was a significant increase in the serum levels of male luteinizing hormone after 18 weeks of exposure and testosterone levels were significantly decreased only after 6 and 12 weeks of the exposure period. Forgács *et al.* (2004) also observed that Leydig cells culture obtained from mice exposed to magnetic fields of 50 Hz and 100 μ T showed an hCG-stimulated higher testosterone response compared with the sham-exposed controls. On the other hand, the basal testosterone production of cells and the level of serum testosterone remained unaltered.

Leydig cells are the steroidogenic lineage of the testis, responsible for the production of testosterone in both the embryonic and the adult testis. Embryonic and adult Leydig cells are two distinct populations. During embryogenesis, Leydig cells differentiate in the interstitial region and produce testosterone, which masculinizes the internal and external genitalia. This population of Leydig cells is gradually lost after birth, whereas the adult population is formed during puberty and is maintained throughout adult life (Ross and Capel, 2005).

Testosterone levels are related to the volume of Leydig cells (Ewing and Keeney, 1993; França *et al.*, 2005). Considering that smooth endoplasmic reticulum and mitochondria occupy 40 and 13% of Leydig cell volume (Mendis-Hadagama *et al.*, 1988), and the structure of Leydig cells and their steroidogenic function are correlated (Zirkin *et al.*, 1980), the increased individual area of Leydig cells observed in the present study may compensate for the reduction in total volume occupied by Leydig cells, keeping normal levels of plasma testosterone.

EMF increased the total volume occupied by connective cells in intertubular tissue, probably as a mechanism to compensate for the reduction of the total volume of Leydig cells, considering that the extracellular matrix in intertubular tissue must be maintained.

Final Considerations

Malformations were not observed in newborn animals in the present study. Therefore, 60 Hz and 1 mT EMF were not sufficient to cause malformations in fetuses, as were observed in high magnetic field by Saito *et al.* (2006). These authors applied a magnetic field with intensity 400 times greater than that observed in the present study. However, this is smaller than the magnetic field emitted by equipment such as magnetic resonance imaging systems that use flux densities of up to 2.5 T (Saito *et al.*, 2006).

There are several factors that may have influenced the results of the present study and others cited above. The results reported in the literature are still controversial. The differences observed in the studies regarding the toxic potential of electric and magnetic fields can be related to the variation in the frequency and/or intensity, exposure protocol, species and strain of animals, as well as variation in exposure time. Saito *et al.* (2006) hypothesized that, if exposure to magnetic field were not fixed to a direction, the potential teratogenic would disappear or would not emerge. In this study we used the exposure to electromagnetic field in a fixed direction, transversely to the animals. This is a factor that

may help to explain the differences observed between this study and others previously discussed.

Several authors reported adverse effects of electric and magnetic fields related to fetal development and the male reproductive system. Al-Akhras *et al.* (2006) suggest that chronic exposure to 50 Hz magnetic fields may have adverse effects on mammalian fertility. Saito *et al.* (2006) suggest that high-dose magnetic fields are a health risk to prenatal development. In this study, we observed that EMF can promote changes in testicular development. Because the studies in several countries are contradictory, we are in agreement with Kheifets *et al.* (2005), and recommend additional research and a review of preventive policies for public health.

CONCLUSION

The present study observed that rats exposed to 60 Hz and 1 mT EMF from the 13th day of gestation to the 21st postnatal day had testicular alterations, indicating that electromagnetic fields can promote delayed testicular development.

REFERENCES

- Al-Akhras MA, Elbetieha A, Hasan MK, Al-Omari I, Darmani H, Albiss B. 2001. Effects of extremely low frequency magnetic field on fertility of adult male and female rats. *Bioelectromagnetics* **22**: 340–344.
- Al-Akhras MA, Darmani H, Elbetieha A. 2006. Influence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats. *Bioelectromagnetics* **27**: 127–131.
- Aydin M, Turk G, Yuksel M, Cevik A, Apaydin, AM, Yilmaz S. 2007. Effect of electromagnetic field on the sperm characteristics and histopathological status of testis in rats. *Medyc. Weteryn.* **63**: 178–183.
- Boorman GA, McCormick DL, Findlay JC, Hailey JR, Gauger JR, Johnson TR, Kovatch RM, Sills RC, Haseman JK. 1999. Chronic toxicity/oncogenicity evaluation of 60 Hz (power frequency) magnetic fields in F344/N rats. *Toxicol. Pathol.* **27**: 267–278.
- Brown J, Walker SE, Steinmain K. 2004. *Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species*. Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal; Virginia–EUA.
- Cecconi S, Gualtieri G, Di Bartolomeo A, Troiani G, Clifone MG, Canipari R. 2000. Evaluation of effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development. *Hum. Reprod.* **15**: 2319–2325.
- Chung MK, Kim JC, Myung SH, Lee DI. 2003. Developmental toxicity evaluation of ELF magnetic fields in Sprague–Dawley Rats. *Bioelectromagnetics*. **24**: 231–240.
- Chung MK, Lee SJ, Kim YB, Park SC, Shin DH, Kim SH, Kim JC. 2005. Evaluation of spermatogenesis and fertility in F1 male rats after *in utero* and neonatal exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Asian J. Androl.* **7**: 189–194.
- De Vita R, Cavallo D, Raganella L, Eleuteri P, Grollino MG, Calugi A. 1995. Effects of 50 Hz magnetic field on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometric analysis. *Bioelectromagnetics*. **16**: 330–334.
- Ewing LL, Keeney DS. 1993. Leydig cell: structure and function. In *Cell and Molecular Biology of the Testis*, Desjardins C, Ewing LL (eds). Oxford University Press: New York; 137–165.
- Forgács Z, Somosy Z, Kubinyi G, Sinay H, Bakos J, Thuróczy G, Surján A, Hudák A, Olajos F, Lázár P. 2004. Effects of whole-body 50-Hz magnetic field exposure on mouse Leydig cells. *Sci. World J.* **4**: 83–90.
- França LR, Chiarini-Garcia H. 2005. Célula de Sertoli. In *Células uma abordagem multidisciplinar*, Carvalho HF, Collares-Buzato CB (eds). Editora Manole: Barueri-SP; 302–324.
- França LR, Avelar GF, Almeida FFL. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63**: 300–318.
- Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartembeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. 2001. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**: 216–228.

- Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Dev. Biol.* **9**: 411–416.
- Heredia-Rojas JA, Caballero-Hernandez DE, Rodriguez AOL, Ramos-Alfano G, Rodriguez-Flores LE. 2004. 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*. **25**: 63–68.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**: 107.
- Huuskonen H, Saastamoinen V, Komulainen H, Laitinen J, Juutilainen J. 2001. Effects of low-frequency magnetic fields on implantation in rats. *Reprod. Toxicol.* **15**: 49–59.
- Jegóu B. 1992. The Sertoli cell *in vivo* and *in vitro*. *Cell Biol. Toxicol.* **8**: 49–54.
- Kato M, Honma K, Shigemitsu T, Shiga Y. 1994. Circularly polarized, sinusoidal, 50 Hz magnetic field exposure does not influence plasma testosterone levels of rats. *Bioelectromagnetics* **15**: 513–518.
- Kheifets L, Repacholi K, Saunders R, Van Deventer E. 2005. The sensitivity of children to electromagnetic fields. *Pediatrics* **116**: 303–313.
- Kim YW, Kim HS, Lee JS, Kim YJ, Lee, SK, Seo JN, Jung KC, Kim N, Gimm YM. 2009. Effects of 60 Hz 14 mT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics* **30**: 66–72.
- Kumar S. 2004. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup. Health* **46**: 1–19.
- Kwee S, Raskmark P. 1998. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 2. Microwave radiation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **44**: 251–255.
- Lednev VV. 1995. Interference with the vibrational energy sublevels of ions bound in calcium-binding proteins as the basis for the interaction of weak magnetic fields with biological systems. In *On the Nature of Electromagnetic Field Interactions with Biological Systems*, Frey AH, (ed.). Springer-Verlaag: New York; 59–72.
- Lee JS, Ahn SS, Jung KC, Kim YW, Lee SK. 2004. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian J. Androl.* **6**: 29–34.
- Li DK, Yan B, Li Z, Gao E, Miao M, Gong D, Weng XP, Ferber JR, Yuan W. 2010. Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality. *Reprod. Toxicol.* **29**: 86–92.
- Manikonda PK, Rajendra P, Devendranath D, Gunasekaran B, Channakeshava, Aradhya RSS, Sashidhar RB, Subramanyam C. 2007. Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca²⁺ signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **413**: 145–149.
- McGivern RF, Sokol RZ, Adey WR. 1990. Prenatal exposure to a low-frequency electromagnetic field demasculinizes adult scent marking behavior and increases accessory sex organ weights in rats. *Teratology* **41**: 1–8.
- Mendis-Hadagama SMLC, Zirkin BR, Ewing LL. 1988. Comparison of components of the interstitium with testosterone secretion in hamster; rat and guinea pig testes perfused *in vitro*. *Am. J. Anat.* **181**: 12–22.
- Negishi T, Imai S, Itabashi M, Nishimura I, Sasano T. 2002. Studies of 50 Hz circularly polarized magnetic fields of up to 350 μ T on reproduction and embryo-fetal development in rats: exposure during organogenesis or during preimplantation. *Bioelectromagnetics*. **23**: 369–389.
- Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL. 2000a. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* **113**: 1771–1781.
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. 2000b. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**: 851–857.
- Orth J. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative and autoradiographic study. *Anat. Rec.* **203**: 485–492.
- Orth JM. 1993. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In *Cell and Molecular Biology of the Testis*, Desjardins C, Ewing LL (eds), 1st edn. Oxford University Press: New York; 3–42.
- Pelletier RM. 1998. Blood–tissue barriers in the male reproductive system. In *Male Reproduction: a Multidisciplinary Overview*, Martínez-García FM, Regadera J (eds). Churchill Communications Europe España: Madrid; 183–195.
- Ramadan LA, Abd-Allah ARA, Aly HAA, Saad-El-Din AA. 2002. Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacol. Res.* **46**: 363–370.
- Robert, R. 2003. Bobina de Helmholtz. *Rev. Bras. Ens. Fis.* **25**: 40–44.
- Rocha DCM, Debeljuk L, França LR. 1999. Exposure to constant light during testis development increase daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue Cell* **31**: 372–379.
- Ross AJ, Capel B. 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**: 19–25.
- Rusovan A, Kanje M. 1992. D600, a Ca²⁺ antagonist, prevents stimulation of nerve regeneration by magnetic fields. *Neuroreport* **3**: 813–814.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. 1990. Mammalian spermatogenesis. In *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (eds). Cache River Press: Bolesta; 1–40.
- Russell LD, França LR. 1995. Building a testis. *Tissue Cell* **27**: 129–147.
- Ryan BM, Symanski RR, Pomeranz LE, Johnson TR, Gauger JR, McCormick DL. 1999. Multigeneration reproductive toxicity assessment of 60 Hz magnetic fields using a continuous breeding protocol in rats. *Teratology* **59**: 156–162.
- Saha C, Nigan SK, Denker BM. 2001. Expanding role of G proteins in tight junction regulation: G α (s) stimulates Tj assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**: 25–66.
- Saito K, Suzuki H, Suzuki K. 2006. Teratogenic effects of static magnetic field on mouse fetuses. *Reprod. Toxicol.* **22**: 118–124.
- Silva Jr VA, Vieira ACS, Pinto CF, De Paula TAR, Palma MB, Amorin MJAAL, Amorin Jr AA, Manhães-De-Castro R. 2006. Neonatal treatment with naloxone increases the population of sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod. Nutr. Dev.* **46**: 157–166.
- Sliney DH, Patterson RM. 2010. Guidelines for exposure to sub-radiofrequency electric and magnetic fields; http://www.irpa.net/irpa8/cdrom/vol.1/m1_228.pdf [23.02.2010] 925–928.
- Somosi Z, Forgács Z, Bognár G, Horváth K, Horváth G. 2004. Alteration of tight and adherens junctions on 50-Hz magnetic field exposure in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells. *Sci. World J.* **4**: 75–82.
- Tablado L, Soler C, Núñez M, Núñez J, Pérez-Sánchez F. 2000. Development of mouse testis and epididymis following intrauterine exposure to a static magnetic field. *Bioelectromagnetics* **21**: 19–24.
- Tepper OM, Callaghan EI, Chang RD, Galiano DK, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hooper A, Leville JP, Gurtner GC. 2004. Electromagnetic fields increase *in-vitro* and *in-vivo* angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J.*; doi: n.10.1096/fj.03-0847fje.
- Tonini R, Baroni MD, Masala E, Micheletti M, Ferroni A, Mazzanti M. 2001. Calcium protects differentiating neuroblastoma cells during 50 Hz electromagnetic radiation. *Biophys. J.* **81**: 2580–2589.
- Usami M, Muraki K, Iwamoto M, Ohata A, Matsushita E, Miki A. 2001. Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on tight junction permeability in intestinal monolayer cells. *Clin. Nutr.* **20**: 351–359.
- Van Itallie CM, Balda MS, Anderson JM. 1995. Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junctions protein- ZO-1 in A341 cells. *J. Cell Sci.* **108**: 1835–1842.
- Wang XW, Ding GR, Shi CH, Zhao T, Zhang J, Zeng LH, Guo GZ. 2008. Effect of electromagnetic pulse exposure on permeability of blood–testicle barrier in mice. *Biomed. Environ. Sci.* **21**: 218–221.
- Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* **107**: 1867–1874.

5.2. Capítulo 2:

Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields

Avaliação da degeneração testicular induzida pelo campo eletromagnético de baixa frequência

Publicado em:

TENORIO, B.M.; JIMENEZ, G.C.; MORAIS, R.N.; PEIXOTO, C.A.; NOGUEIRA, R.A.; SILVA JUNIOR, V.A. Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields. *Journal of Applied Toxicology*. 2011. DOI: 10.1002/jat.1680.

Evaluation of testicular degeneration induced by low-frequency electromagnetic fields

Bruno Mendes Tenorio,^a George Chaves Jimenez,^a
Rosana Nogueira de Moraes,^b Christina Alves Peixoto,^c
Romildo de Albuquerque Nogueira^a and
Valdemiro Amaro da Silva Junior^{a*}

ABSTRACT: The population exposure to electromagnetic fields (EMF) has been growing in recent decades. The generation, distribution and use of electric energy can generate low-frequency electromagnetic fields. The present study investigates the effects of EMF (60 Hz and 1 mT) on spermatogenesis of rats during different periods of maturation. Wistar rats were exposed to EMF from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90 in three daily applications of 30 min. Plasma testosterone concentration was not changed by EMF exposure; however, histopathological and histomorphometrical analyses of the testes showed testicular degeneration in a subset of animals exposed to EMF. The magnitude of the degenerative process varied between those individuals affected, indicating different individual sensitivity to EMF. The main alterations observed through transmission electron microscopy were highly electron-dense mitochondria with loss of their organization and cristae. Exposure to 60 Hz and 1 mT EMF can disturb spermatogenesis and may produce subfertility or infertility. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: electromagnetic fields; non-ionizing radiation; spermatogenesis; testis; testicular degeneration; testosterone

INTRODUCTION

The population exposure to electromagnetic fields (EMF) has gradually increased due to the technological expansion observed in the last decades. Daily, large numbers of people use electronic industrial equipment which employs alternating electric current. Low-frequency EMF is associated with the production, distribution and use of alternating current electricity (Boorman *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2005). Research shows that the male reproductive system is vulnerable to physical factors and these can generate reproductive disorders (Kumar, 2004). In humans, between 10 and 17% of all couples experience primary or secondary subfertility at some period during their reproductive life (Ebisch *et al.*, 2007) and men account for 20% of sterility cases (Winker and Rüdiger, 2006).

Studies carried out to evaluate the possible effects of electric and magnetic fields on biological systems are still controversial. Several studies have reported adverse effects caused by electric and magnetic fields on spermatogenesis and male fertility, such as: cytotoxic effects on spermatogonia, increased incidence of apoptosis, deceleration of spermatogenesis, degeneration of germ cells, decreased testicular biopsy score, reduction in count and motility and daily sperm production, as well as reduction of fertility in rats and adverse effect on human semen quality (Al-Akhras *et al.*, 2001; Aydin *et al.*, 2007; De Vita *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010; Ramadan *et al.*, 2002). However, other studies reported that electric and magnetic fields do not affect the male reproductive system (Chung *et al.*, 2005; Heredia-Rojas *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 1999; Tablado *et al.*, 2000).

Owing to the need for more studies to clarify the possible effects of EMF on spermatogenesis, the aim of the present study was to investigate the effects of exposure to low-frequency EMF

during critical periods of testicular development and function in rats, from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus*, var. Albinos) from the biotery (Department of Animal Morphology and Physiology of Federal Rural University of Pernambuco) were kept in an environment with controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (50%) and a 12 h light–dark cycle. Animals remained with their mothers for up to 21 days after birth. After weaning, each group was divided into batches of six animals per cage and received standard food (Purina Labina) and water *ad libitum*.

Experimental Design

After confirmation of mating and estimated birth date, 12 pregnant females were exposed to EMF from day 13 of gestation.

*Correspondence to: V. A. Silva Junior, Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: vajunior@dmfa.ufpe.br

^aDepartment of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^bDepartment of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^cNortheast Strategic Technologies Center (INT-CETENE), Recife, Pernambuco, Brazil

Six females underwent the same experimental conditions except for EMF presence (control dams). Two newborn male rats from each female were used for the composition of the following groups:

- Group I – rats were exposed to EMF from day 13 of gestation to adult period at postnatal day 90 ($n=12$).
- Group II – rats were exposed to EMF from the gestational day 13 to pre-pubertal period at postnatal day 21 ($n=12$). These rats were left in an environment free of EMF for up to 90 postnatal days to verify a possible recovery from EMF effects.
- Group III – rats were analyzed at postnatal day 90 as the control group ($n=12$). These animals were kept under the same experimental conditions, except for EMF presence.
- Group IV – a negative control group was composed of adult rats analyzed at postnatal day 90 without handling. These animals were evaluated to exclude possible interferences of handling with the results ($n=6$).

The experimental protocol was approved by Ethics Committee of the Animal Morphology and Physiology Department of Federal Rural University of Pernambuco (CEEAD-DMFA/UFRPE no. 06587/2006) in accordance with the basic principles for research using animals.

Exposure to Electromagnetic Fields

Animals were exposed to EMF with frequency of 60 Hz and magnetic flux intensity of 1 mT. EMF were irradiated by a series of Helmholtz coils (Phywe, Germany), connected in parallel to a voltage generator (Stufentrafo Power Suply 14V/AC; Phywe, Germany), emitting electromagnetic sinusoidal waves. Animals were placed in a cylindrical compartment of poly vinyl chloride (PVC) with openings for air intake, centrally located in the Helmholtz coil. These are characterized by pairs of circular coils, containing a certain number of turns and the separation between coils should be equal to the common radius to both (Robert, 2003). Helmholtz coil central location provides uniform electromagnetic field and allows the electric and magnetic field lines to cross the animals transversely.

EMF was monitored by a Teslameter (Phywe, Germany) to measure the magnetic flux density and an oscilloscope (Mimipa MO-125 OS, 50 MHz, USA) to monitor the frequency of the waves. The exposure to EMF was performed in three daily applications of 30 min.

According to the International Non-ionizing Radiation Committee (INIRC), the limits for magnetic field density for occupational exposure are 0.5 mT for the entire workday, 5 mT for exposure of 2 h or less and 25 mT for exposure to limbs (Slinney and Patterson, 2010).

Histopathological and Histomorphometrical Analysis of Testes

Testicular analysis was performed at postnatal day 90 in all experimental groups. Rats were anesthetized (sodium thiopental, 50 mg kg⁻¹), heparinized (sodium heparin, 125 IU per 100 g) and subjected to an intracardiac perfusion with NaCl 0.9% solution plus heparin (50 IU l⁻¹). After perfusion of the vascular system, the animals were perfused with 4% glutaraldehyde solution in phosphate buffer (0.1 M and pH 7.3). The testes were removed and fixed in the same solution used for perfusion for 2 h.

Fragments were removed from the central region of the testes and cut into 2 mm thickness. These fragments remained immersed in phosphate buffer for 2 h and then dehydrated in a graded alcohol series and embedded in plastic resin of glycol methacrylate (Leica). Histological sections 4 μm thick were stained with 1% toluidine blue/sodium borate and analyzed morphologically and morphometrically.

Histomorphometrical analyses were performed according to Silva Junior *et al.* (2006).

Computer-assisted Histomorphometry

The seminiferous tubules area and perimeter per cross section were measured at 100× and the tunica propria was used as a reference. The measurements were obtained from 15 randomly chosen tubules, with rounded shape. Computational histomorphometry was performed according to Tenorio *et al.* (2010). All computational and microscopic histomorphometrical analysis used 12 animals from each experimental group.

Electron Microscopy

The fragments of testes were fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. After fixation, the samples were washed twice in the same buffer and then they were post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone and embedded in SPIN-PON (Embed 812). Polymerization was carried out at 60°C for 3 days. Ultrathin sections were collected on 300-mesh nickel grids, counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate. Electron microscopy analysis was performed with a FEI Morgani 268D transmission electron microscope.

Plasma Testosterone

Blood samples were collected by puncturing in the convergence of the vena cava cranial and caudal. The plasma was separated by centrifugation and packed in Eppendorf plastic containers (two per sample). The samples were maintained in a freezer at -20°C. The plasma testosterone concentration was measured by enzyme-immunoassay (ELISA; enzyme linked immuno sorbent assay), with absorbance reading at 405 nm, as described by Brown *et al.* (2004). All samples were read in duplicate, with a coefficient of variation intra- and inter-assay less than 10%. In plasma testosterone analysis six animals were used, randomly chosen from each experimental group.

Statistical Analysis

The Shapiro–Wilks test was used to check the tendency to normality of the data. Subsequently, depending on the normal trend of the results, we used a parametric or nonparametric test. For the data considered normally distributed, we used analysis of variance (ANOVA) with the Tukey–Kramer *post-hoc* test. If the data was not normally distributed, we used the nonparametric test of Kruskal–Wallis with Dunn's *post-hoc* test. The data were expressed as mean and (±) standard deviation. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant for all tests. Fisher's exact test was used to compare differences in frequency of pathological lesions.

RESULTS

Histopathological Analysis of Testes

Histopathological examinations showed no changes in testes of negative control and control animals (Fig. 1A).

Pathological lesions were observed in the testes of 50% of animals exposed to EMF from day 13 of gestation to postnatal day 21 and analyzed at 90 days old. In 16.6% of the animals more severe lesions were observed, such as seminiferous epithelium desquamation, germ cells in tubular lumen, germ cells with nuclear condensation similar to apoptosis and vacuolation in Sertoli cells (Fig. 1B).

Histopathological analysis also demonstrated that 50% of animals exposed to EMF from gestation to postnatal day 90 showed some pathological lesions in the testis. In 25% of animals

in this group there were serious lesions to the seminiferous epithelium. Seminiferous epithelium desquamation, large amounts of desquamated germ cells in tubular lumen, tail swelling in elongating spermatids, increased intertubular space, thickening of the tunica propria, vacuolation in Sertoli cells, as well as large amounts of germ cells with morphological alterations similar to necrosis and apoptosis were observed (Fig. 1D). In 16.6% of animals the degenerative process ceased sperm production, because spermiation or sperm were not observed in the epithelium or lumen. In 8.3% of animals tubules with large reduction of seminiferous epithelium caused by excessive reduction of germ cells amount were observed. Some seminiferous tubules showed only the presence of Sertoli cells and spermatogonias (Fig. 1C and F). These animals also showed the presence of vacuolization in germ cells and syncytial giant cells or multinucleated giant cells (Fig. 1E). Fisher's exact test did

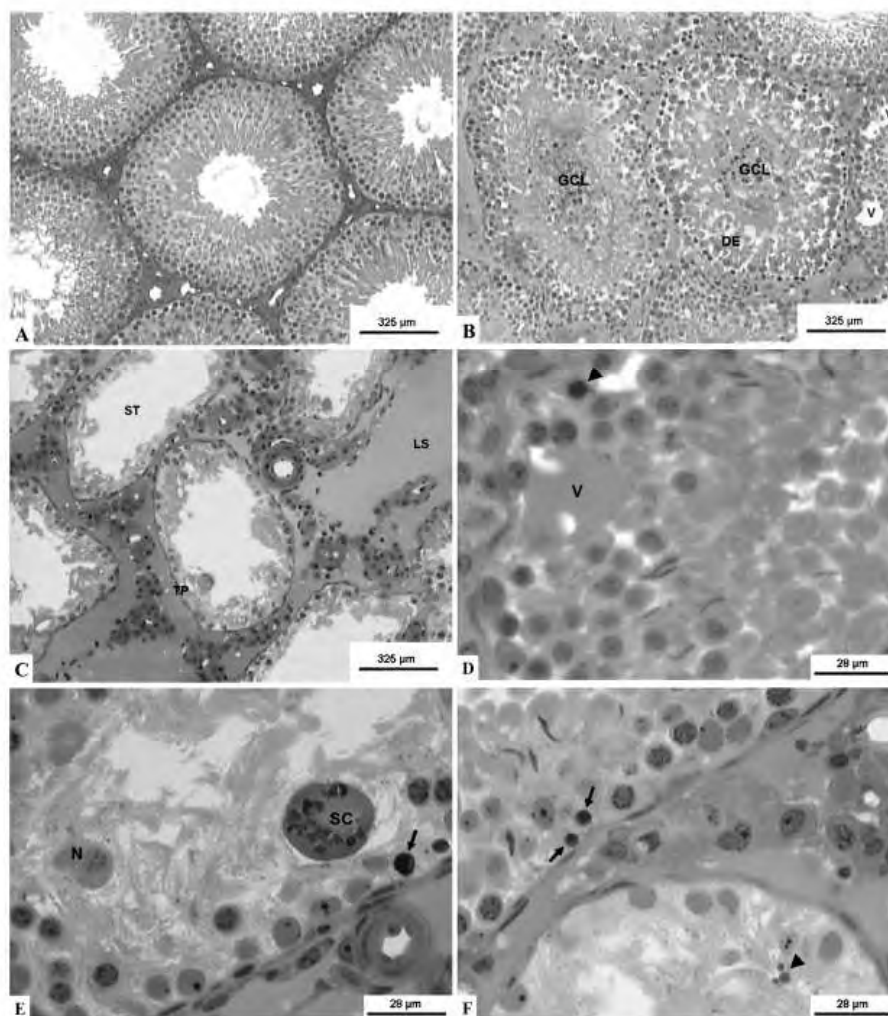


Figure 1. Photomicrographs of testes in control animals (1A) and exposed to low frequency EMF of 60 Hz and 1 mT from gestation to 21 (1B) or 90 (1C, 1D, 1E and 1F) postnatal days. Note in Figure 1A (control) no pathological lesions. In Figure 1B can be observed desquamation of seminiferous epithelium (DE), desquamated germ cells in tubular lumen (GCL) and vacuolization in Sertoli cells (V). In Figure 1C there is a tubule without spermatogenesis (ST), increased thickness of tunica propria (TP) and increased lymphatic space (LS). Note in Figure 1D vacuolization of Sertoli cell (V) and a germ cell in pyknosis (arrow head). In Figure 1E can be seen syncytial giant cells (SC), germ cell with morphological alterations similar to necrosis (N) and pyknosis (arrow). In Figure 1F can be observed germ cells with morphological alterations similar to apoptosis (arrow) and apoptotic bodies (arrow head).

not disclose statistical differences in frequency of pathological lesions between animals exposed to EMF up to postnatal day 21 or 90 ($p_{\text{one-tail}} = 0.5$).

In testicular qualitative analysis, there were different responses to EMF exposure in the same experimental group. In 50% of the animals, pathological lesions were not observed in both groups exposed to EMF. Another 50% of animals showed pathological lesions with different patterns of severity.

Electron Microscopy

Animals exposed to EMF from gestation to postnatal day 21 and analyzed at 90 days old or exposed from gestation to postnatal day 90 showed similar pathological lesions when evaluated by electron microscopy. There was greater severity in animals exposed to EMF up to 90 days.

Germ cells of basal and adluminal compartments showed irregular arrangement of high electron dense mitochondria with loss of their organization and cristae (Fig. 2A and B). Several germ cells presented intracytoplasmic vacuolation (Fig. 2B). Large vacuoles containing microtubules and flagella were observed. Several elongating spermatids showed acrosome with membrane vacuolization (Fig. 2B). There were elongating spermatids with dilation of perinuclear cisterns, irregular concentration of actin near to acrosome and an incomplete formation of

mitochondrial annulus in middle-piece. There was membrane overlapping with a small amount of cytosol between the membranes, circling the area of the acrosome and acrosomal cap (Fig. 2B). Some spermatids showed abnormal formation of the sperm head because the acrosomal cap did not fit the nucleus. In the tubular lumen, the middle-piece of elongating spermatids showed mitochondria with high electron density and flagellar microtubules with abnormal morphology. In several elongating spermatids, the mitochondria did not migrate to near the flagella (Fig. 2B). Inside of the seminiferous tubule lumen there were degenerated germ cells. Several cells showed round and highly electron dense bodies limited by units of stacked membranes resembling myelin sheath (Fig. 2C and D). We observed spaces filled with fluid and cellular debris from degenerated germ cells on the basal compartment. Mainly in animals exposed to EMF up to postnatal day 90, germ cells with cellular fragmentation similar to apoptosis, condensed nucleus and presence of apoptotic bodies were observed. Sertoli cells presented intracytoplasmic vacuolation and some mitochondria with increased electron density and loss of cristae.

Most of the Leydig cells showed no alterations, but some showed condensation of nuclear chromatin, clusters of heterochromatin in the inner membrane, dilatation of perinuclear cistern and some mitochondria with increased electron density and loss of cristae.

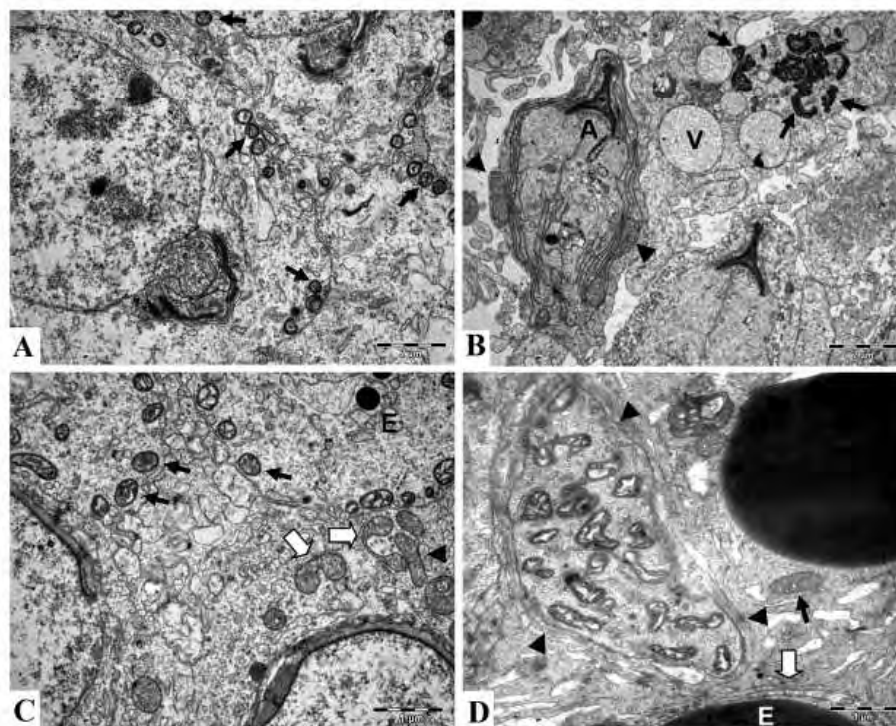


Figure 2. Transmission electron micrograph of testis in rats exposed to EMF from gestation up to 21 (Figures 2A, 2B) or 90 (Figures 2C, 2D) postnatal days. In Figure 2A can be observed round spermatids showing mitochondria with increased electron density and loss of their organization and cristae (arrow). Figure 2B shows formation of abnormal acrosomal cap (A), intracytoplasmic vacuoles (V) and irregular arrangement of mitochondria with high electron density (arrow). Note normal mitochondria near to acrosomal cap in elongating spermatids, indicating failure in mitochondrial migration to midpiece (arrow head). Note in Figure 2C the presence of a high electron dense material with rounded shape (E), normal mitochondria (arrow head) were dividing (large arrow) and mitochondria with increased electron density (arrow). In Figure 2D can be observed an autophagosome surrounding degenerated mitochondria (arrow head). The round high electron dense material (E) is surrounded by membranes (large arrow). Note normal mitochondria (arrow).

Electromagnetic field induces testicular degeneration

Testicular Histomorphometry

Quantitative histomorphometry of the testis was carried out to evaluate the distribution of the spermatogenesis parameters in animals that did not show testicular degeneration. There was no significant difference in testicular histomorphometric parameters between control and negative control group (Table 1). This fact can be considered an indication that experimental handling which animals of the groups exposed to EMF and control were submitted did not affect the results.

Testicular histomorphometric parameters of animals exposed to EMF from gestation to postnatal day 21 were not changed when compared with the control (Tables 2 and 3). Animals exposed to EMF from gestation to postnatal day 90 showed statistical difference only for the seminiferous tubules diameter

(Table 2). The volumes of testicular components were not statistically changed (Table 3).

The results obtained by histomorphometrical analysis in the groups exposed to EMF showed a high dispersion of the mean (standard deviation) (Fig. 3). It can be considered an indication that there were different patterns of response to EMF exposure in the same experimental group.

Computer-assisted Histomorphometry

Results of area and perimeter of the seminiferous tubules can be seen in Table 4. There were no significant changes in these parameters. However, area and perimeter showed significant difference in animals affected by testicular degeneration

Table 1. Testicular volume (μL) and histomorphometric parameters at 90 postnatal days. Animals were submitted to experimental handling (control group) and not submitted to handling (negative control)

	Negative control	control	F/p
Seminiferous tubules	1480.0 \pm 90.0	1345.21 \pm 121.2	F = 1.9/p = 0.12
Seminiferous epithelium	1289.5 \pm 83.2	1182.65 \pm 144.1	F = 1.5/p = 0.21
Lumen	136.8 \pm 81.7	105.4 \pm 35.3	F = 1.1/p = 0.32
Tunica propria	53.5 \pm 9.3	57.0 \pm 10.2	F = 0.3/p = 0.82
Leydig cells	20.2 \pm 2.6	29.7 \pm 17.8	F = 0.8/p = 0.49
Connective tissue cells	5.6 \pm 0.2	4.84 \pm 0.3	F = 1.0/p = 0.36
Blood vessels	10.9 \pm 0.4	15.4 \pm 0.3	F = 0.9/p = 0.42
Lymphatic space	103.7 \pm 19.4	111.9 \pm 19.1	F = 1.1/p = 0.33
Intertubular space	140.5 \pm 30.5	162.0 \pm 30.1	F = 1.1/p = 0.34
Liquid weight (g)	1.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	F = 1.3/p = 0.28
Tubular length (m)	19.3 \pm 1.2	17.6 \pm 1.4	F = 1.0/p = 0.37
Tubular diameter (μm)	312.2 \pm 6.1	312.6 \pm 7.4	F = 3.6/p = 0.21
Epithelium height (μm)	97.2 \pm 3.4	97.8 \pm 3.6	F = 1.3/p = 0.26
Sertoli cells population	$4.3 \times 10^7 \pm 8.5 \times 10^6$	$4.0 \times 10^7 \pm 6.6 \times 10^6$	F = 1.0/p = 0.36
SCI (%)	7.5 \pm 1.1	7.0 \pm 0.7	F = 2.3/p = 0.09
DSP	$2.2 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^6$	F = 0.5/p = 0.67
DSP/g	$1.4 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7 \pm 0.8 \times 10^6$	F = 0.0/p = 0.95

SCI, Sertoli cell index; DSP, daily sperm production.

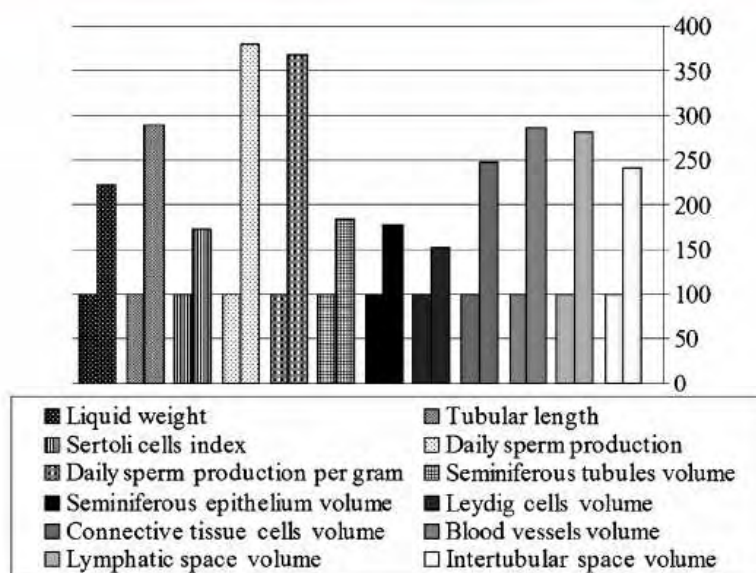
Table 2. Testicular biometric and histomorphometric parameters of rats at 90 postnatal days exposed to electromagnetic fields (60 Hz and 1 mT, 3 daily treatments of 30 min) from day 13 of gestation to postnatal days 21 or 90, control and negative control animals

	Negative control	Control	Exposed to EMF up to postnatal day 21	Exposed to EMF up to postnatal day 90	F/p
Liquid weight (g)	1.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2	F = 1.3/p = 0.28
Tubular length (m)	19.3 \pm 1.2	17.6 \pm 1.4	18.4 \pm 1.4	17.6 \pm 4.0	F = 1.0/p = 0.37
Tubular diameter (μm)	312.2 \pm 6.1 ^a	312.6 \pm 7.4 ^a	310.8 \pm 8.1 ^{ab}	302.5 \pm 5.9 ^b	F = 3.6/p = 0.02*
Epithelium height (μm)	97.2 \pm 3.4	97.8 \pm 3.6	96.6 \pm 3.6	94.4 \pm 4.2	F = 1.3/p = 0.26
Sertoli cells/cross section	9.0 \pm 1.4	9.3 \pm 1.1	8.1 \pm 1.1	8.6 \pm 1.5	F = 1.6/p = 0.20
Sertoli cells population	$4.3 \times 10^7 \pm 8.5 \times 10^6$	$4.0 \times 10^7 \pm 6.6 \times 10^6$	$3.6 \times 10^7 \pm 4.8 \times 10^6$	$3.8 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^7$	F = 1.0/p = 0.36
SCI (%)	7.5 \pm 1.1	7.0 \pm 0.7	8.1 \pm 1.1	7.1 \pm 1.3	F = 2.3/p = 0.09
DSP	$2.2 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^6$	$2.2 \times 10^7 \pm 5.3 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7 \pm 6.2 \times 10^6$	F = 0.5/p = 0.67
DSP/g	$1.4 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^6$	$1.41 \times 10^7 \pm 0.8 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7 \pm 3.2 \times 10^6$	F = 0.0/p = 0.95

*Statistically significant. Different letters in same line are equivalent to statistically significant difference. SCI, Sertoli cell index; DSP, daily sperm production.

Table 3. Testicular components volume (μL) of rats at 90 postnatal days exposed to electromagnetic fields (60 Hz and 1 mT, 3 daily treatments of 30 min) from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90, control and negative control animals

	Negative Control	Control	Exposed to EMF up to 21 postnatal days	Exposed to EMF up to 90 postnatal days	F/p
Seminiferous tubules	1480.0 \pm 93.9	1345.2 \pm 129.9	1402.2 \pm 134.1	1294.5 \pm 240.0	F = 1.9/p = 0.14
Seminiferous epithelium	1289.5 \pm 85.0	1182.6 \pm 142.2	1225.3 \pm 125.1	1116.9 \pm 253.5	F = 1.5/p = 0.21
Lumen	136.8 \pm 8.1	105.4 \pm 33.9	118.6 \pm 36.2	117.6 \pm 37.2	F = 1.1/p = 0.32
Tunica propria	53.5 \pm 9.5	57.0 \pm 12.7	58.2 \pm 15.0	59.9 \pm 13.7	F = 0.3/p = 0.82
Leydig cells	20.2 \pm 2.8	29.7 \pm 8.9	27.6 \pm 8.6	28.0 \pm 13.5	F = 0.8/p = 0.49
Connective tissue cells	5.6 \pm 2.2	4.8 \pm 3.0	4.6 \pm 3.4	7.6 \pm 7.5	F = 1.0/p = 0.36
Blood vessels	10.9 \pm 4.3	15.4 \pm 3.4	12.3 \pm 3.6	12.2 \pm 9.9	F = 0.9/p = 0.42
Lymphatic space	103.7 \pm 19.4	111.9 \pm 19.0	124.8 \pm 22.1	130.6 \pm 53.6	F = 1.1/p = 0.33
Intertubular space	142.5 \pm 25.0	158.7 \pm 26.8	169.5 \pm 24.5	178.6 \pm 64.6	F = 1.1/p = 0.34

**Figure 3.** Standard deviation comparisons of biometric and histomorphometric parameters in control animals (100%) and exposed to EMF from 13th day of gestation to 90 postnatal days. Due to different units and scales, values of standard deviations were transformed into percentage (%).

(Table 5). Computational histomorphometry also confirmed different patterns of response to EMF exposure.

Plasma Testosterone

Results obtained for plasma testosterone showed no significant difference between animals exposed to EMF and control or negative control animals (Table 6).

DISCUSSION

Testicular Qualitative Analysis

We previously showed that exposure to 60 Hz and 1 mT EMF from gestation to postnatal day 21 induces a delay in the testicular development when the rats were analyzed at 21 postnatal days (Tenorio *et al.*, 2010). We observed in the present study that rats exposed to the same protocol and analyzed at 90 postnatal days showed testicular degeneration. In the pre-pubertal rats (21 postnatal days), spermatogenesis was not

complete because of its hormonal control not being defined and incomplete formation of the blood–testis barrier, preventing progression of the germ cells beyond the stage of primary spermatocyte (França *et al.*, 2005). Therefore the degenerative process induced by EMF seems to be related to the testicle's defined hormonal control and complete cellular associations observed in adult animals.

According to Turner (2007), testicular degeneration can be defined as a process of structure deterioration of the testis and loss of their normal function. Testicular degeneration may be induced by heat, testicular trauma, exposure to cold, toxins, ischemia, nutritional deficiencies, exogenous administration of androgens, infections, autoimmune diseases, obstruction of sperm flow, cancer and ionizing radiation.

According to Ramadan *et al.* (2002), mice exposed to magnetic fields of 50 Hz and 20 mT showed decreased sperm count, motility and daily sperm production, as well as changes in testicular histopathological analysis. Aydin *et al.* (2007) irradiated rats continuously for 1, 2 and 3 months, using EMF of 50 Hz and

Electromagnetic field induces testicular degeneration

Table 4. Area and perimeter of the seminiferous tubules in testes of rats at 90 postnatal days exposed to electromagnetic fields (60 Hz and 1 mT, 3 daily treatments of 30 min) from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90, control and negative control animals

	Negative control	Control	Exposed to EMF up to 21 postnatal days	Exposed to EMF up to 90 postnatal days	F/p
Area (μm^2)	$10.9 \times 10^4 \pm 6.3 \times 10^3$	$12.0 \times 10^4 \pm 15.3 \times 10^3$	$11.4 \times 10^4 \pm 12.6 \times 10^3$	$10.3 \times 10^4 \pm 16.5 \times 10^3$	$F = 1.7/p = 0.18$
Perimeter (μm)	1406.3 ± 293.1	1483.7 ± 161.8	1543.8 ± 54.4	1396.4 ± 99.1	$F = 2.9/p = 0.06$

Table 5. Area and perimeter of the seminiferous tubules in testes of control group, negative control group and rats exposed to electromagnetic fields of 60 Hz and 1 mT from day 13 of gestation to postnatal day 21 or 90 that showed testicular degeneration or did not show testicular degeneration

	Negative control	Control	Nondegenerated	Degenerated	F/p
Area (μm^2)	$10.9 \times 10^4 \pm 6.3 \times 10^3$ ^a	$12.0 \times 10^4 \pm 15.3 \times 10^3$ ^a	$11.1 \times 10^4 \pm 13.5 \times 10^3$ ^a	$7.2 \times 10^4 \pm 16.0 \times 10^3$ ^b	$F = 13.2/p < 0.00^*$
Perimeter (μm)	1406.3 ± 293.1 ^a	1483.7 ± 161.8 ^a	1512.1 ± 134.81 ^a	1064.8 ± 107.5 ^b	$F = 15.1/p < 0.00^*$

*Statistically significant. Different letters in same line are equivalent to statistically significant difference.

Table 6. Plasma testosterone analysis of rats at 90 postnatal days exposed to Electromagnetic Fields (60 Hz and 1 mT, 3 daily treatments of 30 min) from day 13 of gestation to 21 or 90 postnatal days, controls and negative control animals

	Negative control	Control	Exposed to EMF up to 21 postnatal days	Exposed to EMF up to 90 postnatal days	KW/p
Testosterone (nmol l^{-1})	6.0 ± 3.4	10.5 ± 3.4	10.3 ± 5.1	9.4 ± 6.4	$KW = 3.3/p = 0.34$
Testosterone (ng ml^{-1})	1.7 ± 0.9	3.0 ± 1.0	2.9 ± 1.4	2.7 ± 1.8	$KW = 3.3/p = 0.34$
Testosterone (CV%)	2.5 ± 3.5	2.2 ± 2.0	4.6 ± 2.3	1.8 ± 1.1	$KW = 1.6/p = 0.20$

48.21 mG, and observed a deceleration of spermatogenesis and degeneration of germ cell order in relation to exposure time.

Male and female rats exposed to 50 Hz and 25 μT magnetic fields for 90 days showed reduced fertility (Al-Akhras *et al.*, 2001). De Vita *et al.* (1995) observed that exposure to 50 Hz and 1.7 mT magnetic fields reduced the amount of elongated spermatids after 28 days of exposure. In humans, a population-based study evaluated daily exposure to relatively long-duration (>2.4 h per day) power frequency magnetic fields (≥ 1.6 mG) and showed an increased risk of poor sperm quality, as well as decreased sperm density, vitality, morphology and motility (Li *et al.*, 2010). The present study is in agreement with these authors and also observed that EMF can disturb spermatogenesis.

Electric and magnetic fields may cause toxic effects in various cell types (Ivarcsits *et al.*, 2005), including germ cells (De Vita *et al.*, 1995). Usually spermatogonia differentiate irreversibly; the only option for germ cells that will not become sperm is degeneration (Russel *et al.*, 1990). Lee *et al.* (2004) and Kim *et al.* (2009) observed an increased incidence of apoptosis in germ cells of animals exposed to electric and magnetic fields. The present study also observed germ cells with morphological changes similar to apoptosis in animals exposed to EMF. Thus cell destruction seems to act as a regulatory mechanism to prevent abnormal germ cells becoming mature and leading to defective sperm.

The present study observed that testicular degeneration was more intense in animals exposed to EMF up to 90 postnatal days compared with the group exposed up to 21 postnatal days and analyzed at 90 days old. This may occur due to a partial recovery of spermatogenesis. According to Luo *et al.* (2006), the DNA damage induced by EMF could be at least partly repaired by natural activation of DNA repair mechanism. However, our results provide evidence that EMF can cause irreversible changes in testis. This can be demonstrated through the testicular degeneration observed in adult animals (90 postnatal days) exposed to EMF up to 21 postnatal days. Testicular degeneration was observed even after one cycle of seminiferous epithelium, which in rats is at approximately 58 days (França *et al.*, 2005).

Testicular degeneration was also observed through transmission electron microscopy. The main pathological lesion was mitochondria with high electron density, loss of cristae and abnormal morphology. This type of pathological lesion was previously reported in some cell types. According to Lahijani *et al.* (2009), hepatocytes of chicken embryos exposed to EMF of 50 Hz (1.33, 2.66, 5.52 and 7.32 mT) showed extremely electron dense mitochondria and degenerate cristae. Several mitochondria were found without cristae and their matrix appeared electron-opaque in myoid cells of rats exposed to 50 Hz and 8 mT EMF during intrauterine development (3 weeks) and postnatal life (5 weeks;

Khaki *et al.*, 2006). We found no previous reports of high electron dense mitochondria with loss of cristae in germ cells due to the action of low-frequency EMF.

Li *et al.* (2010) observed decreased sperm vitality and motility in human populations exposed to power frequency magnetic fields (≥ 1.6 mG). Ramadan *et al.* (2002) also observed a reduction on sperm motility in mice exposed to 50 Hz and 20 mT magnetic field. Sperm motility and vitality are directly related to mitochondrial function. Therefore, pathological lesions in mitochondria observed in the present study can help to justify the reduced sperm motility and vitality observed by Li *et al.* (2010) and Ramadan *et al.* (2002).

EMF changed the migration of mitochondria because animals exposed to EMF showed mitochondria near to the acrosome. These mitochondria should be in mitochondrial annulus in the tail of elongating spermatids.

Testicular Histomorphometrical Analysis

It is noteworthy that animals showing testicular degeneration were not used for histomorphometry. According to França *et al.* (2005), daily sperm production in rats is approximately 17–24 million. Control, negative control and animals exposed to EMF that did not show testicular degeneration were in agreement with species standards.

Only the seminiferous tubules diameter showed significant reduction in animals exposed to EMF up to 90 postnatal days. This may have occurred due to an increase in the apoptosis rate in seminiferous epithelium. Electric and magnetic fields can influence the mechanism of apoptosis (Lai and Singh, 2004), and also lead to increased apoptosis rate of germ cells (Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2004).

Most spermatogenesis parameters showed a high standard deviation in the same group exposed to EMF. The high standard deviation can reflect different individual responses to the same experimental conditions. We did not find previous reports of individual sensitivity to the action of low-frequency EMF.

Computer-assisted Histomorphometry

The present study observed that EMF can interact with the testis of susceptible animals (which showed testicular degeneration) and caused the reduction of tubular area and perimeter. According to França and Russel (1998), the reduced seminiferous tubule area can be considered indicative of changes in spermatogenesis.

Plasma Testosterone Analysis

Statistically changes were not observed in circulating concentrations of testosterone in any experimental groups. These results agree with an absence of any change in the volume of Leydig cells. Electron microscopy showed pathological lesions in some Leydig cells exposed to EMF, but these changes occurred in fewer cells and did not change plasma testosterone concentrations.

There has been contradictory information related to the effects of EMF exposure on circulating testosterone concentrations. Kato *et al.* (1994) and McGivern *et al.* (1990) did not observe a difference in testosterone concentrations of animals exposed to 50 Hz magnetic field of 1, 5 or 50 μ T and 15 Hz EMF of 8 G respectively. However, Al-Akhras *et al.* (2006) observed a reduction in testosterone concentrations after 6 and 12 weeks of exposure to 50 Hz and 25 mT magnetic fields. Forgács *et al.* (1998) also

observed that magnetic fields of 50 Hz and 100 μ T are able to stimulate the basal testosterone production of primary mouse Leydig cell culture.

Factors that can Modulate the EMF Effects on Testicular Components

Saito *et al.* (2006) reported that, if exposure to magnetic fields was not fixed in a direction, the teratogenic potential would disappear or not emerge. In the present study we used exposure to EMF in fixed direction, transversely to the animals.

Currently, the results reported in the literature are still controversial. The differences observed in the studies regarding EMF effects can be related to the variation in frequency and intensity of the electric and magnetic fields; species and strain of the animals; variation in exposure time; direction of radiation incidence; and, as we observed in the present study, individual sensitivity.

There have been no previous descriptions of individual sensitivity due to low-frequency EMF exposure (non-ionizing radiation). However, some individuals have an increased sensitivity to ionizing radiation. It is well known that patients can vary in their normal tissue response to radiotherapy using ionizing radiation (Howe *et al.*, 2009). The wide variety of responses in both tumor and normal tissues following radiotherapy are mainly related to differences in radiosensitivity (Tang *et al.*, 2008). According to Knox *et al.* (1981), genetic and environmental factors may predispose certain humans to radiation-induced malignancies.

The fact that low-frequency EMF can affect spermatogenesis in individual sensitivity pattern may help to justify the wide controversy observed in the literature. Further studies should be conducted to elucidate the factors involved in individual sensitivity due to EMF exposure. Taking into account that EMF can disturb spermatogenesis, the present study recommends additional research and a review of the preventive policies for public health.

CONCLUSION

Electromagnetic fields of 60 Hz and 1 mT induced testicular degeneration. Histomorphometrical and histopathological analysis indicated an individual sensitivity to EMF. The main alterations observed through electron microscopy were mitochondria with high electron density and loss of cristae. Plasma testosterone concentrations were not affected by EMF. Exposure to EMF of 60 Hz and 1 mT may lead to subfertility and infertility.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Al-Akhras MA, Elbetieha A, Hasan MK, Al-Omari I, Darman H, Albiss B. 2001. Effects of extremely low frequency magnetic field on fertility of adult male and female rats. *Bioelectromagnetics* **22**: 340–344.
- Al-Akhras MA, Darmani H, Elbetieha A. 2006. Influence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats. *Bioelectromagnetics* **27**: 127–131.
- Aydin M, Turk G, Yuksel M, Cevik A, Apaydin AM, Yilmaz S. 2007. Effect of electromagnetic field on the sperm characteristics and histopathological status of testis in rats. *Med. Wet.* **63**: 178–183.

Electromagnetic field induces testicular degeneration

- Boorman GA, McCormick DL, Findlay JC, Hailey JR, Gauger JR, Johnson TR, Kovatch RM, Sils RC, Haseman JK. 1999. Chronic toxicity/oncogenicity evaluation of 60 Hz (Power Frequency) magnetic fields in F344/N rats. *Toxicol. Pathol.* **27**: 267–278.
- Brown J, Walker SE, Steinmain K. 2004. *Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species*. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal: Virginia-EUA.
- Chung MK, Lee SJ, Kim YB, Park SC, Shin DH, Kim SH, Kim JC. 2005. Evaluation of spermatogenesis and fertility in F1 male rats after *in utero* and neonatal exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Asian J. Androl.* **7**: 189–194.
- De Vita R, Cavallo D, Raganella L, Eleuteri P, Grollino MG, Calugi A. 1995. Effects of 50 Hz magnetic field on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometric analysis. *Bioelectromagnetics* **16**: 330–334.
- Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM, Steegers-Theunissen RPM. 2007. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum. Reprod. Update* **13**: 163–174.
- Forgács Z, Thuróczy G, Paksy K, Szabó. 1998. Effect of sinusoidal 50 Hz magnetic field on the testosterone production of mouse primary Leydig cell culture. *Bioelectromagnetics* **19**: 429–431.
- França RL, Russel LD. 1998. The testis of domestic animals. In *Male Reproduction: a Multidisciplinary Overview*, Russel LD (ed.). Churchill Communications Europe España: Madrid; 197–219.
- França LR, Avelar GF, Almeida FFL. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63**: 300–318.
- Heredia-Rojas JA, Caballero-Hernandez DE, La Fuente AOR, Ramos-Alfano G, Rodríguez-Flores LE. 2004. 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* **25**: 63–68.
- Howe O, O'Sullivan J, Nolan B, Vaughan J, Gorman S, Clarke C, McCleand B, Lyng FM. 2009. Do radiation-induced bystander effects correlate to the intrinsic radiosensitivity of individuals and have clinical significance? *Radiat. Res.* **171**: 521–529.
- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Jahn O, Rüdiger HW. 2005. Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat. Res.* **583**: 184–188.
- Kato M, Honma K, Shigemitsu T, Shiga Y. 1994. Circularly polarized, sinusoidal, 50 Hz magnetic field exposure does not influence plasma testosterone levels of rats. *Bioelectromagnetics* **15**: 513–518.
- Khaki AA, Tubbs RS, Shoja MM, Rad JS, Khaki A, Farahani RM, Zarrintan S, Nag TC. 2006. The effects of an electromagnetic field on the boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat: A light and transmission electron microscope study. *Folia Morphol.* **65**: 188–194.
- Kim Y-W, Kim HS, Lee JS, Kim YJ, Lee S-K, Seo J-N, Jung K-C, Kim N, Gimm Y-M. 2009. Effects of 60 Hz 14 mT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics* **30**: 66–72.
- Knox SJ, Wilson FD, Greenberg BR, Shifrine M, Rosenblatt LS, Reeves JD, Misra H. 1981. Increased radiosensitivity of a subpopulation of T-lymphocyte progenitors from patients with Fanconi's anemia. *Blood* **57**: 1043–1048.
- Kumar S. 2004. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J. Occup. Health* **46**: 1–19.
- Lahijani MS, Tehrani DM, Sabouri E. 2009. Histopathological and ultrastructural studies on the effects of electromagnetic fields on the liver of preincubated white leghorn chicken embryo. *Electromagnet. Biol. Med.* **28**: 391–413.
- Lai H, Singh NP. 2004. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ. Health Persp.* **112**: 687–694.
- Lee JS, Ahn SS, Jung KC, Kim YW, Lee SK. 2004. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian J. Androl.* **6**: 29–34.
- Li D-K, Yan B, Li Z, Gao E, Miao M, Gong D, Weng XP, Ferber JR, Yuan W. 2010. Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality. *Reprod. Toxicol.* **29**: 86–92.
- Luo Q, Yang J, Zeng QL, Zhu XM, Qian YL, Huang HF. 2006. 50-Hertz electromagnetic fields induce Gammah2ax foci formation in mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.* **75**: 673–680.
- McGivern RF, Sokol RZ, Adey WR. 1990. Prenatal exposure to a low frequency electromagnetic field demasculinizes adult scent marking behavior and increases accessory sex organweights in rats. *Teratology* **41**: 1–8.
- Ramadan LA, Abd-Allah ARA, Aly HAA, Saad-El-Din AA. 2002. Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme q10 and l-carnitine in mice. *Pharmacol. Res.* **46**: 363–370.
- Robert R. 2003. Bobina De Helmholtz. *Rev. Bras. Ens. Fis.* **25**: 40–44.
- Russel LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. 1990. Mammalian spermatogenesis. In *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Russel LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (eds). Cache River Press: Bolesta; 1–40.
- Ryan BM, Symanski RR, Pomeranz LE, Johnson TR, Gauger JR, McCormick DL. 1999. Multigeneration reproductive toxicity assessment of 60 Hz magnetic fields using a continuous breeding protocol in rats. *Teratology* **59**: 156–162.
- Saito K, Suzuki H, Suzuki K. 2006. Teratogenic effects of static magnetic field on mouse fetuses. *Reprod. Toxicol.* **22**: 118–124.
- Silva Junior VA, Vieira ACS, Pinto CF, De Paula TAR, Palma MB, Amorin MJAAL, Amorin Jr AA, Manhães-De-Castro R. 2006. Neonatal treatment with naloxone increases the population of sertoli cells and sperm production in adult rats. *Reprod. Nutr. Dev.* **46**: 157–166.
- Sliney DH, Patterson RM. 2010. *Guidelines for Exposure to Sub-radiofrequency Electric and Magnetic Fields*; http://www.irpa.net/irpa8/cdrom/vol.1/m1_228.pdf [23.02.2010] 925–928.
- Tang Y, Zhang Y, Guo L, Peng Y, Luo Q, Xing Y. 2008. Relationship between individual radiosensitivity and radiation encephalopathy of nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* **184**: 510–514.
- Tablado L, Soler C, Núñez M, Núñez J, Pérez-Sánchez F. 2000. Development of mouse testis and epididymis following intrauterine exposure to a static magnetic field. *Bioelectromagnetics* **21**: 19–24.
- Tenorio BM, Jimenez GC, Moraes RN, Torres SM, Nogueira RA, Silva Junior VA. 2010. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. *J. Appl. Toxicol.*; doi: 10.1002/jat.1584.
- Turner RMO. 2007. Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. *Clin. Tech. Equine Pract.* **6**: 278–284.
- Winker R, Rüdiger HW. 2006. Reproductive toxicology in occupational settings: an update. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **79**: 1–10.

5.3. Capítulo 3:

Efeito do choque térmico e da inibição da Hsp90 nas correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e potássio BK_{Ca} em células de Leydig

Resumo

A testosterona é um hormônio esteróide fundamental para manutenção e recuperação da espermatogênese após danos testiculares. As células de Leydig produzem testosterona em resposta ao estímulo do LH, desencadeando processos de sinalização celular envolvendo entrada de Ca^{2+} e saída de K^+ através de canais na membrana plasmática. Entretanto, os mecanismos de sinalização nas células de Leydig envolvendo os canais iônicos durante o estresse celular ainda precisam ser esclarecidos. Devido a importância dos canais de Ca^{2+} e K^+ na esteroidogênese e sua possível relação com a sinalização durante o estresse celular; o presente trabalho objetivou analisar os efeitos do estresse térmico (43°C / 15 min.) e da inibição da Hsp90 nos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}) em células de Leydig frescas. Os resultados obtidos revelaram que nos canais BK_{Ca} o estresse térmico reduziu a corrente do estado estacionário em 49,8%, a condutância máxima em 68,9% e a constante de tempo da ativação em 31,9%. O estresse térmico tornou mais lenta a ativação dos canais BK_{Ca} e reduziu sua dependência de voltagem. A inibição da Hsp90 não alterou a corrente dos canais BK_{Ca} . A corrente dos canais Ca_v3 tipo-T não foi afetada pela temperatura elevada ou pela inibição da Hsp90. As análises de microscopia confocal demonstraram que a administração do inibidor da Hsp90 não alterou o transiente do cálcio intracelular. Em conclusão, o choque térmico pode inibir os canais BK_{Ca} , o que pode ser um dos mecanismos de sinalização relacionados ao estresse celular nas células de Leydig. A Hsp90 parece não estar envolvida neste processo.

Palavras-chave: Canais de cálcio e canais de potássio, choque térmico, Hsp90, 17-DMAP-Geldanamicina, células de Leydig, cálcio intracelular.

Introdução

Aproximadamente 8% dos homens apresentam problemas de infertilidade, destes 10% possuem causas reversíveis afetando seu potencial fértil (Esteves et al., 2011). O calor é um dos agentes que pode desencadear reversivelmente a degeneração testicular, caracterizada pela deterioração da estrutura do testículo com perda da sua função normal (Turner, 2007). Todos os tecidos são susceptíveis a danos pelo calor. Contudo, os testículos são especialmente sensíveis e são danificados pela exposição a temperaturas normalmente encontradas dentro do abdômen, pois o seu funcionamento normal ocorre 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal (Jensen et al., 2006; Sakallioğlu et al., 2007). Apesar das células germinativas apresentarem grande sensibilidade a danos causados pela temperatura elevada, as células de Leydig são mais resistentes ao calor e sua capacidade esteroidogênica parece não ser diretamente afetada pelo estresse térmico (Setchell, 2006).

A espermatogênese é regulada por uma complexa e interligada rede de interações endócrina, parácrina e autócrina (Roser, 2008). Dentre os principais fatores reguladores da espermatogênese está a testosterona, que em indivíduos adultos é fundamental para a regulação do comportamento sexual, manutenção funcional da espermatogênese, epidídimo e das glândulas sexuais acessórias (Holdcraft e Braun, 2004; Verhoeven et al., 2007). As células de Leydig produzem testosterona em resposta ao acoplamento do hormônio luteinizante (LH) ao receptor 7-transmembrana proteína-G, resultando no aumento do cAMP (Svechnikov et al., 2010) e do Ca^{2+} intracelular (Costa e Varanda, 2007). O aumento do Ca^{2+} intracelular ocorre devido à entrada dos íons através de canais Ca_v3 tipo-T localizados na membrana plasmática (Costa et al., 2010). Em resposta a entrada de Ca^{2+} na célula de Leydig, ocorre um feedback negativo através da repolarização da membrana devido ao efluxo de K^+ através de canais BK_{Ca} (Carnio e Varanda, 1995).

A exposição a agentes tóxicos pode alterar a homeostase celular, o que é comumente denominado estresse celular. Diversos fatores estão envolvidos na resposta das células durante e após a exposição a condições adversas que levem ao estado de estresse (Herr e Debatin, 2001). Apesar da importância fisiopatológica deste processo, os mecanismos de sinalização nas células de Leydig relacionados ao estresse celular ainda precisam ser esclarecidos.

As respostas celulares devido ao estresse térmico podem alterar as correntes iônicas (Wu et al., 2001; Chen et al., 2010). Diversos fatores estão associados ao estresse celular, inclusive as proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90). A Hsp90 é uma chaperona molecular associada com funções na célula normal (Zuehlke e Johnson, 2010) e após o estresse celular (Murphy et al., 2001). Estudos vêm demonstrando que as Hsp's interagem com canais iônicos de diversos tipos celulares, tais como os canais de K^+ ATP das células β pancreáticas (Yan et al., 2010), canais de cloreto (ClC-2) (Hinzpeter et al., 2006) e canais de potássio hERG (Walker et al., 2010) em células HEK-293.

Visando esclarecer se os canais iônicos estão envolvidos na resposta das células de Leydig ao estresse celular e se a Hsp90 pode modular este processo; o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do choque térmico e da inibição da Hsp90 na atividade dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T e nos canais de potássio BK_{Ca} em células de Leydig frescas.

Materiais e Métodos

As células de Leydig frescas foram obtidas de camundongos machos (*Mus musculus*) com 45 a 60 dias de vida de acordo com a metodologia descrita por Costa e Varanda (2007). Após a eutanásia através de deslocamento cervical, os testículos dos animais foram removidos, a túnica albugínea retirada e o parênquima testicular foi mecanicamente dissociado através da infusão de solução de Hanks no espaço intersticial (mM: 140 NaCl, 4.6 KCl, 1.6 $CaCl_2$, 1.13 $MgCl_2$, 10 D-glicose, 5 $NaHCO_3$, 10 HEPES; pH ajustado para 7.4 com KOH e osmolaridade de 290-310 mosmol (kg H_2O)⁻¹). As células foram coletadas para a formação dos seguintes grupos experimentais:

- Células de Leydig não expostas ao choque térmico (Controle 1).
- Células de Leydig não expostas ao choque térmico pré-tratadas com o inibidor da Hsp90 durante 2 horas.
- Células de Leydig não expostas ao choque térmico nas quais foram obtidos registros controles e depois tratadas com o inibidor da Hsp90. Estas células são controles delas mesmas.
- Células de Leydig submetidas ao choque térmico a 43°C durante 15 minutos (Chen et al., 2010) (Controle 2). Estas células foram deixadas em temperatura ambiente (23±2 °C) durante

2 horas para que a temperatura volte a ambiental e os fatores de estresse celular sejam expressos.

- Células de Leydig expostas ao inibidor da Hsp90 e submetidas ao choque térmico. Estas células também foram deixadas durante 2 horas em temperatura ambiente.
- Células de Leydig submetidas ao choque térmico deixadas durante 2 horas em temperatura ambiente. Foram obtidos registros controles e registros depois do tratamento com o inibidor da Hsp90. Estas células são controles delas mesmas.

A 17-Dimethylaminopropylamino-17-demethoxy-geldanamicina (17-DMAP-GA / Invivogen - USA) foi utilizada para a inibição da Hsp90 (Tian et al., 2004). A concentração da 17-DMAP-GA foi 10 μ M (Hinzpeter et al., 2006), considerada uma concentração alta para células isoladas.

Eletrofisiologia

Os experimentos foram realizados usando a técnica de patch clamp na configuração whole cell. O microscópio de contraste de fase (Nikon ELWD 0.3 - Japan) foi utilizado para visualização das células de Leydig e aproximação da pipeta na membrana plasmática. As correntes iônicas foram obtidas usando pipetas de vidro borossilicado (resistência de 2 a 4 M Ω - Sutter Instrument - USA), headstage (V203BU, Axon - USA), Axopatch 200B (Axon - USA) e placa de aquisição (Instrutec, NY - USA) . As correntes foram filtradas a 5 KHz e registradas no software (WINWCP v.4.3.3, Strathclyde Software).

Correntes de cálcio dos canais Ca_v3 tipo-T

A metodologia utilizada para análise das correntes nos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T seguiu as recomendações de Costa e Varanda (2007). As correntes foram obtidas aplicando-se pulsos de voltagem entre -80mV e +40mV com duração de 200ms e intervalos de 3 segundos entre os pulsos, mantidos num “holding” de -40mV. A solução que banhava externamente as células continha (mM): 126 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 sódio lactato, 10 HEPES; pH ajustado para 7,3 com CsOH e osmolaridade de 290-300 mosmol (kg H₂O)⁻¹. A solução de

pipeta que entra em contato com o meio intracelular continha (mM): 130 CsCl, 0.8 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 2 ATP-Mg²⁺. A concentração de Ca⁺² livre foi de 1.02x10⁻⁷ M. O pH foi ajustado para 7,2 com CsOH, osmolaridade de 280-290 mosmol (kg H₂O)⁻¹.

Os picos das correntes normalizadas pela capacitância da membrana versus voltagens (curva I-V) foram ajustados pela função de Boltzmann:

$$i = G_{\min} + \frac{(G_{\min} - G_{\max})}{(1 + \exp(V - V_0)) / K} (V - Er) ,$$

onde: i = pico da corrente para cada voltagem; G_{min} = condutância mínima; G_{max} = condutância máxima; V = voltagem; V₀ = voltagem para a qual a metade dos canais estão abertos ; K = fator da dependência de voltagem do sistema; Er = potencial de reversão.

As constantes de tempo da ativação (τ_{ativação}) e inativação (τ_{inativação}) das correntes de Ca²⁺ foram obtidas utilizando pulsos de -20mV em holding de -40mV através do ajuste da função:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C ,$$

onde Ai , C são os coeficientes e τ_i a constante de tempo das funções exponenciais que descrevem a cinética do canal.

Correntes dos canais de potássio ativados por cálcio

As correntes através dos canais de potássio ativados por cálcio foram obtidas usando pulsos de voltagem de -80mV até +80mV com duração de 200ms intervalos de 3 segundos entre os pulsos, utilizando um *holding* de -40mV (300ms). A solução de banho continha (mM): 140 NaCl, 4.6 KCl, 1.6 CaCl₂, 1.13 MgCl₂, 10 D-glicose, 5 NaHCO₃, 10 HEPES; pH ajustado para 7,4 com KOH e osmolaridade de 290-310 mosmol (kg H₂O)⁻¹. A solução de pipeta continha (mM): 150 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES, 3 CaCl₂. A concentração de Ca⁺² livre foi 1x10⁻⁶ M . O pH foi ajustado para 7,4 com KOH, osmolaridade de 290-310 mosmol (kg H₂O)⁻¹.

As curvas I-V do estado estacionário da corrente de potássio dos canais BK_{Ca} também foram ajustados por uma função de Boltzmann:

$$i = G_{\max} + \frac{(G_{\min} - G_{\max})}{(1 + \exp(V - V_0))} / K (V - Er),$$

onde: i = corrente no estado estacionário para cada pulso de voltagem; G_{\min} = condutância mínima; G_{\max} = condutância máxima; V = voltagem; V_0 = voltagem para qual a metade dos canais estão abertos; K = fator da dependência de voltagem do sistema; Er = potencial de reversão.

A constante de tempo da ativação ($\tau_{\text{ativação}}$) da corrente de K^+ foi obtida utilizando pulso de +80mV em holding de -40mV através da mesma função descrita para os canais de Ca^{2+} .

Transiente do cálcio intracelular

Células de Leydig aderidas em lamínulas cobertas com poly L-lisina foram carregadas com o indicador Fluo-3 AM 5 μM (Invitrogen – USA) durante 30 a 45 minutos em solução de Hanks. A análise do transiente do Ca^{2+} intracelular foi realizada através da detecção de fluorescência utilizando um microscópio confocal (SP5 Leica, Bensheim, Germany) de acordo com a metodologia descrita em Costa et al. (2010). A fluorescência foi normalizada (ΔF) usando a função:

$$\Delta F = \frac{(F - F_{\min})}{F_{\min}},$$

onde: F = Fluorescência obtida; F_{\min} = Fluorescência mínima.

Imagens controle foram obtidas durante 70-80 segundos e depois o inibidor da Hsp90 foi aplicado durante 100-120 segundos. Foram analisadas 47 células de Leydig em dois experimentos independentes.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn foi utilizado para analisar diferentes

células nos grupos pré-tratados por 2 horas com o choque térmico ou o inibidor da Hsp90. Para as células que foram controles delas mesmas foi utilizado o teste não paramétrico pareado de Wilcoxon. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0.05$.

Resultados

Correntes de cálcio dos canais Ca_v3 tipo-T

Os resultados obtidos demonstraram que a dependência de voltagem e o pico da corrente dos canais de cálcio não foram alterados devido a exposição ao choque térmico (Figuras 1A, 1C e 1D). A aplicação imediata do inibidor da Hsp90 (Figura 1B) e a inibição da Hsp90 durante 2 horas não alteraram as correntes dos canais de cálcio tanto nas células expostas ao choque térmico (Figura 1F) quanto nas células normais (Figura 1E).

Os parâmetros da cinética dos canais Ca_v3 tipo-T obtidos pelo ajuste da função de Boltzmann não se alteraram em função dos tratamentos experimentais (Tabelas 1 e 2). As constantes de tempo da ativação e inativação dos canais de Ca^{2+} também não foram afetadas pelo estresse térmico ou inibição da Hsp90.

Na Figura 2 pode-se observar que a aplicação do inibidor da Hsp90 não alterou a corrente dos canais Ca_v3 tipo-T obtidas em resposta a pulsos de voltagem de -20 mV.

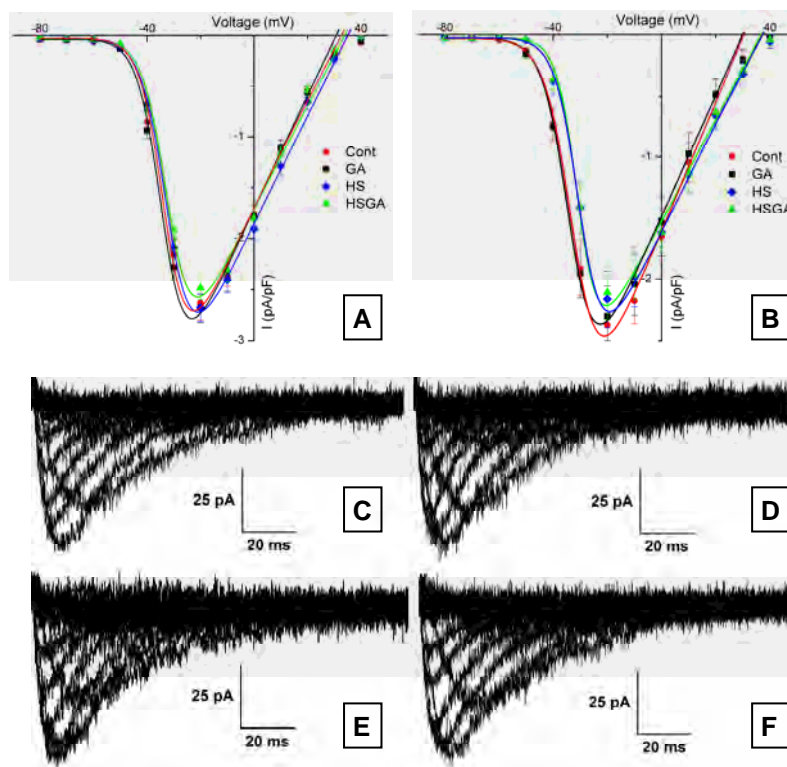


Figura 1. Correntes dos canais de cálcio Ca_v3 tipo-T de células de Leydig obtidas usando pulsos de voltagem de -80mV a +40mV. 1A: Relação I-V nas células controle ou expostas ao choque térmico (HS) e/ou a geldanamicina (inibidor da Hsp90) durante 2 horas ($n_{Cont} = 22$, $n_{GA} = 23$, $n_{HS} = 20$, $n_{HSGA} = 19$). 1B: Relação I-V dos canais Ca_v3 tipo-T nas células de Leydig tratadas com a geldanamicina logo após o registro controle ($n_{Cont} = 10$, $n_{GA} = 10$, $n_{HS} = 10$, $n_{HSGA} = 10$). 1C: Registro controle de correntes geradas por canais Ca_v3 tipo-T. 1D: Correntes de canais Ca_v3 tipo-T 2 horas após o estresse térmico. 1E: Correntes de canais Ca_v3 tipo-T em células não expostas ao choque térmico e tratadas com a geldanamicina durante 2 horas. 1F: Correntes de canais Ca_v3 tipo-T 2 horas após o choque térmico e a exposição a geldanamicina. Cont: Controle, GA: Exposto a geldanamina, HS: Exposto ao choque térmico, HSGA: Exposto ao choque térmico e a geldanamicina.

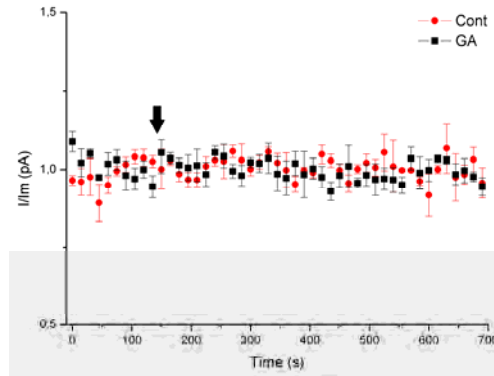


Figura 2. Corrente dos canais Ca_v3 tipo-T de células de Leydig em resposta a pulsos de voltagem de -20mV em holding de -40mV . Os valores foram normalizados pela corrente média. Aplicação da geldanamicina (inibidor da Hsp90) na seta. (Cont: Controle, $n = 5$; GA: Exposto a geldanamicina, $n = 5$).

Tabela 1. Parâmetros da cinética da corrente dos canais Ca_v3 tipo-T em células de Leydig submetidas ou não ao estresse celular induzido pelo choque térmico e/ou ao pré-tratamento com $10\mu\text{M}$ de 17-DMAP-GA durante 2 horas (R^2 médio = 0.99).

	Não Expostas ao Choque Térmico		Expostas ao Choque Térmico		P
	Controle	GA $10\mu\text{M}$	Controle	GA $10\mu\text{M}$	
G_{\min} (nS/pF)	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.002	0.05 ± 0.002	0.06 ± 0.002	0.84
G_{\max} (nS/pF)	0.11 ± 0.006	0.11 ± 0.004	0.11 ± 0.004	0.11 ± 0.004	0.83
V_0 (mV)	-32.9 ± 0.5	-32.7 ± 0.4	-31.6 ± 0.4	-31.3 ± 0.3	0.06
K	5.0 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.5 ± 0.1	0.10
E_r (mV)	30.7 ± 1.0	28.9 ± 0.7	32.1 ± 1.1	29.7 ± 0.7	0.17
$\tau_{\text{ativação}}$ (ms)	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	0.06
$\tau_{\text{inativação}}$ (ms)	17.5 ± 0.9	16.9 ± 1.0	19.5 ± 1.2	17.2 ± 1.7	0.49

Tabela 2. Parâmetros da cinética das correntes dos canais Ca_v3 tipo-T em células de Leydig submetidas ou não ao choque térmico. O tratamento com $10\mu\text{M}$ de 17-DMAP-GA foi realizado logo após o registro controle. Estas células são controles delas mesmas, foi realizado o teste pareado de Wilcoxon (R^2 médio = 0.99).

	Não Expostas ao Choque Térmico			Expostas ao Choque Térmico		
	Controle	GA 10 μ M	P	Controle	GA 10 μ M	P
G_{min} (nS/pF)	0.05 \pm 0.004	0.05 \pm 0.004	0.72	0.04 \pm 0.004	0.04 \pm 0.002	0.13
G_{max} (nS/pF)	0.10 \pm 0.009	0.10 \pm 0.009	0.05	0.09 \pm 0.008	0.08 \pm 0.01	0.13
V₀ (mV)	-31.8 \pm 1.0	-33.1 \pm 0.8	0.05	-28.8 \pm 0.7	-29.1 \pm 0.8	0.42
K	5.4 \pm 0.2	4.9 \pm 0.1	0.25	5.2 \pm 0.2	4.9 \pm 0.1	0.16
Er (mV)	30.3 \pm 1.6	31.2 \pm 2.0	0.35	34.1 \pm 1.7	34.3 \pm 1.5	0.65
τ_{ativação} (ms)	3.3 \pm 0.3	3.0 \pm 0.4	0.12	4.8 \pm 0.3	4.6 \pm 0.2	0.97
τ_{inativação} (ms)	15.2 \pm 1.8	14.5 \pm 1.8	0.30	20.6 \pm 1.8	21.2 \pm 2.2	0.30

Correntes de potássio nos canais BK_{Ca}

As correntes nos canais BK_{Ca} reduziram 49,8% nas células de Leydig expostas ao choque térmico (Figura 3). Entretanto, as correntes nos canais BK_{Ca} não foram afetadas pelo pré-tratamento com o inibidor da Hsp90 durante 2 horas (Figuras 3A e 3E) ou sua aplicação nas células logo após o registro controle (Figura 3B). As células de Leydig submetidas ao choque térmico e a inibição da Hsp90 apresentaram um comportamento semelhante às células expostas apenas à temperatura elevada (Figura 3F), indicando que apenas o choque térmico alterou a cinética dos canais BK_{Ca}.

Os parâmetros obtidos pelo ajuste da função de Boltzmann para as correntes no estado estacionário dos canais BK_{Ca} mostraram que a condutância máxima reduziu 68,9% nas células expostas à temperatura elevada em relação às células controle (Tabela 3). O parâmetro V₀ foi 30% maior no grupo exposto à temperatura elevada (Tabela 3), indicando uma ativação mais lenta dos canais BK_{Ca} em resposta aos pulsos de voltagem. As células pré-tratadas com o inibidor da Hsp90 durante 2 horas ou expostas ao inibidor logo após o registro controle não mostraram alterações nos parâmetros analisados (Tabelas 3 e 4). A constante de tempo da ativação dos canais BK_{Ca} foi 31,9% maior nas células submetidas ao choque térmico, também indicando uma ativação mais lenta dos canais BK_{Ca}.

O tratamento das células de Leydig com o inibidor da Hsp90 não alterou a corrente nos canais BK_{Ca} em resposta a pulsos de voltagem de +80mV (Figura 4).

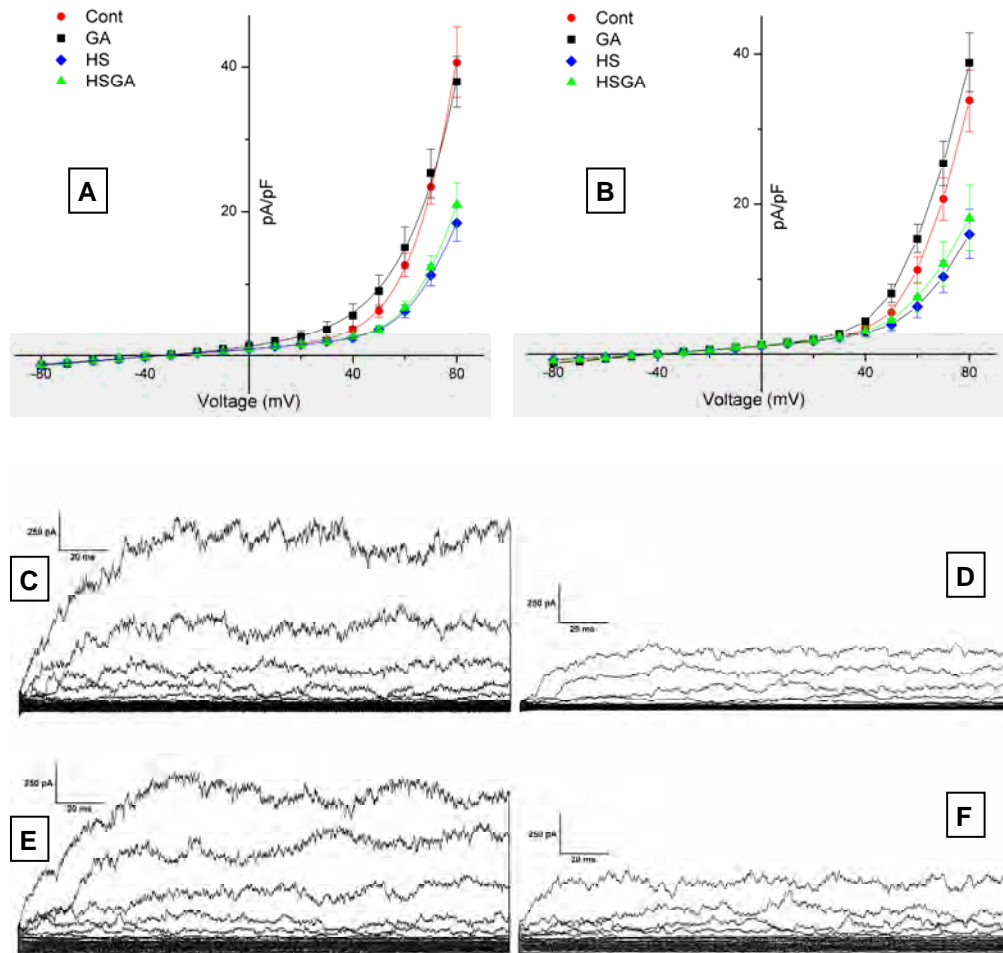


Figura 3. Correntes dos canais BK_{Ca} de células de Leydig obtidas usando pulsos de voltagem de -80mV a +80mV. 1A: Relação I-V nas células controle ou expostas ao choque térmico (HS) e/ou à geldanamicina (inibidor da Hsp90) durante 2 horas ($n_{Cont} = 10$, $n_{GA} = 10$, $n_{HS} = 10$, $n_{HSGA} = 10$). 1B: Relação I-V dos canais BK_{Ca} nas células tratadas com a geldanamicina logo após o registro controle ($n_{Cont} = 10$, $n_{GA} = 10$, $n_{HS} = 10$, $n_{HSGA} = 10$). 1C: Registro controle de correntes geradas por canais BK_{Ca} . 1D: Correntes de canais BK_{Ca} 2 horas após o choque térmico. 1E: Correntes de canais BK_{Ca} em células não estressadas e expostas a geldanamicina durante 2 horas. 1F: Correntes de canais BK_{Ca} 2 horas após o choque térmico e exposição à geldanamicina. Cont: Controle, GA: Exposto a geldanamina, HS: Exposto ao choque térmico, HSGA: Exposto ao choque térmico e a geldanamicina.

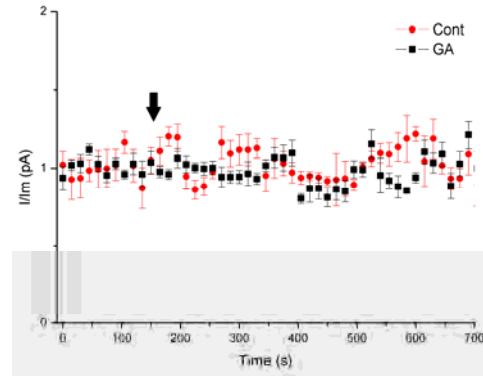


Figura 4. Corrente dos canais BK_{Ca} de células de Leydig em resposta a pulsos de voltagem de +80mV em holding de -40mV. Os valores foram normalizados pela corrente média. Aplicação da geldanamicina (inibidor da Hsp90) na seta. (Cont: Controle, n = 6; GA: Exposto a geldanamicina, n = 8).

Tabela 3. Parâmetros da cinética da corrente dos canais BK_{Ca} em células de Leydig submetidas ou não à temperatura elevada e/ou ao pré-tratamento com 10µM de 17-DMAP-GA durante 2 horas (R²médio = 0.99).

	Não Expostas ao Choque Térmico		Expostas ao Choque Térmico		p
	Controle	GA 10µM	Controle	GA 10µM	
G_{min} (nS/pF)	0.02 ± 0.007	0.03 ± 0.008	0.02 ± 0.011	0.02 ± 0.005	0.95
G_{max} (nS/pF)	1.0 ± 0.3 ^a	0.7 ± 0.2 ^a	0.2 ± 0.06 ^b	0.2 ± 0.07 ^b	0.004*
V₀ (mV)	81.5 ± 4.3 ^a	85.2 ± 16.5 ^a	120.5 ± 5.9 ^b	117.7 ± 3.0 ^b	0.000*
K	11.6 ± 1.2	12.2 ± 2.5	9.4 ± 1.2	9.6 ± 0.9	0.51
Er (mV)	-39.3 ± 0.8	-40.3 ± 1.1	-40.4 ± 0.4	-41.3 ± 0.9	0.78
τ_{ativação} (ms)	14.5 ± 1.3	14.9 ± 1.2	19.1 ± 1.5	20.6 ± 3.6	0.20

* Estatisticamente significativo.

Tabela 4. Parâmetros da cinética das correntes dos canais BK_{Ca} em células de Leydig submetidas ou não ao choque térmico. O tratamento com 10µM de 17-DMAP-GA foi realizado logo após o registro controle. Estas células são controles delas mesmas, foi realizado o teste pareado de Wilcoxon (R²médio = 0.99).

	Não Expostas ao Choque Térmico			Expostas ao Choque Térmico		
	Controle	GA 10 μ M	p	Controle	GA 10 μ M	p
G_{min} (nS/pA)	0.02 \pm 0.002	0.02 \pm 0.002	0.92	0.02 \pm 0.002	0.02 \pm 0.005	0.98
G_{max} (nS/pA)	0.7 \pm 0.07	0.7 \pm 0.1	0.92	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.08	0.35
V₀ (mV)	73.3 \pm 2.7	74.4 \pm 3.4	0.92	77.2 \pm 2.8	83.9 \pm 7.7	0.65
K	9.6 \pm 0.9	11.8 \pm 0.8	0.16	13.1 \pm 3.0	11.0 \pm 1.5	0.97
Er (mV)	-38.2 \pm 0.9	-37.4 \pm 0.9	0.76	-44.4 \pm 3.2	-40.7 \pm 1.5	0.42
τ_{ativação} (ms)	15.0 \pm 1.0	13.8 \pm 1.1	0.23	19.5 \pm 2.2	18.4 \pm 1.4	0.96

No presente estudo, as correntes de Ca²⁺ e K⁺ estão de acordo com as observadas anteriormente por Costa e Varanda (2007) e Desaphy et al. (1996), indicando que os procedimentos experimentais foram realizados com sucesso.

Transiente do cálcio intracelular

A exposição das células de Leydig ao inibidor da Hsp90 (17-DMAP-GA) não alterou o transiente do cálcio intracelular (Figura 5). Devido a limitações técnicas, não foi possível avaliar o transiente do cálcio intracelular nos animais expostos ao choque térmico.

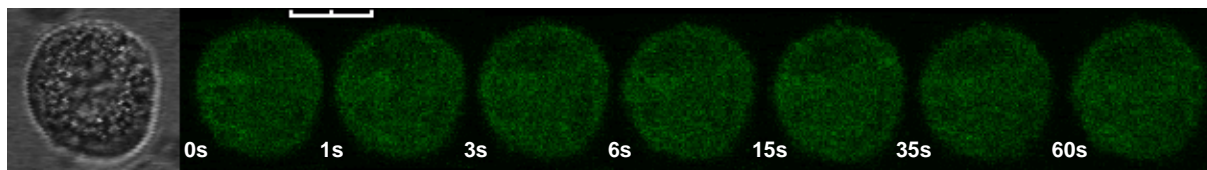


Figura 5. Transiente do cálcio intracelular em célula de Leydig antes e depois da aplicação de 10 μ M de 17-DMAP-geldanamicina (inibidor da Hsp90). Barra de escala: 10 μ m, s: segundos.

Discussão

A entrada e saída de íons na célula através de canais na membrana plasmática servem como sinalização para diversos processos fisiológicos, patológicos e toxicológicos (Restrepo-Angulo et al., 2010). Apesar dos canais iônicos das células de Leydig possuírem grande importância para a sinalização celular e esteroidogênese, não foram encontrados estudos anteriores que avaliassem o comportamento destes canais em condições celulares adversas; bem como o efeito dos fatores de estresse celular nos canais iônicos das células de Leydig.

Efeito do choque térmico nos canais Ca_v3 tipo-T e BK_{Ca} das células de Leydig

Identificar processos relacionados ao estresse celular, termo-resistência e esteroidogênese nas células de Leydig é importante na investigação de possíveis alvos terapêuticos visando a manutenção da fertilidade.

As respostas do estresse celular são mecanismos universais de extraordinária significância fisiológica e patológica. Estas respostas representam reações de defesa das células a danos ambientais em suas macromoléculas. Apesar de diversos fatores estarem envolvidos na resposta das células ao estresse celular, vários aspectos dessa resposta não são específicos ao agente estressante, pois as células monitoram o estresse baseada no dano a macromoléculas sem relação a que tipo de estresse causou o dano celular (Herr e Debatin, 2001; Kültz, 2005).

Atualmente sabe-se que a exposição ocupacional ao calor pode reduzir a fertilidade (Bonde, 2010). O calor é um dos fatores que induzem a degeneração testicular, com conseqüente perda da função normal dos testículos (Turner, 2007). Apesar de alguns estudos relatarem que as células de Leydig e a produção de testosterona podem ser alteradas em condições adversas que levem ao estresse celular, tais como o calor (Murphy et al., 2001; Gorostizaga et al., 2005; Kurowicka et al., 2007; Aktas e Kanter, 2009), hipóxia (Farias et al., 2008) e estresse oxidativo (Gautam et al., 2006); a literatura geralmente considera que as células de Leydig e a esteroidogênese não são diretamente afetadas pelo calor, sendo células termo-resistentes (Setchell, 2006). Os mecanismos celulares envolvidos na termo-resistência das células de Leydig ainda não estão totalmente esclarecidos.

No presente trabalho foi observado que o estresse térmico de 43°C durante 15 minutos não alterou a corrente de Ca^{2+} , mas alterou a corrente de K^+ . Os canais de K_{Ca} existem em células excitáveis e não excitáveis. Estes canais estão envolvidos em diversos processos celulares: excitabilidade neuronal; função no tecido muscular liso; secreção hormonal; imunidade inata; modulação do tônus vascular (Ghatta et al., 2006) e esteroidogênese nas células de Leydig (Carnio e Varanda, 1995).

A atividade dos canais BK_{Ca} nas células de Leydig é muito sensível a concentração do Ca^{2+} intracelular (Carnio e Varanda, 1995). Tendo em vista que o aumento do Ca^{2+} intracelular pode desencadear respostas que culminam em apoptose e diversos processos induzidos pelo estresse celular podem causar proteção através da redução do Ca^{2+} intracelular (Mattson, 2007); é possível que a redução na corrente nos canais BK_{Ca} observada no presente trabalho tenha ocorrido devido a redução do Ca^{2+} intracelular nas células de Leydig submetidas ao choque térmico.

O estresse térmico pode proteger a função celular inibindo as correntes de K^+ (Robertson, 2004). O K^+ participa do início, meio e fim do processo apoptótico; o efluxo de K^+ através da membrana plasmática causa a redução do volume celular durante a apoptose, o que é um marco inicial necessário para o disparo do processo apoptótico (Burg et al., 2006). Considerando que a apoptose pode ser atenuada através da inibição dos canais de K^+ (Yu et al., 1997), nós sugerimos a hipótese de que a redução da corrente de K^+ observada no presente estudo seja um mecanismo contra a apoptose nas células de Leydig, promovendo proteção e resistência contra o estresse térmico.

Segundo Armstrong e Robertson (2006), os mecanismos reguladores de K^+ podem ser a primeira linha de defesa contra o estresse térmico. Os resultados observados em nosso estudo corroboram com os obtidos por Ramirez et al. (1999), Wu et al (2002) e Robertson (2004), onde o estresse térmico reduziu as correntes de potássio. Intrigantemente, Hoag et al. (1997), Joyeux et al. (1998), Wu et al. (2001) e Duncker e Verdouw (2000) citaram que a ativação das correntes de K^+ protegem a função de células nervosas e cardiomiócitos. Saad e Hahn (1992) também observaram a ativação dos canais de K^+ em linhagens de células termo-resistentes. De acordo com Armstrong e Robertson (2006), vem sendo dada pouca atenção a possíveis mecanismos que coordenam respostas tecido-específicas ao estresse hipertérmico. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para desvendar os mecanismos envolvidos na modulação dos canais de K^+ em diferentes tipos celulares expostos ao estresse térmico.

Efeito da inibição da Hsp90 nos canais Ca_v3 tipo-T e BK_{Ca} das células de Leydig

As respostas celulares devido ao estresse térmico podem alterar as correntes iônicas (Robertson, 2004). No presente estudo nós iniciamos a busca por proteínas parceiras que podem modular a atividade dos canais de Ca^{2+} ou K^+ das células de Leydig com viabilidade terapêutica de administração sistêmica e com efeitos colaterais reduzidos. Nosso primeiro alvo de investigação foi a Hsp90, que é um importante fator relacionado ao estresse celular e pode ser inibida com análogos da Geldanamicina quando administrados via intravenosa ou oral (Porter et al., 2010).

As proteínas de choque térmico (Hsp) são fatores de resposta celular ao estresse muito conservado entre as espécies (das bactérias aos mamíferos), são expressas em níveis baixos em condição fisiológica e níveis altos durante o estresse celular. As Hsp's são chaperonas moleculares, ubíquas, que facilitam o empacotamento de proteínas e regulam seu controle de qualidade, previnem a agregação protéica e induzem proteínas inapropriadamente empacotadas a seguirem seu caminho específico de degradação, ajudando as células a sobreviverem a desafios ambientais (Kalmar e Greensmith, 2009). As Hsp's orquestram quando e onde as proteínas celulares são empacotadas e desempacotadas; se houver alterações graves no empacotamento e agregação protéica causada por estressores ambientais ou patológicos, estas proteínas podem servir como sensores e conduzir para apoptose, influenciando na decisão de vida e morte da célula (Saibil, 2008). As Hsp's são classificadas em subfamílias de acordo com seu peso molecular: Hsp's pequenas (16-30 kDa), Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp110 (Kalmar e Greensmith, 2009).

A Hsp90 é uma chaperona molecular que funciona como regulador do empacotamento, estabilidade e atividade de uma grande variedade de proteínas (Porter et al., 2010). A Hsp90 pode interagir fisicamente ou geneticamente com até 10% das proteínas da célula, sendo considerado o maior regulador de processos celulares (Zhao et al., 2005). A Hsp90 constitui 1% a 2% das proteínas no citoplasma, os níveis desta proteína aumentam devido ao estresse ambiental e sua função muda de acordo com as necessidades da célula (McClellan et al., 2007).

As Hsp's estão associadas com as respostas da célula durante o aumento da temperatura (Murphy et al., 2001). Diversos estudos vêm demonstrando que as Hsp's

interagem com canais iônicos de diversos tipos celulares. Segundo Yan et al. (2010), a Hsp90 pode afetar a expressão e a função dos canais K^+_{ATP} das células β pancreáticas. Também foi observado que a interação entre a Hsp90 e os canais de cloreto (ClC-2) resulta em uma maior atividade do canal devido ao aumento da sua expressão na superfície celular, maior facilitação da abertura do canal e do aumento da sensibilidade do canal ao Cl^- intracelular (Hinzpeter et al., 2006). Nanduri et al. (2009) também relatou que a Hsp90 pode modular os canais de K^+ hERG em células HEK293 submetidas a hipoxia. De acordo com Walker et al. (2010), a Hsp40 promove a degradação dos canais de K^+ hERG e reduz a eficiência de passagem ao íon. A Hsp27 e a Hsp70 também podem modular os canais de K^+ em vasos sanguíneos (Armstead e Hecker, 2005).

No presente estudo foi utilizado como inibidor da Hsp90 o análogo da geldanamicina 17-DMAP-GA devido as suas características farmacológicas: boa capacidade inibitória da Hsp90; hidrosolubilidade, o que nos permitiu o uso da droga sem a adição de DMSO; e por ser menos tóxico, evitando efeitos celulares indiretos (Tian et al., 2004). Neste trabalho não foi observado alterações nos canais iônicos devido à inibição da Hsp90; entretanto, outros estudos demonstraram alterações significativas (Hinzpeter et al., 2006; Yan et al., 2010). Isto pode ter ocorrido devido à: 1. Uso de diferentes análogos da geldanamicina, que possuem diferentes níveis de toxicidade; 2. Diferenças intrínsecas dos tipos celulares utilizados, pois as células de Leydig possuem grande resistência ao estresse ambiental, conservando a sua capacidade funcional (Setchell, 2006); 3. Duração do pré-tratamento com o inibidor da Hsp90.

A possível modulação dos canais de Ca^{2+} ou K^+ pela Hsp90 foi analisada em dois períodos diferentes: 1. Avaliação dos canais logo após administração do inibidor, visando avaliar a interação imediata da Hsp90 ou de alguma das proteínas ligadas a Hsp90; 2. Avaliação dos canais através de um pré-tratamento durante 2 horas com o inibidor da Hsp90, visando avaliar a interação das proteínas sensíveis a Hsp90 maturadas neste período. O inibidor da Hsp90 não alterou as correntes dos canais de Ca^{2+} ou K^+ das células de Leydig normais ou estressadas em ambos os períodos analisados.

A preparação das células de Leydig frescas foi usada para preservar ao máximo as características fisiológicas da célula, entretanto, esta metodologia não permitiu uma exposição prolongada ao inibidor da Hsp90. Estudos utilizando cultura de células de Leydig devem ser realizados para observar o efeito de longa duração da inibição da Hsp90.

Os inibidores da Hsp90, incluindo a geldanamicina e seus análogos, estão em diversas fases de estudos experimentais e clínicos como terapias para o câncer (Porter et al., 2010). Em nosso estudo foi observado que o tratamento com 10 μ M de 17-DMAP-GA não alterou as correntes dos canais Ca_v3 tipo-T e BK_{Ca} em células de Leydig, bem como sua administração imediata não alterou o transiente do Ca^{2+} intracelular.

Conclusões

O choque térmico pode reduzir a corrente dos canais BK_{Ca} , induzindo a ativação mais lenta destes canais e reduzindo sua dependência de voltagem. A corrente dos canais Ca_v3 tipo-T não foi alterada pela temperatura elevada. A administração do inibidor da Hsp90 (17-DMAP-Geldanamicina) não alterou a corrente dos canais BK_{Ca} , Ca_v3 tipo-T e o transiente do cálcio intracelular. O choque térmico pode inibir os canais BK_{Ca} , o que pode ser um dos mecanismos de sinalização relacionados ao estresse celular nas células de Leydig. A Hsp90 parece não estar envolvida neste processo.

Referências

AKTAS, C.; KANTER, M. A morphological study on Leydig cells of scrotal hyperthermia applied rats in short-term. *J Mol Hist.* 40:31-39, 2009. DOI: 10.1007/s10735-009-9210-9

ARMSTEAD, W.M.; HECKER, J.G. Heat shock protein modulation of K_{ATP} and K_{Ca} channel cerebrovasodilation after brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289: H1184-H1190, 2005. DOI:10.1152/ajpheart.00276.2005

ARMSTRONG, G.A.B.; ROBERTSON, R.M. A role for octopamine in coordinating thermoprotection of an insect nervous system. *J Thermal Biol.* 31:149-158, 2006. DOI:10.1016/j.jtherbio.2005.11.022

BONDE, J.P. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian J Androl.* 12:152-156, 2010. DOI: 10.1038/aja.2009.83

BURG, E.D.; REMILLARD, C.V.; YUAN, J.X. K^+ channels in apoptosis. *J Membr Biol.* 209:3-20, 2006. DOI: 10.1007/s00232-005-0838-4

CARNIO, E.C.; VARANDA, W.A. Calcium-activated potassium channels are involved in the response of mouse Leydig cells to human chorionic gonadotropin. *Braz J Med Biol Res.* 28:813-824, 1995.

CHEN, Y-C.; KAO, Y-H.; HUANG, C-F.; CHENG, C-C.; CHEN, Y-J.; CHEN, S-A. Heat stress responses modulate calcium regulations and electrophysiological characteristics in atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 48:781-788, 2010. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.006

COSTA, R.R.; VARANDA, W.A.; FRANCI, C.R. A calcium-induced calcium release mechanism supports luteinizing hormone-induced testosterone secretion in mouse Leydig cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:316-323, 2010. DOI: 10.1152/ajpcell.00521.2009

COSTA, R.R.; VARANDA, W.A. Intracellular calcium changes in mice Leydig cells are dependent on calcium entry through T-type calcium channels. *J Physiol.* 585, 2:339-349, 2007. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.137950

DESAPHY, J-F.; ROGIER, C.; JOFFRE, M. Modulation of K^+ conductances by Ca^{2+} and human chorionic gonadotrophin in Leydig cells from mature rat testis. *J Physiol.* 495, 1:23-35, 1996.

DUNCKER, D.J.; VERDOUW, P.D. Role of K^+ ATP Channels in Ischemic Preconditioning and Cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.* 14:7-16, 2000.

ESTEVEES, S.C.; MIYAOKA, R.; AGARWAL, A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 66, 4:691-700, 2011. DOI: 10.1590/S1807-59322011000400026

FARIAS, J.G.; BUSTOS-OBREGÓN, E.; TAPIA, P.J.; GUTIERREZ, E.; ZEPEDA, A.; JUANTOK, C.; CRUZ, G.; SOTO, G.; BENITES, J.; REYES, J.G. Time Course of Endocrine Changes in the Hypophysis-Gonad Axis Induced by Hypobaric Hypoxia in Male Rats. *J Reprod Develop*. 54, 1:18-21, 2008. DOI:10.1262/jrd.19046

GAUTAM, D.K.; MISRO, M.M.; CHAKI S.P.; SEHGAL, N. H₂O₂ at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis. *Apoptosis*. 11:39-46, 2006. DOI: 10.1007/s10495-005-3087-1

GHATTA, S.; NIMMAGADDA, D.; XU, X.; O'ROURKE, S.T. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. *Pharmacol Therap*. 110:103-116, 2006. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.10.007

GOROSTIZAGA, A.; BRION, L.; MALOBERTI, P.; MACIEL, F.C.; PODESTA, E.J.; PAZ, C. Heat shock triggers MAPK activation and MKP-1 induction in Leydig testicular cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 327:23-28, 2005. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.129

HERR, I.; DEBATIN, K-M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 98, 9:2603-2614, 2001. DOI:10.1182/blood.V98.9.2603

HINZPETER, A.; LIPECKA, J.; BROUILLARD, F.; BAUDOIN-LEGROS, M.; DADLEZ, M.; EDELMAN, A.; FRITSCH, J. Association between Hsp90 and the ClC-2 chloride channel upregulates channel function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290:45-56, 2006. DOI: 10.1152/ajpcell.00209.2005

HOAG, J.B.; QIAN, Y.Z.; NAYEEM, M.A.; D'ANGELO, M.; KUKREJA, R.C. ATP-sensitive potassium channel mediates delayed ischemic protection by heat stress in rabbit heart. *Am J Physiol.* 273:H2458-H2464, 1997.

JENSEN, T.K.; BONDE, P.P.; JOFFE, M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occupat Med.* 56:544-553, 2006.

JOYEUX, M.; GODIN-RIBUOT, D.; RIBUOT, C. Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the rat isolated heart. *Br J Pharmacol.* 123:1085-1088, 1998.

KALMAR, B.; GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev.* 61:310-318, 2009. DOI: 10.1016/j.addr.2009.02.003

KHAKI, A.A.; TUBBS, R.S.; SHOJA, M.M.; RAD, J.S.; KHAKI, A.; FARAHANI, R.M.; ZARRINTAN, S.; NAG, T.C. The effects of an electromagnetic field on the boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat: a light and transmission electron microscope study. *Folia Morphol.* 65, 3:188-194, 2006.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol.* 67:225-57, 2005. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635

KUROWICKA, B.; GAJEWSKA, A.; AMAROWICZ, R.; KOTWICA, G. Effect of warm-rearing and heat acclimation on pituitary-gonadal axis in male rats. *Int J Androl.* 31:579-587, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00812.x

MATTSON, M.P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 6:337-350, 2007. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2007.00275.x

MURPHY, B.D.; LALLI, E.; WALSH, L.P.; LIU, Z.; SOH, J.; STOCCO, D.M.; SASSONE-CORSI, P. Heat Shock Interferes with Steroidogenesis by Reducing Transcription of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene. *Mol Endocrinol.* 15, 8:1255-1263, 2001.

NANDURI, J.; BERGSON, P.; WANG, N.; FICKER, E.; PRABHAKAR, N.R. Hypoxia inhibits maturation and trafficking of hERG K⁺ channel protein: Role of Hsp90 and ROS. *Biochem Biophys Res Comm.* 388:212-216, 2009. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.07.149

PORTER, J.R.; FRITZ, C.C.; DEPEW, K.M. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol.* 14:412-420, 2010. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.03.019

RESTREPO-ANGULO, I.; DE VIZCAYA-RUIZ, A.; CAMACHO, J. Ion channels in toxicology. *J Appl Toxicol.* 30:497-512, 2010. DOI: 10.1002/jat.1556

HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl.* 27:335-342, 2004.

RAMIREZ, J.M.; ELSEN, F.P.; ROBERTSON, R.M. Long-Term Effects of Prior Heat Shock on Neuronal Potassium Currents Recorded in a Novel Insect Ganglion Slice Preparation. *J Neurophysiol.* 81:795-802, 1999.

ROBERTSON, R.M. Thermal stress and neural function: adaptive mechanisms in insect model systems. *J Thermal Biol.* 29:351-358, 2004. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2004.08.073

ROSER, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Anim Reprod Sci.* 107:179-196, 2008.

SAAD, A.H.; HAHN, G.M. Activation of potassium channels: Relationship to the heat shock response. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 89:9396-9399, 1992.

SAIBIL, H.R. Chaperone machines in action. *Curr Op Struct Biol.* 18:35-42, 2008. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.11.006

SAKALLIOGLU, A.E.; OZDEMIR, B.H.; BASARAN, O.; NACAR, A.; SUREN, D.; HABERAL, M.A. Ultrastructural study of severe testicular damage following acute scrotal thermal injury. *Burns.* 33:328-333, 2007.

SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. *Anim Reprod.* 3, 2:81-91, 2006.

SVECHNIKOV, K.; IZZO, G.; LANDREH, L.; WEISSER, J.; SÖDER, O. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *J Biomed Biotechnol.* ID 684504, 2010. DOI: 10.1155/2010/684504

TIAN, Z.Q.; LIU, Y.; ZHANG, D.; WANG, Z.; DONG, S.D.; CARRERAS, C.W.; ZHOU, Y.; RASTELLI, G.; SANTI, D.V.; MYLES, D.C. Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorg Med Chem.* 20:5317-29, 2004.

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

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

WALKER, V.E.; WONG, M.J.H.; ATANASIU, R.; HANTOUCHE, C.; YOUNG, J.C.; SHRIER, A. Hsp40 Chaperones Promote Degradation of the hERG Potassium Channel. *J Biol Chem.* 285, 5:3319-3329, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.024000

WU, B.S.; WALKER, V.K.; ROBERTSON, R.M. Heat Shock-Induced Thermoprotection of Action Potentials in the Locust Flight System. *J Neurobiol.* 49, 3:188-199, 2001.

WU, B.S.; LEE, J.K.; THOMPSON, K.M.; WALKER, V.K.; MOYES, C.D.; ROBERTSON, R.M. Anoxia induces thermotolerance in the locust flight system. *J Exp Biol.* 205:815-827, 2002.

YAN, F.F.; PRATT, E.B.; CHEN, P-C; WANG, F.; SKACH, W.R.; DAVID, L.L.; SHYNG, S.L. Role of Hsp90 in Biogenesis of the Cell ATP-sensitive Potassium Channel Complex. *Mol Biol Cell.* 21:1945-1954, 2010. DOI: 10.1091/mbc.E10-02-0116

YU, S.P.; YEH, C-H.; SENSI, S.L.; GWAG, B.J.; CANZONIERO, L.M.T.; FARHANGRAZI, Z.S.; YING, H.S.; TIAN, M.; DUGAN, L.L.; CHOI, D.W. Mediation of Neuronal Apoptosis by Enhancement of Outward Potassium Current. *Science.* 278:114-117 1997. DOI: 10.1126/science.278.5335.114

ZHAO, R.; DAVEY, M.; HSU, Y-C.; KAPLANEK, P.; TONG, A.; PARSONS, A.B.; KROGAN, N.; CAGNEY, G.; MAI, D.; GREENBLATT, J.; BOONE, C.; EMILI, A.; HOURY W.A. Navigating the Chaperone Network: An Integrative Map of Physical and Genetic Interactions Mediated by the Hsp90 Chaperone. *Cell.* 120:715-727, 2005. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.024

ZUEHLKE, A.; JOHNSON, J.L. Hsp90 and Co-Chaperones Twist the Functions of Diverse Client Proteins. *Biopolymers.* 93:211-217, 2010. DOI: 10.1002/bip.21292

6. Conclusão

Diariamente, grande segmento da sociedade é exposto a agentes físicos ambientais que interagem com o organismo, podendo desencadear efeitos adversos. Dentre os agentes físicos mais comuns estão os campos eletromagnéticos (CEM) e a temperatura elevada. O presente trabalho demonstrou que:

1. A exposição de ratos desde a gestação até a puberdade a CEM de baixa frequência (60 Hz e 1 mT) pode retardar o desenvolvimento testicular.
2. A exposição de ratos a CEM de 60 Hz e 1 mT desde a gestação até 21 ou 90 dias pós-natal (adulto) pode induzir a degeneração testicular em animais adultos.
3. Células de Leydig expostas ao choque térmico de 43°C durante 15 minutos demonstraram redução na corrente dos canais de potássio BK_{Ca} . Os canais de cálcio Ca_v3 tipo T não sofreram alteração devido ao choque térmico. A Hsp90 parece não estar envolvida neste processo.

Vale ressaltar a necessidade de mais pesquisas e a discussão para implementação de medidas públicas preventivas visando reduzir possíveis efeitos deletérios devido a exposição da população ao CEM e à temperatura elevada, pois estes podem representar risco à fertilidade.