

LYGIA MARIA DE ALMEIDA

**QUANTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DA ESPERMATOGÊNESE
DE RATOS WISTAR TRATADOS COM
DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss.

CURITIBA
1997

LYGIA MARIA DE ALMEIDA

QUANTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS
WISTAR TRATADOS COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:

PROF. DR. ROMILDO R. WEISS
UFPR

PROF.^a DR.^a CLOTILDE DE LOURDES BRANCO GERMINIANI
UFPR

PROF. DR. ANTONIO CARLOS S. CASTRO
UFMG

TESE DEFENDIDA EM 27 DE MAIO DE 1997.

À memória do Prof. Dr. Antonio Mies Filho.

MESTRE
NÃO É
QUEM
SEMPRE
ENSINA,
MAS
QUEM
— DE
REPENTE —
APRENDE

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Romildo R. Weiss,

a orientação, paciência e apoio na condução deste trabalho.

Ao Prof. Giovanni Loddo,

a oportunidade que nos deu de frequentar o Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas e a co-orientação recebida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos S. Castro,

a competente co-orientação, o valioso auxílio, os ensinamentos e, sobretudo, a amizade.

À Prof.^aDr.^aClotilde de Lourdes Branco Germiniani,

seu incansável apoio aos pupilos e sua luta pelo ensino da Medicina Veterinária.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila,

o estímulo que sempre proporcionou aos que se dedicam à investigação científica.

À Prof.^aDr.^aZélia Milleo Pavão, docente do Departamento de Matemática da PUC-PR, a prestativa colaboração na análise estatística.

Às professoras Edith Susana Fanta, Lucélia Donatti e Ana Leuch Lozovei, que tiveram atuação marcante durante as diferentes etapas de elaboração deste trabalho.

À Prof.^a Sônia Grötzner,

o auxílio no preparo da documentação fotográfica.

Ao Prof. Gualter Funk de Queiroz,

os valiosos ensinamentos e ajuda.

Às secretárias do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Tânia Mara Schrank e Deleuse Cherobim,

a atenção e presteza.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas,

o auxílio recebido na preparação das lâminas.

À Universidade Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

que me possibilitaram a realização do trabalho.

Ao Laboratório Marcolab,

o apoio material com que nos distinguiu.

A meu marido, João Carlos, e a meus filhos, Pedro, Bruno e Victor, tudo.

Finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para a realização desta árdua tarefa, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO DMSO	3
2.2 PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS	4
2.2.1 ATIVIDADE NEUROPROTETORA	4
2.2.2 ATIVIDADE CRIOPROTETORA/ANTICONGELANTE	4
2.2.3 EFEITOS SOBRE ENZIMAS	4
2.2.4 ATIVIDADE CARREADORA/POTENCIALIZADORA	5
2.2.5 ATIVIDADE DE ELIMINADOR DE RADICAIS/ANTIINFLAMATÓRIA	5
2.2.6 EFEITOS DO DMSO NA REPRODUÇÃO	6
2.2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	7
2.2.8 EFEITOS ANALGÉSICOS	7
2.2.9 PROPRIEDADES DIVERSAS	7
2.3 TOXICIDADE DO DIMETIL SULFÓXIDO	7
2.4 ABSORÇÃO/ELIMINAÇÃO	9
2.5 ESPERMATOGÊNESE	9
2.5.1 CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS	11
2.5.1.1 Espermatogônias	11
2.5.1.2 Espermatócitos	12
2.5.1.3 Espermatídes	12
2.6 CÉLULAS DE SERTOLI	12
2.7 CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO	13
2.7.1 DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO	16
2.7.2 ESTÁGIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO	16
2.7.3 QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS	20
3.2 PLANO EXPERIMENTAL	20
3.2.1 TRATAMENTOS	20

3.2.1.1 Animais do Tratamento I (7 dias)	20
3.2.1.2 Animais do Tratamento II (54 dias)	20
3.2.2 AVALIAÇÃO DOS GRUPOS	22
3.3 COLHEITA E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO MATERIAL	22
3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS	22
3.4.1 ESTÁGIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO	22
3.4.2 DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	23
3.4.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS DOS COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR	24
3.4.4 CONTAGEM DOS ELEMENTOS CELULARES DO EPITÉLIO SEMINÍFERO	24
3.4.5 RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE	25
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS	26
4.1 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA ENTRE OS COMPONENTES DO TESTÍ- CULO	26
4.1.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	26
4.1.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	26
4.1.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	27
4.2 DIÂMETRO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS	27
4.2.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	27
4.2.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	27
4.2.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	28
4.3 POPULAÇÃO CELULAR DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	28
4.3.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	28
4.3.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	29
4.3.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	29
4.4 RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE.....	29
4.4.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	29
4.4.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	30
4.4.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	30
5 DISCUSSÃO	45
5.1 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA ENTRE COMPONENTES DO TESTÍ- CULO	45
5.2 DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	46
5.3 POPULAÇÃO CELULAR DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS E RENDI- MENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE	48
6 CONCLUSÕES	54
ANEXO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE TABELAS

1	PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) DOS COMPONENTES DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR CONTROLES E TRATADOS COM DMSO, SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	31
2	PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) DOS COMPONENTES DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR CONTROLES E TRATADOS COM DMSO GEL, SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	31
3	PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) DOS COMPONENTES DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR CONTROLES E TRATADOS COM DMSO GEL, SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	32
4	DIÂMETRO (MÉDIA + DESVIO PADRÃO) DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	32
5	DIÂMETRO (MÉDIA + DESVIO PADRÃO) DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	33
6	DIÂMETRO (MÉDIA + DESVIO PADRÃO) DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	33
7	NÚMERO DE CÉLULAS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) POR SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	34
8	NÚMERO DE CÉLULAS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) POR SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	34
9	NÚMERO ¹ DE CÉLULAS (MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO) POR SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	35
10	RAZÃO ENTRE O NÚMERO CORRIGIDO DE ESPERMATÓCITO I EM PAQUÍTENO E ESPERMÁTIDE ARREDONDADA, EM RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	37
11	RAZÃO ENTRE O NÚMERO CORRIGIDO DE ESPERMATÓCITO I EM PAQUÍTENO E ESPERMÁTIDE ARREDONDADA, EM RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	37
12	RAZÃO ENTRE O NÚMERO CORRIGIDO DE ESPERMATÓCITO I EM PAQUÍTENO E ESPERMÁTIDE ARREDONDADA, EM RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	38
13	DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	38

14 DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I	39
15 DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II	39

LISTA DE FIGURAS

1	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 3 DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO (CES)	40
2	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NOS ESTÁGIOS 5/6 DO CES	40
3	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 7 DO CES	40
4	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 8 DO CES	40
5	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 3 DO CES	41
6	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NOS ESTÁGIOS 5/6 DO CES	42
7	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 7 DO CES	43
8	SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 8 DO CES	44

RESUMO

Com o objetivo de obter dados sobre os efeitos da ação do dimetil sulfóxido (DMSO) na espermatogênese de ratos, de modo a proporcionar uma análise mais acurada dos efeitos do DMSO sobre a quantificação da espermatogênese de mamíferos, 24 ratos albinos da raça Wistar, com 75 dias de idade e peso vivo médio de 325 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, foram utilizados no estudo. Os animais foram divididos em dois grupos — Controle e Experimental — e submetidos a dois tipos de tratamento. No primeiro, o Grupo Experimental (de 10 animais) recebeu aplicações tópicas de DMSO no jarrete, 2 vezes ao dia, na dosagem de 1,0 g/kg de peso vivo, durante um período de 7 dias consecutivos. No segundo tratamento, o Grupo Experimental (de 7 animais) recebeu aplicações tópicas de DMSO no escroto 2 vezes ao dia, na dosagem de 1,0 g/kg de peso vivo, durante um período de 54 dias consecutivos. O Grupo Controle (de 7 animais) recebeu aplicações de solução salina friccionadas na pele do jarrete e do escroto 2 vezes ao dia, por período equivalente ao dos tratamentos. Foram avaliados e comparados os seguintes parâmetros: a) proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular; b) diâmetro dos túbulos seminíferos; c) contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero; d) rendimento intrínseco da espermatogênese. As investigações proporcionaram os seguintes resultados: a) a proporção volumétrica entre os grupos analisados não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$); b) os dados obtidos no diâmetro dos túbulos seminíferos indicam que o parênquima testicular não diferiu significativamente entre os dois grupos; c) a contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero não apresentou diferença significativa entre os dois grupos estudados; d) constatou-se um rendimento aparentemente normal da espermatogênese entre os grupos analisados. O processo espermatogênico, no presente trabalho, aparentemente não causou alteração após a aplicação do DMSO e da solução salina. Há necessidade de estudos posteriores para confirmar os dados obtidos.

ABSTRACT

In order to obtain data on the effects of dimetil sulfoxide (DMSO) on the spermatogenesis of rats, and provide a more accurate analysis of the effects of DMSO on the quantification of spermatogenesis on mammals, 24 albino Wistar rats, 75 days old, average weight 325 grams, originating in the Central Vivarium of Federal University of Parana State, were used to the study. The animals were divided into two groups — Control and Experimental — and subjected to two types of treatment. In the first treatment, the Experimental Group received topic applications of DMSO in the hock twice a day, at a dosage of 1.0 g per kg of live weight for 7 consecutive days. In the second treatment, the Experimental Group received topic applications of DMSO on the scrotum twice a day, at a dosage of 1.0 per kg of live weight for 54 consecutive days. The Control Group received saline solution applications swabbed on the hock and scrotal skin twice a day for the same period as the Treatment Groups. The following parameters were assessed and compared: a) volumetric proportions of the component of testicular parenchyma; b) diameter of the seminiferous tubules; c) counts of cell types in the seminiferous epithelium; d) intrinsic spermatogenic yield. The investigations provided the following results: a) no significant difference ($p \leq 0.05$) was found between the volumetric proportions of the two groups; b) data on the seminiferous tubular diameter indicated no significant difference ($p \leq 0.05$) in the testicular parenchyma of the two groups; c) no significant difference ($p \leq 0.05$) on seminiferous epithelium cell count between the groups studied; d) a similar spermatogenesis yield between the groups analyzed. In the present study, applications of DMSO and saline solution did not appear to affect any major on the spermatogenic process. However further studies with more powerful experiments are essential to confirm our current findings.

1 INTRODUÇÃO

Originalmente utilizado como solvente industrial, o DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO) é uma substância incolor que se mistura muito rapidamente com a água, com álcool etílico e com a maioria dos solventes orgânicos.

A partir de 1964, quando foi relatada a sua habilidade de penetrar a pele íntegra, pesquisas e seu uso clínico têm revelado ampla variedade de propriedades farmacológicas e terapêuticas (ALSUP, 1984).

Essas propriedades e eventuais efeitos tóxicos têm gerado muita controvérsia, e ainda não existe consenso quanto aos benefícios e desvantagens de seu uso na clínica veterinária.

Não existem estudos relacionando eventuais efeitos tóxicos do DMSO sobre a espermatogênese de machos de qualquer espécie, o que limita seu uso em situações clínicas específicas em animais destinados à reprodução.

No estudo da fertilidade de machos, especial ênfase deve ser dada à sua capacidade espermatogênica. Essa capacidade pode ser avaliada por diferentes métodos, incluindo, entre outros, análises quantitativas de sêmen obtido por ejaculação; estimativas de reservas espermáticas gonádicas e extragonádicas, através de contagens hemocitométricas e epididimárias, e estudos histológicos quantitativos do epitélio seminífero (BERNDTSON, 1977).

A expressão *cinética da espermatogênese* designa o conjunto de todos os processos citológicos (multiplicação, diferenciação e metamorfose das células germinativas) e histológicos (evolução dos grupos celulares) que ocorrem dentro dos túbulos seminíferos (CLERMONT e HARVEY, 1967). No estudo da cinética da espermatogênese, é necessário o reconhecimento morfológico dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero, incluindo-se aí tanto células germinativas (espermatogênicas) como células de sustentação somática (de Sertoli).

Com os dados quantitativos gerados pelo estudo da cinética, podem-se estimar quantos espermatozoides são potencialmente obtidos a partir de uma espermatogônia, como também determinar a fase (ou fases) da espermatogênese ou, até mesmo, o tipo celular (ou tipos celulares) específico(s) eventualmente afetado(s) por determinada droga (CASTRO et al., 1997).

A avaliação histológica do epitélio seminífero é um componente essencial para determinar eventuais efeitos tóxicos de uma droga na fertilidade de machos (RUSSEL et al., 1990).

Estudos de FERRARI (1995) revelaram que o DMSO não apresentou efeito negativo nas características reprodutivas de machos da espécie ovina.

Visando um melhor conhecimento dos efeitos do DMSO sobre a fertilidade de machos, decidiu-se realizar o presente estudo com o objetivo de avaliar a espermatogênese de ratos tratados com DMSO. Para isso, os seguintes itens são abordados:

- contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero;
- diâmetro dos túbulos seminíferos;
- proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular;
- rendimento intrínseco da espermatogênese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO DMSO

Dimetil sulfóxido (DMSO), de fórmula $(\text{H}_3\text{C})_2=\text{O}$, é um líquido incolor originalmente utilizado como solvente industrial (ALSUP, 1984; BRAYTON, 1986 e 1995). É um solvente aprótico e bipolar que se mistura rapidamente com a água, com o álcool etílico e com a maioria dos solventes orgânicos. Pode atuar tanto como agente redutor quanto oxidante (ALSUP, 1984).

Apresenta habilidade de penetrar a pele íntegra em concentrações de 80-100%, podendo transportar através dela moléculas não ionizadas de baixo peso molecular (ALSUP, 1984).

O DMSO também penetra as mucosas, a barreira hematoencefálica (KOCIS et al., 1968; BROADWELL et al., 1982), as membranas de organelas celulares (MISCH e MISCH, 1975; KHARASCH e THYAGARAJAN, 1983) e as membranas microbianas (RAMMLER e ZAFARONI, 1967, FOX e FOX, 1983). A grande capacidade de penetração do DMSO, segundo pesquisadores, se deve à sua habilidade de substituir as moléculas de água nas membranas biológicas (SZMANT, 1967; DAVID, 1972; KHARASH e THYAGARAJAN, 1983).

O DMSO é um eficaz eliminador de radicais hidroxila ($-\text{OH}$) (REPINE et al., 1979) e apresenta capacidade de ligar-se com hidrogênio (BRAYTON, 1986; JACOB e HERSCHLER, 1986). Também apresenta a capacidade de interagir com moléculas orgânicas, sem mudar definitivamente sua fórmula molecular ou estrutural.

O DMSO é extremamente higroscópico e se dilui rapidamente em concentrações de 66 a 67% quando exposto ao meio ambiente, e por isso deve ser mantido bem fechado (BRAYTON, 1995).

A hidratação do DMSO é exotérmica. O calor desenvolvido é detectado quando soluções com concentrações iguais a 90% ou maiores são misturadas à água ou aplicadas sobre a pele (BRAYTON, 1995).

O DMSO inibe ou estimula várias enzimas *in vivo* e *in vitro*, dependendo de sua concentração. É um poderoso inibidor de colinesterases e da álcool desidrogenase (MONDER, 1967; PERLMAN e WOLFF, 1968).

2.2 PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS

2.2.1 ATIVIDADE NEUROPROTETORA

Sua capacidade de eliminar radicais hidroxila é útil no tratamento de trauma do sistema nervoso central (BROWN, 1992).

O DMSO demonstrou propriedades neuroprotetoras após lesões experimentais de medula em cães (de La TORRE, 1981). O mecanismo proposto pelo autor é a inibição da agregação plaquetária e a preservação da microcirculação, reduzindo os danos aos tecidos.

2.2.2 ATIVIDADE CRIOPROTETORA/ANTICONGELANTE

O DMSO age como um anticongelante em concentrações iguais ou menores que 20% (5 M), porque sua ligação com o hidrogênio da molécula de água interfere na formação dos cristais de gelo. É eficaz na criopreservação de células e tecidos (LOVELOCK e BISHOP, 1959; BALDINI, 1975; FRANKS et al., 1985; BRAYTON, 1986).

2.2.3 EFEITOS SOBRE ENZIMAS

In vitro, análises enzimáticas revelaram que o DMSO em concentração de 4% já inibe 45% da atividade da colinesterase (SAMS, 1967), e *in vivo* apresenta efeitos cardioativos e cardiovasculares (SHLAFER e KAROW, 1975; HAMEROFF

et al., 1983). O DMSO inibe a álcool desidrogenase *in vitro* (PERLMAN e WOLFF, 1968) e *in vivo* (MALLACH, 1967).

2.2.4 ATIVIDADE CARREADORA/POTENCIALIZADORA

O DMSO também transporta muitas substâncias através da membrana, influenciando seus efeitos farmacológicos, e aumenta a absorção de anestésicos locais, tetraciclina, testosterona e corticosteróides pela pele e mucosas (KLIGMAN, 1965; DJKAN e GUNBERG, 1967; KNOWLES, 1967; MAIBACH e FELDMAN, 1967; DAVID, 1972; WOOD e WOOD, 1975; BRAYTON, 1986).

Segundo POTTS et al. (1967), as soluções de DMSO aumentam significativamente a penetração cutânea de insulina, heparina e sulfadiazina. Agentes cardioativos e anticolinesterásicos podem ter sua penetração aumentada ou sua atividade modificada na presença de DMSO (BANTHORPE e LAMONT, 1967; BRAUDE e MONROE, 1967; SMITH et al., 1967a; STEINBERG, 1967; RUBIN, 1975; YELLOWLEES, GREENFIELD e McINTYRE, 1980).

2.2.5 ATIVIDADE DE ELIMINADOR DE RADICAIS/ANTIINFLAMATÓRIA

ROSENBLUM e EL SABBAN (1982) demonstraram que *in vitro* o DMSO e o glicerol, ambos eliminadores de radicais livres, inibem a agregação plaquetária e a vasodilatação em camundongos com lesões arteriolares.

A capacidade de eliminação de radicais demonstrada pelo DMSO e pelo seu metabólito dimetil sulfido (DMS) é responsável por algumas de suas propriedades antiinflamatórias (De LA TORRE, 1983; KHARASCH e THYAGARAJAN, 1983; REPINE et al., 1983; ROSENBLUM, 1983) e antiisquêmicas (FINNEY et al., 1967; ALBIN et al., 1983; KEDAR et al., 1983; RAVID et al., 1983). O DMSO elimina radicais hidroxila (—OH), e o seu metabólito reduzido DMS elimina radicais livres oxigênio (—O) (HILL et al., 1983).

Sua ação antiinflamatória é a propriedade farmacológica mais utilizada em clínica. O mecanismo primário da ação do DMSO na inflamação aguda é

provavelmente a eliminação de radicais hidroxila (GOROG e KOVACS, 1975; De La TORRE, 1983; ROSENBLUM, 1983). Outros mecanismos propostos foram inibição da migração de células fagocitárias (ANTONY et al., 1983), inibição da proliferação de fibroblastos (BERLINER e RUNNAN, 1967; TIEGLAND, 1967) e inibição da produção de anticorpos (PESTRONK e DRACHMAN, 1980).

Nas inflamações crônicas os resultados são menos evidentes. Alguns resultados satisfatórios foram relatados no tratamento de doenças reumáticas (MATSUMOTO, 1967; JIMENEZ e WILKENS, 1982), artrites crônicas (BLUMENTHAL e FUCHS, 1967; DEMOS et al., 1967; JOHN e LAUDAHN, 1967) e cistite intersticial (PERSKI e STEWART, 1967).

2.2.6 EFEITOS DO DMSO NA REPRODUÇÃO

Baseados na capacidade antiinflamatória do DMSO, LEY et al. (1989) verificaram seus efeitos em infusões intra-uterinas de soluções contendo 10 a 30% de DMSO em éguas inférteis e observaram que as infusões com soluções a 30% de DMSO produziram acentuada redução da inflamação endometrial e da fibrose periglandular quando comparadas com aquelas que receberam infusões de solução salina. Posteriormente, LEY et al. (1990) estudaram os efeitos sobre o mecanismo de defesa celular uterina e relataram que a terapia com DMSO a 30% não causa diminuição na atividade fagocitária dos neutrófilos quando comparada com a terapia por infusão salina.

FIGUEIREDO et al. (1993) estudaram fórmulas de tratamento de mamite por *Staphylococcus aureus* com penicilina e estreptomicina em veículo aquoso com e sem adição de 20% de DMSO, e observaram que as fórmulas com DMSO proporcionaram maiores índices de glândulas mamárias negativas a bacteriologia.

O DMSO tem sido usado com sucesso como crioprotetor de sêmen de mamíferos (LOVELOCK e BISHOP, 1959; ZIMMERMAN, MAUDER e MOLDAUER, 1964) e embriões (TERVILL e GOOLD, 1984; FRANKS et al., 1985).

FERRARI (1995), observando os efeitos da aplicação tópica de DMSO no jarrete e no escroto de ovinos reprodutores, demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na biometria testicular, no comportamento sexual e nas características seminais entre os reprodutores tratados com o produto e os que receberam solução salina.

2.2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O DMSO em concentrações de 5 a 50%, *in vitro*, apresenta atividade bacteriostática ou bactericida contra muitas bactérias patogênicas, como *M. tuberculosis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp, *E. coli* (POTTS et al., 1967; SEIBERT et al., 1967; WOOLEY et al., 1982).

2.2.8 EFEITOS ANALGÉSICOS

Numerosos estudos clínicos atestam a eficácia do DMSO na eliminação da dor causada por desordens músculo-esqueléticas agudas e crônicas (BLUMENTHAL e FUCHS, 1967; DEMOS et al., 1967; GOLDMAN, 1967) e por incisões cirúrgicas (PENROD et al., 1967).

2.2.9 PROPRIEDADES DIVERSAS

A vasodilatação local e a sensibilidade cutânea comumente observadas após a aplicação tópica de DMSO se devem à sua capacidade de liberar histamina pelos mastócitos (KLIEMAN, 1965; SULZBERGER et al., 1967).

2.3 TOXICIDADE DO DIMETIL SULFÓXIDO

A toxicidade do DMSO é considerada baixa e seus principais efeitos tóxicos derivam de sua combinação com outros elementos que são transportados ou potencializados ou ambos (KNOWLES, 1967; DAVID, 1972; RUBIN, 1975; BRAYTON, 1986; SCHUCH et al., 1988).

A DL50 para dose oral única em camundongos, ratos e gatos está fixada entre 12,5 e 28,3 g/kg (ALSUP, 1984), e para aplicação endovenosa, entre 2,5 e 8,9 g/kg (CAUJOLLE et al., 1967; SMITH et al., 1967b; RUBIN, 1975).

A dose terapêutica endovenosa é próxima a 1,0 g/kg em soluções de 10 a 45% e em administrações lentas, em gatos (HOERLEIN et al., 1983) e eqüinos (MAYHEW e MacKAY, 1982; REED, 1983). Com doses letais de DMSO, a morte é precedida por prostração, convulsões, dispnéia, hipotensão e edema pulmonar (CAUJOLLE ET AL., 1967; SMITH et al., 1967b).

Reações de pele são comumente observadas em todas as espécies (GOLDMAN, IGELMAN e KITZMILLER, 1967; RUBIN, 1975; SEHTMAN, 1975). KLIGMAN (1965) observou que a vasodilatação local devida à liberação de histamina provoca um efeito térmico; além disso, pode ocorrer ressecamento, endurecimento e descamação da pele após aplicações tópicas repetidas; doses isoladas, entretanto, não são suficientes para causar desconfortos sérios. O calor é formado pela reação do DMSO com a água atmosférica e tecidual (BRADHAM e SAMPLE, 1967).

Reações alérgicas com dermatites severas, incluindo vesiculações e urticária, podem ocorrer após aplicações tópicas, decorrentes, porém, de características individuais (GOLDMAN, 1967). Não foi determinado ainda se essas reações são causadas pelo próprio DMSO ou se resultam de apresentação de alérgenos ao sistema imunológico pelo DMSO (BRAYTON, 1986).

Toxicidade ocular foi verificada em coelhos jovens após altas doses diárias de DMSO em aplicações tópicas ou orais (RUBIN e BARNETT, 1967; WOOD et al., 1967). Em coelhos, cães e suínos as alterações características foram diminuição na relucência do cristalino, tornando o animal míope (KLEBERGER, 1967; RUBIN e BARNETT, 1967).

DMSO causa hemólise *in vitro* e *in vivo* (DAVID, 1972; BLYTHE et al., 1986). O efeito hemolítico *in vivo* depende da sua concentração, da velocidade de administração e da osmolaridade da solução, e é exacerbado quando a administração endovenosa é rápida e em soluções maiores que 40% (BRAYTON, 1995).

Efeitos teratogênicos do DMSO foram relatados em aves e animais de laboratório. Injeções de 1,0-30,5 mg de DMSO em solução a 50%, em embriões de galinha de 72 a 96 horas de incubação produziram alta porcentagem de defeitos de desenvolvimento em pintinhos. Da mesma forma, doses repetidas de DMSO (4-10 g/kg) administradas oral ou intraperitonealmente em fêmeas de camundongos e coelhos no início da gestação resultaram em abortos e em crias com anomalias do desenvolvimento (CAUJOLLE et al., 1967).

2.4 ABSORÇÃO/ELIMINAÇÃO

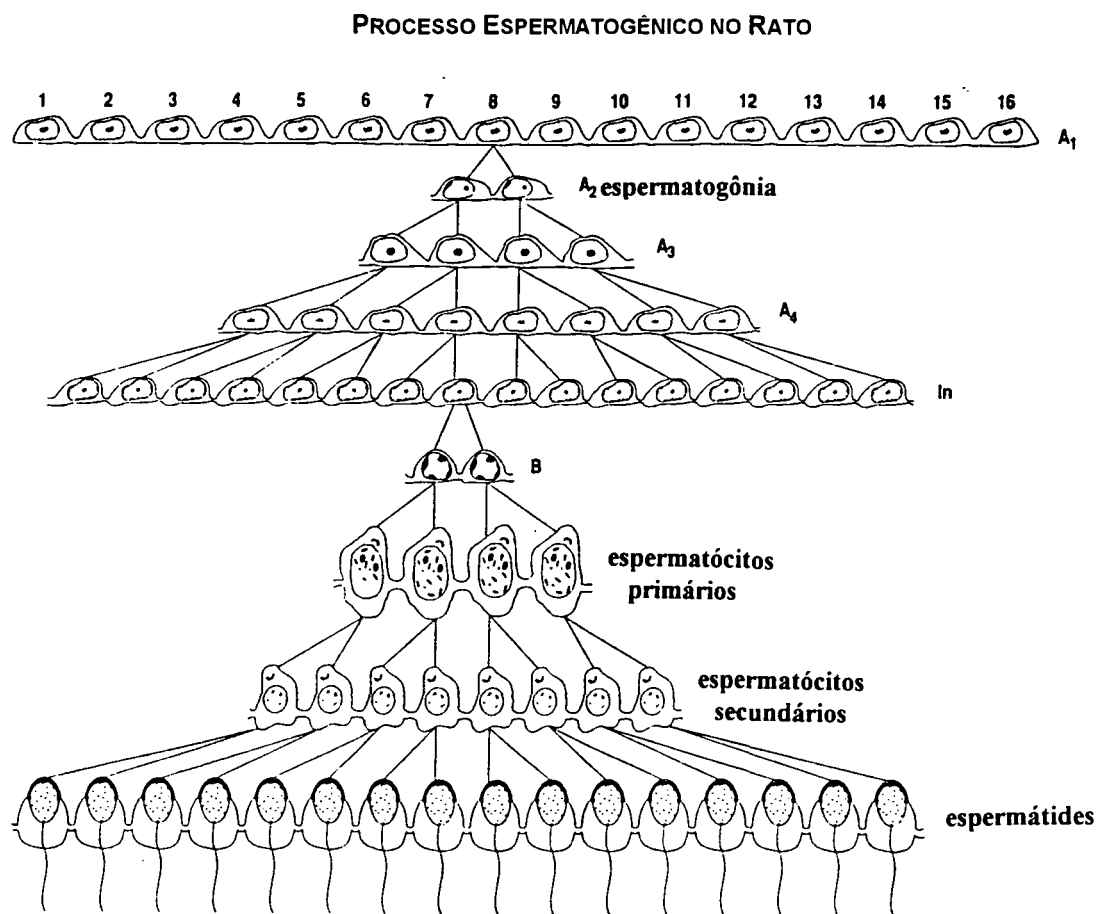
O DMSO é absorvido rapidamente na pele e é mais eficaz em concentrações maiores do que 80% ou iguais. Após 5 minutos de aplicação tópica ou parenteral pode ser notado um característico hálito de alho, devido à sua redução para dimetil sulfito; 20 minutos após a aplicação, o DMSO pode ser detectado em todos os órgãos, e em uma hora, nos ossos e dentes (KOLB et al., 1967).

A maior parte do DMSO é excretada pela urina. Menos que 2% é excretado pelas fezes e menos que 3% é exalado como DMS (KOLB et al., 1967; DAVID, 1972).

2.5 ESPERMATOGÊNESE

No testículo de mamíferos distinguem-se, do ponto de vista morfofuncional, dois compartimentos básicos: (a) compartimento intersticial ou intertubular contendo células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e, sobretudo, as células de Leydig, principal fonte de andrógenos do organismo, e (b) compartimento tubular, formado pelos túbulos seminíferos no interior dos quais ocorre a espermatogênese — processo definido como o conjunto de divisões e transformações através das quais células troncos da linhagem germinativa masculina, as espermatogônias, dão origem aos espermatozóides.

O processo espermatogênico pode ser dividido em três fases distintas: a primeira é a fase proliferativa ou espermatogonial, em que as espermatogônias proliferam e dão origem aos espermatócitos primários e, ao mesmo tempo, renovam a população espermatogonial necessária para a manutenção do processo; a segunda fase envolve divisões reducionais dos espermatócitos ou divisões meióticas, que resultam na formação de células haplóides, as espermatídes; a terceira se caracteriza por uma complexa série de transformações citológicas das espermatídes, que se convertem em células altamente especializadas, os espermatozóides (CLERMONT, 1972; RUSSEL et al., 1990) (ver ilustração abaixo). A primeira e a terceira fase apresentam aspectos morfológicos que são espécie-específicos, enquanto a fase de espermatócitos ou fase meiótica possui características morfológicas comuns nas várias espécies de mamíferos (CLERMONT, 1972).



(de Russel et al, 1990).

2.5.1 CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS

2.5.1.1 Espermatogônias

As espermatogônias podem ser conceituadas como células germinativas que se originam dos gonócitos primordiais e se situam no compartimento basal dos túbulos seminíferos. Sua última geração origina os espermátócitos primários (COUROT et al., 1970). Com base nas características morfológicas de seus núcleos, dois tipos principais de espermatogônias foram pela primeira vez definidos por REGAUD (1901). ALLEN (1918), por sua vez, utilizou os termos “tipo A” e “tipo B” para designar estes dois tipos: as espermatogônias do tipo A têm núcleo com granulação cromatínica fina e pouco corada, “poeirenta”, e as do tipo B têm núcleo com grumos de cromatina intensamente corados, “crostosos”. Um terceiro tipo de espermatogônia, referido como intermediário (In) por possuir características de transição entre os dois tipos anteriores, foi identificado por CLERMONT e LEBLOND (1953).

A cada divisão mitótica dobra teoricamente o número de espermatogônias. Algumas espermatogônicas A, no entanto, não se tornam comprometidas diretamente com o processo divisional cíclico, permanecendo no testículo como espermatogônias troncos de reserva. Elas são relativamente resistentes a uma ampla variedade de insultos e freqüentemente sobrevivem quando são afetados os outros tipos celulares da linhagem espermatogênica (DYM e CLERMONT, 1970; HUCKINS e OAKBERG, 1978). Essas células servem, portanto, como fonte potencial de células germinativas destinadas a repovoar os túbulos seminíferos após injúria grave do testículo.

2.5.1.2 Espermatócitos

São células germinativas que se originam por mitose da última geração de espermatogônias e passam pelo processo meiótico, isto é, por duas divisões sucessivas, levando à formação de células haplóides, as espermátides. As células que irão sofrer a primeira divisão de maturação são denominadas *espermatócitos primários*; as que sofrerão a segunda divisão meiótica são os *espermatócitos secundários* (COUROT et al., 1970; CLERMONT, 1972). Esses últimos são células espermatogênicas de vida muito curta, que, sem duplicar seu DNA, entram na segunda divisão meiótica da qual resultam as espermátides (CLERMONT, 1972).

2.5.1.3 Espermátides

Derivadas da segunda divisão de maturação, as espermátides são células que não se dividem e somente passam por complexas transformações nucleares e citoplasmáticas durante a espermiogênese, dirigidas para a formação dos espermatozóides (COUROT et al., 1970; CLERMONT, 1972).

As principais alterações citológicas das espermátides incluem uma extrema condensação da cromatina, o desenvolvimento de um flagelo para motilidade, a formação de um acrossomo para facilitar a penetração através dos envoltórios do ovócito, a migração de mitocôndrias para a peça intermediária e a eliminação do excesso de citoplasma sob a forma de corpos residuais (POCCIA, 1994).

2.6 CÉLULAS DE SERTOLI

As células de Sertoli são os elementos somáticos do epitélio seminífero. Admite-se que em mamíferos adultos elas não se dividem e mantêm invariável o seu número (ORTAVANT et al., 1984). Com base nessa estabilidade é que se têm utilizado índices de células de Sertoli para avaliar a eficiência quantitativa do processo espermatogênico (HOCHEREAU-De REVIERS et al., 1987).

São extremamente resistentes a injúrias drásticas capazes de afetar os demais tipos celulares do epitélio seminífero (CLERMONT e MORGENTALER, 1955). O núcleo dessas células contém um grande nucléolo e profundas reentrâncias, e sua forma triangular ou alongada modifica-se durante o ciclo do epitélio seminífero (ORTAVANT et al., 1984).

RUSSEL et al. (1990) atribuíram várias funções às células de Sertoli: (a) manter a integridade do epitélio seminífero, através de sua união com outras células e elementos; (b) formar *barreira hematotesticular*, cuja base morfológica reside nas junções íntimas entre células de Sertoli adjacentes; (c) secretar fluidos para a formação do lume tubular; (d) participar na espermição, que é a liberação dos espermatozoides no lume tubular; (e) fagocitar células germinativas degeneradas durante a espermatogênese normal; (f) transferir nutrientes para as células germinativas; (g) envolver-se no metabolismo de esteróides; (h) translocar células dentro do epitélio seminífero, desde o compartimento basal, passando pelo intermediário, até o compartimento adluminal; (i) secretar proteínas, como a inibina e a proteína fixadora de andrógeno (ABP); (j) ser alvo para hormônios no testículo e mediar efeitos hormonais, pois possuem receptores para hormônio folículo-estimulante e para a testosterona.

2.7 CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

A proliferação de células germinativas e a liberação subsequente de espermatozoides não ocorrem ao acaso. Assim, quando se examina uma secção transversal de túbulo seminífero, verifica-se que as células espermatogênicas estão organizadas de modo a formar camadas, desde a membrana basal até o lume tubular. Cada camada corresponde a uma determinada geração de células germinativas (CASTRO et al., 1997).

Associação celular ou estágio é um conjunto definido de gerações de células germinativas encontrado em um determinado ponto e momento do túbulo seminífero seccionado transversalmente (RUSSELL et al., 1990).

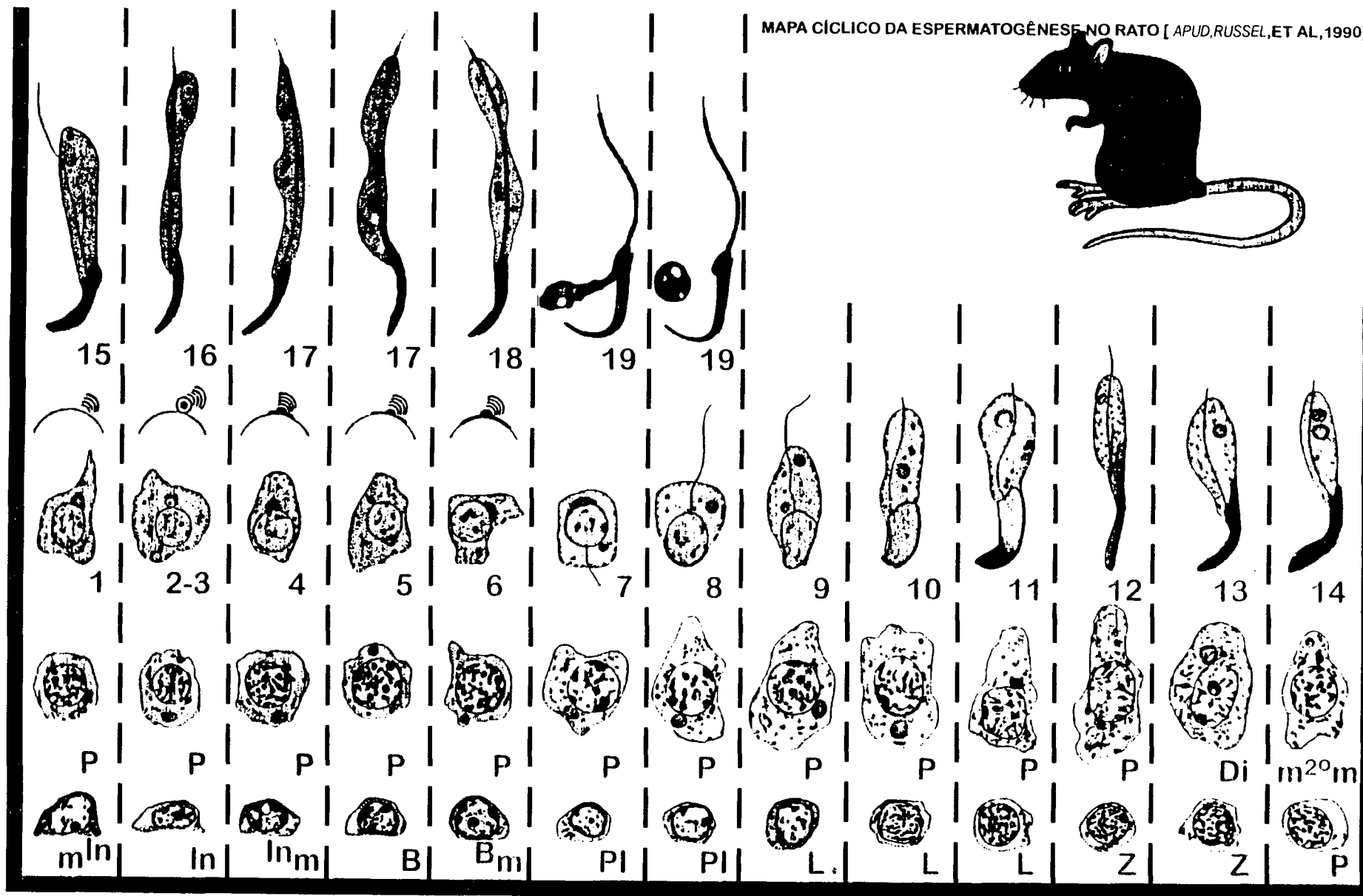
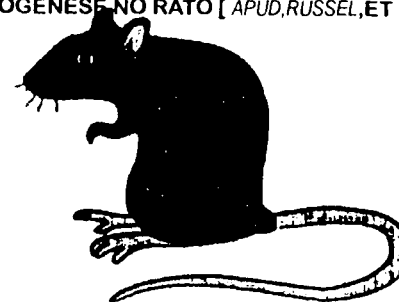
O ciclo do epitélio seminífero (CES) é formado pela série de alterações que ocorrem em determinada área do epitélio seminífero entre dois aparecimentos sucessivos de uma mesma associação celular (ORTAVANT et al., 1984).

Uma associação celular ou estágio do CES consta de uma ou duas gerações de espermatogônias junto à membrana basal, uma ou duas gerações de espermatócitos e, na borda luminal, uma ou duas gerações de espermátides. As células pertencentes a uma determinada geração, por terem sido produzidas aproximadamente ao mesmo tempo, encontram-se na mesma fase de desenvolvimento, evoluindo sincronicamente no processo espermatogênico (CLERMONT, 1972).

Segundo HOCHEREAU-De REVIERS et al. (1987), dois tipos principais de associações celulares do ciclo do epitélio seminífero podem ser distinguidos: Tipo I, com duas gerações de espermatócitos primários e uma geração única de espermátides; tipo II, com uma geração de espermatócitos primários e duas gerações de espermátides. Esses dois tipos, conforme se observa na ilustração a seguir, correspondem, respectivamente, ao estágio pré-divisional (estágios 5 a 8, pelo método da morfologia tubular) e pós-divisional (estágios 1 a 3, pelo mesmo método).

CLERMONT (1972) observou que as várias gerações de células germinativas não estão agrupadas ao acaso, mas formam associações celulares de composição fixa. As associações celulares típicas constituem os estágios do ciclo. Cada estágio representa uma subdivisão artificial de um fenômeno contínuo. Desse modo, a demarcação entre o fim de um estágio e o começo do seguinte é, freqüentemente, imprecisa.

MAPA CÍCLICO DA ESPERMATOGÊNESE NO RATÃO [APUD, RUSSEL, ET AL, 1990]



Método Acrossômico
Método da Morfologia Tubular

ESTÁGIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

2.7.1 DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

“A estimativa da duração do CES é usualmente conseguida pela marcação de células espermatogênicas em fase de síntese de DNA com timidina triciada, seguida do exame de radioautografias em intervalos diferentes após a marcação, de modo a se permitir o cálculo do tempo de progressão das células marcadas durante esse período. Considera-se concluído um ciclo quando as células marcadas mais avançadas são vistas na mesma associação celular onde ocorreu a marcação original” (CASTRO et al., 1997).

A duração do ciclo do epitélio seminífero não é constante de uma espécie para outra e entre animais de raças diferentes dentro de uma mesma espécie (RUSSEL et al., 1990): nos ratos Sherman, por exemplo, o ciclo dura 12 dias (CLERMONT et al., 1959); nos ratos Sprague-Dawley, 12,9 dias (CLERMONT e HARVEY, 1965); nos ratos Wistar, 13 dias (HUCKINS, 1965), e nos ratos Bandicoot, 10 dias (SINHAHIKIM et al., 1985).

A duração da espermatogênese completa é considerada como o tempo necessário para formar espermatozóides a partir da espermatogônia e requer entre 4,0 e 4,5 ciclos do epitélio seminífero (RUSSEL et al., 1990).

2.7.2 ESTÁGIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

A possibilidade de dividir o CES em estágios identificáveis é fundamental para investigações quantitativas sobre a espermatogênese e importante não só para a compreensão da espermatogênese normal como também para a determinação de fases específicas do processo espermatogênico que possam ser afetadas por determinado tratamento ou droga (BERNDTSON, 1977).

Dois métodos principais são utilizados para identificar os estágios do ciclo do epitélio seminífero. Um é baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico (LEBLOND e CLERMONT, 1952; CLERMONT, 1972; RUSSEL et al., 1990), enquanto outro se baseia nas transformações morfológicas dos núcleos das células germinativas, na presença de divisões meióticas e na posição das espermátides no epitélio seminífero (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; ORTAVANT et al., 1984), designado *método da morfologia tubular* por BERNDTSON e DESJARDINS

(1974). Na maioria dos mamíferos até agora estudados, têm-se dividido o CES em 8 estágios pelo método da morfologia tubular e em 10-16 estágios pelo método do sistema acrossômico (COUROT et al., 1970; CLERMONT, 1972; RUSSEL et al., 1990).

2.7.3 QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE

O estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero é essencial para o entendimento do processo espermatogênico em si, possibilitando, além disso, correlações com achados fisiológicos e bioquímicos (ROOSEN-RUNGE e GIESEL JR., 1950). Assim, além de permitir a determinação de produção espermática diária (AMANN e ALMQUIST, 1962) e do rendimento intrínseco da espermatogênese (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974; CARDOSO, 1981), a avaliação histológica quantitativa dos testículos torna também possível a verificação de normalidade ou não da espermatogênese, a observação do tipo celular que está sofrendo degeneração ou mesmo se ocorre degeneração (FRANÇA, 1991).

As razões numéricas entre espermatogônias A e os demais tipos celulares (espermatogônias intermediárias, espermatogônias B, espermatócitos primários e espermatócitos secundários e espermátides) por secção transversal de túbulo são utilizadas como meio para estimar o coeficiente de eficiência da espermatogênese. Teoricamente em cada divisão dobra o número de células, mas na prática isso dificilmente é encontrado. Assim, comparando a razão real obtida pela contagem direta de núcleos com a razão teórica esperada das divisões celulares do processo espermatogênico, pode-se determinar a eficiência da espermatogênese em qualquer ponto do ciclo (CASTRO, 1995).

A razão real é sempre menor que a razão teórica, já que essa última não leva em conta degenerações celulares ao longo dos processos de multiplicação. Perdas celulares constituem característica na espermatogênese normal de mamíferos, e seus efeitos cumulativos são realmente substanciais (COUROT et al., 1970). Por

exemplo, o rendimento real de espermátides, expresso como uma percentagem da expectativa teórica, tem sido constatado como sendo de apenas 50% ou menos no rato (CLERMONT e BUSTOS-OBREGON, 1968) e de cerca de 30-50% em touros (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974; HOCHEREAU-De REVIERS, 1976).

Nas contagens, são enumerados os núcleos de células germinativas (espermatogônias, espermátocitos primários, espermátocitos secundários e espermátides arredondadas) e nucléolos de células de Sertoli, bem como fragmentos de todos os tipos celulares, em um determinado número de túbulos seminíferos seccionados transversalmente, de contorno o mais circular possível, em cada estágio do ciclo. Os dados obtidos das contagens diretas são referidos como números brutos (CLERMONT e MONGENTALER, 1955) e devem ser corrigidos, pois os números brutos incluem não só os núcleos (ou nucléolos) inteiros, como também os fragmentos nucleares presentes na secção, de acordo com a espessura do corte histológico. Assim, quanto maior o diâmetro do núcleo de uma célula, maior será a incidência de fragmentos nucleares dessa célula em cortes de uma determinada espessura. Portanto, embora células de diferentes tipos possam estar presentes em números iguais, seus números brutos poderão diferir, devido a diferenças em seus diâmetros nucleares (CASTRO, 1995). Com o propósito de corrigir essa distorção, ABERCROMBIE (1946) introduziu a seguinte fórmula para converter números brutos em “números reais” (i.e., núcleos inteiros ou equivalentes nucleolares).

$$\text{CONTAGEM REAL} = \text{CONTAGEM BRUTA} \times \frac{\text{ESPESSURA DO CORTE}}{\text{ESPESSURA DO CORTE} + \text{DIAMETRO NUCLEAR MEDIO}}$$

Essa fórmula só se aplica a estruturas esféricas e, por essa razão, contagens de núcleos de espermátides alongadas e de núcleos irregulares de células de Sertoli não podem ser corrigidas. No caso de contagens de células de Sertoli, entretanto, isso pode ser contornado substituindo o diâmetro nuclear pelo diâmetro do nucléolo, desde que este esteja visível e se apresente esférico (BERNDTSON, 1977).

O diâmetro nuclear ou nucleolar é obtido por meio de uma ocular micrométrica, a qual fornece medidas referidas como “unidades de ocular micrométrica”. A conversão dessas unidades para micrômetros é conseguida acoplando à ocular micrométrica uma régua microscópica devidamente calibrada, para cada aumento do microscópio (CASTRO, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram usados 24 ratos albinos da raça Wistar, com 75 dias de idade e peso vivo médio de 325 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas apropriadas, recebendo alimentação padronizada (ração Nuvilab® CR1) e regime de manejo normal.

3.2 PLANO EXPERIMENTAL

3.2.1 TRATAMENTOS

3.2.1.1 Animais do Tratamento I (7 dias)

O Grupo Experimental I (GE I) e o Grupo Controle I (GC I) foram sacrificados 23 dias após o início do tratamento.

O Grupo Experimental II (GE II) e o Grupo Controle II (GC II) foram sacrificados 50 dias após o início do tratamento.

3.2.1.2 Animais do Tratamento II (54 dias)

O Grupo Experimental III (GE III) e o Grupo Controle III (GC III) foram sacrificados um dia após o término do tratamento.

As aplicações de DMSO foram realizadas com uso de luvas de borracha, fazendo-se movimentos de fricção até alcançar a sensação de calor característica.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, cujo plano se encontra resumido conforme segue:

<p align="center">PERÍODO PRELIMINAR</p> <p align="center">(1 semana)</p>	<p align="center">PERÍODO EXPERIMENTAL</p> <p align="center">Tratamento I</p> <p align="center">(7 dias)</p>	<p align="center">PERÍODO EXPERIMENTAL</p> <p align="center">Tratamento II</p> <p align="center">(54 dias)</p>
<p>Adaptação individual.</p>	<p align="center">Grupos Experimentais (GE I e GE II)</p> <p align="center">(10 animais)</p> <p>Aplicação de 1,0 g/kg de peso vivo de DMSO¹ friccionado na pele da região do jarrete.</p> <p>Aplicação 2 vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos.</p>	<p align="center">Grupo Experimental (GE III)</p> <p align="center">(7 animais)</p> <p>Aplicação de 1,0 g/kg de peso vivo de DMSO¹ friccionado na pele do escroto.</p> <p>Aplicação 2 vezes ao dia, durante 54 dias consecutivos.</p>
<p>Avaliação dos padrões normais de saúde.</p> <p>Divisão aleatória dos animais em Grupos Experimentais (GE) e Grupo Controle (GT).</p>	<p align="center">Grupos Controles (GC I e GC II)</p> <p align="center">(4 animais)</p> <p>Aplicação de solução salina embebida em algodão e friccionada na pele da região do jarrete.</p>	<p align="center">Grupo Controle (GC III)</p> <p align="center">(3 animais)</p> <p>Aplicação de solução salina embebida em algodão e friccionada na pele do escroto.</p>

¹ Dimesol Gel®(Laboratório Marcolab).

3.2.2 AVALIAÇÃO DOS GRUPOS

GRUPOS DO TRATAMENTO I. Foi feita avaliação dos efeitos da droga aos 23 dias (período equivalente à metade da duração completa da espermatogênese) e aos 50 dias (período equivalente ao final da duração completa da espermatogênese).

GRUPOS DO TRATAMENTO II. Foi feita avaliação dos efeitos da droga durante o tempo equivalente à duração completa da espermatogênese.

3.3 COLHEITA E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO MATERIAL

Todos os animais foram anestesiados com éter, e mediante incisão mediana ao longo do eixo longitudinal do escroto colheram-se os testículos. De cada animal colheu-se um testículo — alternando-se direito e esquerdo —, que foram em seguida seccionados transversalmente e colocados em líquido de Bouin. Após essa pré-fixação, procedeu-se ao corte de fragmentos do parênquima de aproximadamente 2 mm de diâmetro. Após fixação por 3 horas no líquido de Bouin, os fragmentos foram colocados em um recipiente contendo formol a 10% (aldeído fórmico), onde permaneceram por 24 horas. Depois de desidratados pela passagem em álcoois de concentrações crescentes e diafanizados em xilol, foram incluídos em parafina, segundo a técnica rotineira (MICHALANY, 1980). Procedeu-se então a microtomia, obtendo-se cortes com 4 μ m de espessura, os quais foram corados por hematoxilina de Harris + eosina alcoólica e montados com Entellan[®] (Merck).

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS

3.4.1 ESTÁGIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO (CES)

O CES foi estudado segundo o método da morfologia tubular, utilizando-se como critérios a morfologia nuclear das células espermáticas, a presença de divisões meióticas e a posição das espermátides no epitélio seminífero (ROOSEN-RUNGE e GIESEL JR., 1950; ORTAVANT et al., 1984). São classificados, segundo ORTAVANT et al. (1984), em:

ESTÁGIO 1: Estende-se do final da liberação dos espermatozóides no lume do túbulo seminífero até o início do alongamento dos núcleos das espermatídes. Caracteriza-se pela presença de espermatídes somente com núcleo arredondado.

ESTÁGIO 2: Estende-se do início do processo de alongamento dos núcleos das espermatídes até o início do agrupamento das espermatídes alongadas em feixes. Esta é a fase de alongamento dos núcleos das espermatídes.

ESTÁGIO 3: Estende-se da formação dos primeiros feixes de espermatídes alongadas no citoplasma da célula de Sertoli até as primeiras divisões meióticas.

ESTÁGIO 4: Estende-se do início das primeiras divisões até o final das segundas divisões meióticas.

ESTÁGIO 5: Estende-se do final das últimas divisões meióticas até o aparecimento de cromatina de aspecto finamente granular nos núcleos das espermatídes jovens. Durante este estágio as espermatídes têm núcleos pequenos que contêm alguns cariossomos conectados por rede cromatínica.

ESTÁGIO 6: Estende-se do aparecimento da cromatina de aspecto finamente granular nas espermatídes jovens até o início da migração dos feixes de espermatídes alongadas em direção ao lume do túbulo seminífero.

ESTÁGIO 7: Estende-se do princípio ao fim da migração centrípeta das espermatídes alongadas em direção ao lume.

ESTÁGIO 8: Estende-se do final da migração das espermatídes até sua completa liberação como espermatozóides no lume (Paliçada).

Os estágios 1 a 3 caracterizam-se pela presença de uma só geração de espermatídes, e os estágios 5 a 8, por duas gerações de espermatídes (estágios pós-divisionais).

3.4.2 DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido a partir de medidas do diâmetro de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, em cada testículo. As secções transversais, escolhidas em varredura horizontal, que apresentavam

contorno o mais circular possível. As medidas foram feitas com microscópio Leitz® Dialuz 22, com ocular micrométrica 10X, acoplada a objetiva de 16 X.

3.4.3 PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS DOS COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR

As proporções volumétricas dos componentes testiculares foram obtidas através de método estereométrico, segundo ELLIAS et al. (1971), utilizando-se ocular integradora Zeiss® kpl, 8X, dotada de grátula com 10 linhas horizontais e 100 pontos equidistantes, acoplada a objetiva de 45X. Dez campos foram registrados em cada um dos testículos, escolhidos mediante varredura horizontal de cortes corados pela hematoxilina-eosina. As proporções volumétricas, expressas em percentagem, foram calculadas sobre um total de 1.000 pontos por testículo, 1.000 por animal e 24.000 nos 24 animais. Tem como objetivo avaliar a proporção (%) de túbulo seminífero e de tecido intersticial. Os componentes testiculares registrados foram: túbulo seminífero (túnica própria + epitélio seminífero + lume tubular) e tecido intersticial (células intersticiais de Leydig e estroma — incluindo células e fibras do conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos).

3.4.4 CONTAGEM DOS ELEMENTOS CELULARES DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

A contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero foi feita em 10 secções transversais que continham um mesmo estágio do ciclo do epitélio seminífero (CES), de contorno o mais circular possível em cada testículo.

Os elementos celulares pertencentes à linhagem espermatogênica e as células de Sertoli foram identificados pelo exame de seus núcleos. Os seguintes tipos celulares foram contados:

- espermátides arredondadas, nos estágios pós-divisionais (de 5 a 8) do CES;
- espermátocito I, na fase de paquíteno, no estágio 3 do CES;
- células de Sertoli, no estágio 3 do CES.

Todos os números celulares encontrados, exceto os números de células de Sertoli, foram corrigidos, em cada testículo, para o diâmetro nuclear e para a espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de ABERCROMBIE (1946):

$$\text{NUMERO CORRIGIDO} = \text{CONTAGEM OBTIDA} \times \frac{\text{ESPESSURA DO CORTE}}{\text{ESPESSURA DO CORTE} + \text{DIAMETRO NUCLEAR MEDIO}}$$

O diâmetro nuclear médio foi obtido pela média das medidas do diâmetro de dez núcleos do tipo celular contado, em cada testículo. Os diâmetros nucleares foram medidos com microscópio Leitz® Dialuz 22, com ocular micrométrica 10X, acoplada a objetiva de 40X.

3.4.5 RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE

Com a finalidade de avaliar o rendimento intrínseco da espermatogênese, foram calculadas razões entre espermatócitos primários em paquíteno no estágio 3 do CES e espermátides arredondadas nos estágios pós-divisionais (5 a 8) do CES.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram efetuados os cálculos de média aritmética e desvio padrão (\pm DP) para os parâmetros *número de células espermatogênicas* (espermatócito primário em fase de paquíteno, espermátide arredondada e células de Sertoli), *diâmetro dos túbulos seminíferos* e *proporção volumétrica*, com o *software* Sigmastat (Jandel Scientific, Co.). Para comparação de Grupos Experimentais e Controles, utilizou-se o teste “t” de Student e análise de variância para detectar diferenças entre tratamentos. O teste de Dunnet foi empregado para isolar os grupos que apresentavam diferenças significativas.

4 RESULTADOS

4.1 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA ENTRE OS COMPONENTES DO TESTÍCULO

4.1.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Os valores médios encontrados para a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos estão expostos na tabela 1. Conforme evidenciado, as proporções do túbulo seminífero (túnica própria + epitélio seminífero + lume tubular) apresentaram média geral de $83,9 \pm 1,01\%$ para o Grupo Experimental e de $82,75 \pm 0,50\%$ para o Grupo Controle. A proporção de tecido intersticial (células intersticiais de Leydig e estroma) apresentou média geral de $16,1 \pm 1,01\%$ para o Grupo Experimental e de $17,25 \pm 0,50\%$ para o Grupo Controle. Não se constatou diferença significativa nos valores médios obtidos entre o Grupo Experimental e o Controle.

4.1.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Na tabela 2 são apresentadas as médias encontradas para a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos dos animais experimentais ($82,78 \pm 1,59\%$) e dos animais controles ($83,42 \pm 1,52\%$) e as médias para a proporção volumétrica de tecido intersticial dos animais experimentais ($17,22 \pm 1,59\%$) e dos animais controles ($15,72 \pm 1,52\%$). As variações observadas entre os dois grupos não são estatisticamente significativas.

4.1.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

As médias das proporções volumétricas estão discriminadas na tabela 3. Aí se verifica que a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos para os animais do Grupo Experimental apresentou média geral de $83,27 \pm 0,54\%$ e para os animais do Grupo Controle, de $83,03 \pm 0,80\%$. A proporção volumétrica de tecido intersticial foi de $16,73 \pm 0,54\%$ e $16,97 \pm 0,80\%$ para os animais do Grupo Experimental e do Grupo Controle, respectivamente. Não se constatou variação significativa nos valores médios obtidos entre o Grupo Experimental e o Controle.

4.2 DIÂMETRO DE TÚBULOS SEMINÍFEROS

4.2.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Os valores médios encontrados para o diâmetro dos túbulos seminíferos entre o Grupo Experimental e o Controle estão expostos na tabela 4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a média geral nos diâmetros dos túbulos seminíferos observados nos testículos dos animais tratados ($285,50 \pm 11,82 \mu\text{m}$) e dos animais controles ($277,67 \pm 4,77 \mu\text{m}$).

4.2.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Na tabela 5 são apresentados os dados sobre os valores médios obtidos para o diâmetro dos túbulos seminíferos entre o Grupo Experimental e o Controle. Conforme evidenciado pelo teste "t", diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada na média geral para diâmetro dos túbulos seminíferos entre os animais do Grupo Experimental ($277,81 \pm 4,23 \mu\text{m}$) e os animais do Grupo Controle ($286,64 \pm 1,78 \mu\text{m}$).

Pode-se observar que o diâmetro tubular médio apresenta valores menores para os animais tratados em relação aos valores observados nos animais controles.

4.2.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

Na tabela 6 encontram-se os valores médios para o diâmetro dos túbulos seminíferos do Grupo Experimental ($281,57 \pm 2,53 \mu\text{m}$) e do Grupo Controle ($282,75 \pm 6,40 \mu\text{m}$). Conforme os dados contidos nessa tabela, verifica-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média geral dos diâmetros dos túbulos seminíferos dos animais tratados e dos animais controles.

4.3 POPULAÇÃO CELULAR DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

A evolução dos números corrigidos de células por secção transversal de túbulo seminífero encontrados nos Tratamentos I e II está ilustrada no gráfico na página 36.

4.3.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Na tabela 7 estão os números médios corrigidos de células espermatogênicas e de células de Sertoli observados em 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal. Esses resultados refletem contagens realizadas no testículo dos 7 animais estudados.

A média geral obtida para espermatócito primário em paquíteno no estágio 3 do CES do Grupo Experimental ($21,37 \pm 0,92$) não diferiu significativamente do Grupo Controle ($22,02 \pm 1,55$). Da mesma forma a média geral verificada para espermátide arredondada nos estágios pós-divisionais do CES do Grupo Experimental ($67,46 \pm 2,69$) não apresentou variação significativa daquela observada no Grupo Controle ($69,82 \pm 2,42$). O valor médio geral obtido para as células de Sertoli no estágio 3 do CES não apresentou diferença significativa entre os dois grupos estudados, sendo de $19,60 \pm 0,79$ e $20,05 \pm 0,21$ para os Grupos Experimental e Controle, respectivamente.

4.3.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Na tabela 8 são apresentados os valores médios corrigidos de células espermatogênicas e de células de Sertoli observados em 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal.

A média geral obtida para espermátócito primário em paquíteno no estágio 3 do CES do Grupo Experimental ($20,44 \pm 0,69$) apresentou-se ligeira porém significativamente maior do que a obtida para o Grupo Controle ($18,98 \pm 0,48$). O mesmo ocorreu com o número de células de Sertoli, em que o Grupo Experimental obteve média geral de $19,84 \pm 0,74$ e o Grupo Controle, de $18,25 \pm 0,21$. Já a média geral de espermátide arredondada nos estágios pós-divisionais não diferiu significativamente, pois os valores observados foram de $70,26 \pm 1,93$ e $69,29 \pm 0,05$ para o Grupo Experimental e Controle, respectivamente.

4.3.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

Na tabela 9 acham-se discriminados os valores médios corrigidos referentes às células espermatogênicas e as células de Sertoli observados em 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal. Esses resultados refletem contagens realizadas no testículo dos 10 animais estudados.

A média geral obtida para espermátócito primário em paquíteno no estágio 3 do CES foi de $22,32 \pm 0,62$ para o Grupo Experimental e de $22,21 \pm 1,09$ para o Grupo Controle. As diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas. Da mesma forma, não alcançaram significância estatística as variações entre as médias gerais obtidas para espermátide arredondada nos estágios pós-divisionais e células de Sertoli no estágio 3 do Grupo Experimental, em relação ao Grupo Controle.

4.4 RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE

4.4.1 ANIMAIS SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Uma maneira de avaliar o rendimento intrínseco da espermatogênese, considerado independentemente do tamanho dos testículos, consiste em converter os números celulares observados em razões (FRANÇA, 1991).

Na tabela 10 observa-se o coeficiente de eficiência no rendimento meiótico, expresso pela razão entre o número de espermatócitos primários em paquíteno e o número de espermátides arredondadas.

A razão de 1:3,1 (média geral) para o Grupo Experimental, que correspondeu a 79,09% do número teórico esperado de espermátides a partir de cada espermatócito primário, não diferiu significativamente da razão de 1:3,1 (média geral) do Grupo Controle, que correspondeu a 79,57% do número teórico esperado de espermátides a partir de cada espermatócito primário.

4.4.2 ANIMAIS SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Como pode ser visto na tabela 11, de cada espermatócito primário em paquíteno presente no estágio 3 do CES resultaram 3,4 (média geral) espermátides arredondadas nos estágios pós-divisionais no Grupo Experimental e 3,6 (média geral) no Grupo Controle. Conforme evidenciado pelo teste “t”, diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre os dois grupos. Considerando que a razão de 3,4 do Grupo Experimental corresponde a 85,92% do número teórico esperado de espermátides a partir de cada espermatócito primário, e que a razão de 3,6 do Grupo Controle corresponde a 91,29% do número esperado de espermátides a partir de cada espermatócito primário, verificou-se que a produção foi maior no Grupo Controle.

4.4.3 ANIMAIS SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

Conforme se observa na tabela 12, o coeficiente de eficiência no rendimento meiótico (razão SPTIPQ:SPD Ar) do Grupo Experimental foi de 3,2 (média geral) e também de 3,2 (média geral) o do Grupo Controle, o que correspondeu a 80,32% e 80,02% do número teórico esperado de espermátide a partir de cada espermatócito primário para cada grupo respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as razões observadas para os animais do Grupo Experimental e do Grupo Controle.

TABELA 1. PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) DOS COMPONENTES DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR CONTROLES E TRATADOS COM DMSO, SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

ANIMAL	COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR (%)	
	TS*	TI**
<i>GRUPO EXPERIMENTAL I</i>		
1	82,2±4,34	16,8±4,34
2	84,9±4,35	15,1±4,35
3	82,5±4,03	17,5±4,03
4	84,0±5,01	16,0±5,01
5	84,7±3,62	15,3±3,62
Média±Desvio Padrão	83,9±1,01	16,1±1,01
<i>GRUPO CONTROLE I</i>		
1	83,1±1,98	16,9±1,98
2	82,4±1,70	17,6±1,68
Média±Desvio Padrão	82,75±0,50	17,25±0,50

* TS refere-se a pontos no túbulo seminífero (túnica própria + epitélio seminífero + lume tubular).

** TI refere-se a pontos no tecido intersticial (células de Leydig + estroma).

TABELA 2. PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) DOS COMPONENTES DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR CONTROLES E TRATADOS COM DMSO GEL, SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

ANIMAL	COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR (%)	
	TS*	TI**
<i>GRUPO EXPERIMENTAL II</i>		
6	83,10±3,31	16,90±3,31
7	80,40±3,37	19,60±3,37
8	83,90±2,18	16,10±2,18
9	82,10±4,88	17,90±4,88
10	84,40±4,35	15,60±4,35
Média±Desvio Padrão	82,78±1,59	17,22±1,59
<i>GRUPO CONTROLE II</i>		
3	82,35±0,78	15,95±0,78
4	84,50±0,42	15,50±0,42
Média±Desvio Padrão	83,42±1,52	15,72±1,52

* TS refere-se a pontos no túbulo seminífero (túnica própria + epitélio seminífero + lume tubular).

** TI refere-se a pontos no tecido intersticial (células de Leydig + estroma).

TABELA 3. PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) DOS COMPONENTES DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR CONTROLES E TRATADOS COM DMSO GEL, SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

ANIMAL	COMPONENTES DO PARÊNQUIMA TESTICULAR (%)	
	TS*	TI**
<i>GRUPO EXPERIMENTAL III</i>		
1	83,40±4,11	16,60±4,11
2	82,30±3,40	17,70±3,40
3	83,90±5,89	16,10±5,89
4	82,90±3,87	17,10±3,87
5	83,30±3,62	16,70±3,62
6	83,30±4,37	16,70±4,37
7	83,80±2,93	16,20±2,93
Média±Desvio Padrão	83,27±0,54	16,73±0,54
<i>GRUPO CONTROLE III</i>		
1	83,80±3,39	16,20±3,39
2	82,20±2,74	17,80±2,74
3	83,10±4,25	16,90±4,25
Média±Desvio Padrão	83,03±0,80	16,97±0,80

* TS refere-se a pontos no túbulo seminífero (túnica própria + epitélio seminífero + lume tubular).

** TI refere-se a pontos no tecido intersticial (células de Leydig + estroma).

TABELA 4. DIÂMETRO (MÉDIA + DESVIO PADRÃO) DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Animal	Diâmetro Tubular* (µm)
<i>GRUPO EXPERIMENTAL I</i>	
1	287,25±21,48
2	286,89±14,23
3	302,22±18,70
4	269,37±16,39
5	281,78±17,62
Média±Desvio Padrão	285,50±11,82
<i>GRUPO CONTROLE I</i>	
1	281,05±1,55
2	274,29±0,25
Média±Desvio Padrão	277,67±4,77

* Valores médios de 40 secções transversais de túbulo seminífero por animal (total: 280 secções transversais).

TABELA 5. DIÂMETRO (MÉDIA + DESVIO PADRÃO) DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Animal	Diâmetro Tubular (μM)
<i>GRUPO EXPERIMENTAL II</i>	
6	279,20 \pm 15,32
7	275,21 \pm 14,23
8	282,61 \pm 17,97
9	280,13 \pm 20,27
10	271,92 \pm 12,27
Média \pm Desvio Padrão	277,81 ^a \pm 4,23
<i>GRUPO CONTROLE II</i>	
3	285,38 \pm 7,15
4	287,90 \pm 10,21
Média \pm Desvio Padrão	286,64 ^b \pm 1,78

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ($p \leq 0,05$).

TABELA 6. DIÂMETRO (MÉDIA + DESVIO PADRÃO) DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

Animal	Diâmetro Tubular (μM)
<i>GRUPO EXPERIMENTAL III</i>	
1	285,79 \pm 12,59
2	284,33 \pm 15,79
3	278,86 \pm 12,44
4	280,32 \pm 13,89
5	281,41 \pm 10,71
6	280,32 \pm 13,68
7	279,95 \pm 11,66
Média \pm Desvio Padrão	281,57 \pm 2,53
<i>GRUPO CONTROLE III</i>	
1	289,44 \pm 14,46
2	276,67 \pm 11,81
3	282,14 \pm 10,92
Média \pm Desvio Padrão	282,75 \pm 6,40

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ($p \leq 0,05$).

TABELA 7. NÚMERO¹ DE CÉLULAS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) POR SECÇÃO TRANSVERSAL² DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Animal	Espermatócito I (Paquíteno) ³	Espermátide Arredondada ⁴	Células de Sertoli ³
<i>GRUPO EXPERIMENTAL I</i>			
1	21,34±1,48	64,20±4,25	19,40±2,67
2	22,70±2,62	66,15±4,50	19,10±2,92
3	21,69±2,65	66,48±7,43	19,30±3,12
4	20,23±2,41	69,83±5,33	21,00±2,78
5	20,90±2,96	70,64±5,75	19,20±2,48
Média±Desvio Padrão	21,37±0,92	67,46±2,69	19,60±0,79
<i>GRUPO CONTROLE I</i>			
3	23,12±1,90	68,11±2,01	20,20±1,41
4	20,92±0,02	71,54±2,43	19,90± 0,42
Média±Desvio Padrão	22,02±1,55	69,82±2,42	20,05±0,21

¹ Números corrigidos, exceto os de células de Sertoli, segundo ABERCROMBIE (1946).

² Contagem dos elementos celulares realizada em 30 secções transversais de túbulos seminíferos, por animal.

³ Contagem dos elementos celulares realizada no estágio 3 do ciclo do epitélio seminífero.

⁴ Contagem dos elementos celulares realizada nos estágios pós-divisionais do ciclo do epitélio seminífero.

TABELA 8. NÚMERO¹ DE CÉLULAS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) POR SECÇÃO TRANSVERSAL² DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

Animal	Espermatócito I (Paquíteno) ³	Espermátide Arredondada ⁴	Células de Sertoli ³
<i>GRUPO EXPERIMENTAL II</i>			
6	20,15±1,88	69,99±3,35	19,60±3,09
7	19,80±1,67	67,79±2,51	19,50±2,87
8	20,16±2,13	69,58±3,66	20,70±1,56
9	21,60±2,73	73,09±5,86	20,50±3,44
10	20,52±2,66	70,85±4,76	18,90±3,34
Média±Desvio Padrão	20,44 ^a ±0,69	70,26±1,93	19,84 ^a ±0,74
<i>GRUPO CONTROLE II</i>			
3	19,32±0,79	69,25±4,45	18,10±0,84
4	18,64±0,16	69,33±1,26	18,40± 0,56
Média±Desvio Padrão	18,98 ^b ±0,48	69,29±0,05	18,25 ^b ±0,21

¹ Números corrigidos, exceto os de células de Sertoli, segundo ABERCROMBIE (1946).

² Contagem dos elementos celulares realizada em 30 secções transversais de túbulos seminíferos, por animal.

³ Contagem dos elementos celulares realizada no estágio 3 do ciclo do epitélio seminífero.

⁴ Contagem dos elementos celulares realizada nos estágios pós-divisionais do ciclo do epitélio seminífero.

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ($p \leq 0,05$).

TABELA 9. NÚMERO¹ DE CÉLULAS (MÉDIA±DESVIO PADRÃO) POR SECÇÃO TRANSVERSAL² DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATOS WISTAR SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

Animal	Espermatócito I (Paquíteno)³	Espermátide Arredondada⁴	Células de Sertoli³
<i>GRUPO EXPERIMENTAL III</i>			
1	21,63±2,35	70,48±8,71	18,90±3,87
2	22,92±3,05	75,75±6,55	22,60±2,59
3	22,70±1,93	72,15±8,68	18,80±2,74
4	21,88±3,20	71,75±3,89	20,10±2,42
5	21,53±3,09	68,81±7,71	20,40±2,41
6	22,57±1,48	72,93±10,46	20,90±1,66
7	23,01±1,77	70,03±6,02	18,70±2,90
Média±Desvio Padrão	22,32±0,62	71,70±2,26	20,06±2,42
<i>GRUPO CONTROLE III</i>			
1	22,03±2,52	72,56±4,08	18,80±2,85
2	21,22±1,08	68,89±6,36	18,00± 2,05
3	23,38±0,87	71,62±3,46	20,00±1,94
Média±Desvio Padrão	22,21±1,09	71,02±1,90	18,93±1,00

¹ Números corrigidos, exceto os de células de Sertoli, segundo ABERCROMBIE (1946).

² Contagem dos elementos celulares realizada em 30 secções transversais de túbulos seminíferos, por animal.

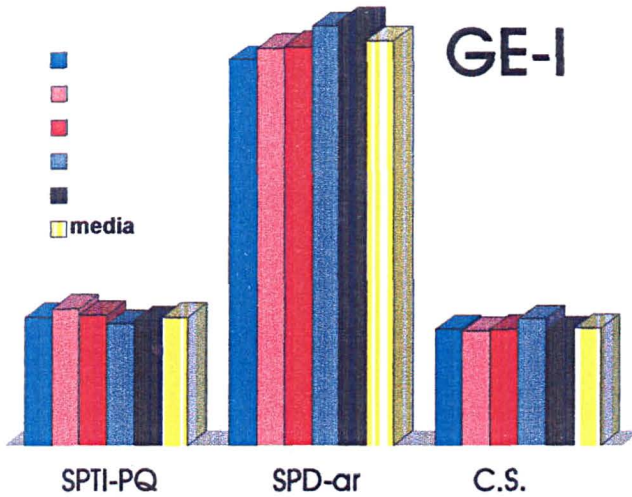
³ Contagem dos elementos celulares realizada no estágio 3 do ciclo do epitélio seminífero.

⁴ Contagem dos elementos celulares realizada nos estágios pós-divisionais do ciclo do epitélio seminífero.

POPULAÇÃO CELULAR POR SEÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO gel

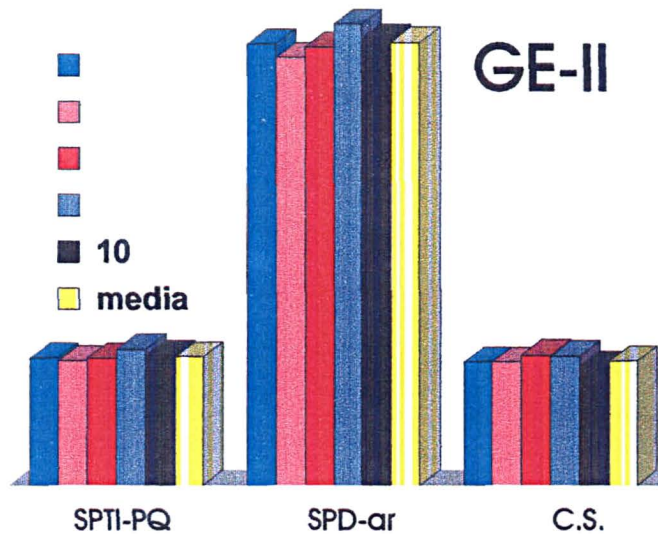
GE-I MÉDIA SPTI= 21.37
SPD= 67.46
C.S= 19.60

GC-I MÉDIA SPTI= 22.02
SPD= 69.82
C.S= 20.05



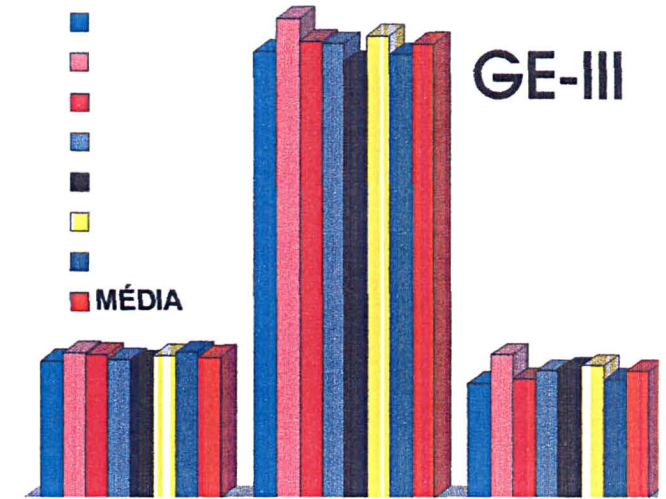
GE-II MÉDIA SPTI= 20.44
SPD= 70.26
C.S= 19.84

GC-II MÉDIA SPTI= 18.98
SPD= 69.29
C.S= 18.25

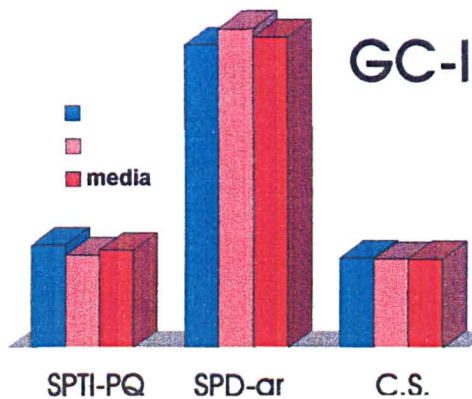


GE-III MÉDIA SPTI= 22.32
SPD= 71.70
C.S= 20.06

GC-III MÉDIA SPTI= 22.21
SPD= 71.02
C.S= 18.93



TRATAMENTO I



TRATAMENTO II

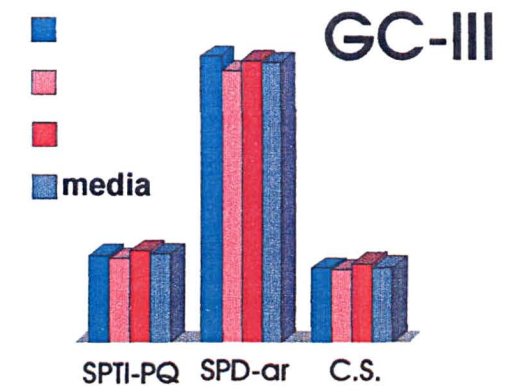
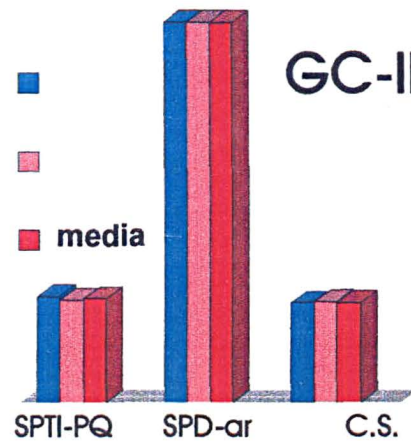


TABELA 10. RAZÃO* ENTRE O NÚMERO CORRIGIDO DE ESPERMATÓCITO I EM PAQUÍTENO E ESPERMÁTIDE ARREDONDADA, EM RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

ANIMAL	RAZÃO
<i>GRUPO EXPERIMENTAL I</i>	
1	1:3,0
2	1:2,9
3	1:3,0
4	1:3,4
5	1:3,3
Média	1:3,1
<i>GRUPO CONTROLE I</i>	
1	1:2,9
2	1:3,4
Média	1:3,1

* Número de espermátides observadas dividido pelo número esperado.

TABELA 11. RAZÃO* ENTRE O NÚMERO CORRIGIDO DE ESPERMATÓCITO I EM PAQUÍTENO E ESPERMÁTIDE ARREDONDADA, EM RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

ANIMAL	RAZÃO
<i>GRUPO EXPERIMENTAL II</i>	
1	1:3,4
2	1:3,4
3	1:3,4
4	1:3,3
5	1:3,4
Média	1:3,4 ^a
<i>GRUPO CONTROLE II</i>	
1	1:3,5
2	1:3,7
Média	1:3,6 ^b

* Número de espermátides observadas dividido pelo número esperado.

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ($p \leq 0,05$).

TABELA 12. RAZÃO ENTRE O NÚMERO CORRIGIDO DE ESPERMATÓCITO I EM PAQUÍTENOS E ESPERMÁTIDES ARREDONDADA, EM RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

ANIMAL	RAZÃO
<i>GRUPO EXPERIMENTAL III</i>	
1	1:3,2
2	1:3,3
3	1:3,1
4	1:3,2
5	1:3,2
6	1:3,2
7	1:3,0
Média	1:3,2
<i>GRUPO CONTROLE III</i>	
1	1:3,3
2	1:3,2
3	1:3,0
Média	1:3,2

* Número de espermátides observadas dividido pelo número esperado.

TABELA 13. DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

PARÂMETRO	GRUPO EXPERIMENTAL (Média±Desvio Padrão)	GRUPO CONTROLE (Média±Desvio Padrão)
Proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (%)	83,90±1,01	82,75±0,50
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	285,50±11,82	277,67±4,77
Número corrigido* de células espermatogênicas/secção transversal de túbulo seminífero:		
- SPTI PQ	21,37±0,92	22,02±1,55
- SPD-ar	67,46±2,69	69,82±2,42
- células de Sertoli	19,60±0,79	20,05±0,21

* Correção segundo ABERCROMBIE (1946).

TABELA 14. DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I

PARÂMETRO	GRUPO EXPERIMENTAL (Média±Desvio Padrão)	GRUPO CONTROLE (Média±Desvio Padrão)
Proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (%)	82,78±1,59	83,42±1,52
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	277,81±4,23 ^b	286,64±1,78 ^a
Número corrigido* de células espermatogênicas/secção transversal de túbulo seminífero:		
- SPTI PQ	20,44±0,69 ^b	18,98±0,48 ^a
- SPD-ar	70,26±1,93	69,30±0,05
- células de Sertoli	19,84±0,74 ^b	18,25±0,21 ^a

* Correção segundo ABERCROMBIE (1946).

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam significância ($p \leq 0,05$).

TABELA 15. DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II

PARÂMETRO	GRUPO EXPERIMENTAL (Média±Desvio Padrão)	GRUPO CONTROLE (Média±Desvio Padrão)
Proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (%)	83,27±0,54	83,03±0,80
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	281,57±2,53	282,75±6,40
Número corrigido* de células espermatogênicas/secção transversal de túbulo seminífero:		
- SPTI PQ	22,32±0,62	22,21±1,09
- SPD-ar	71,70±2,26	71,02±1,90
- células de Sertoli	20,06±1,42	18,93±1,00

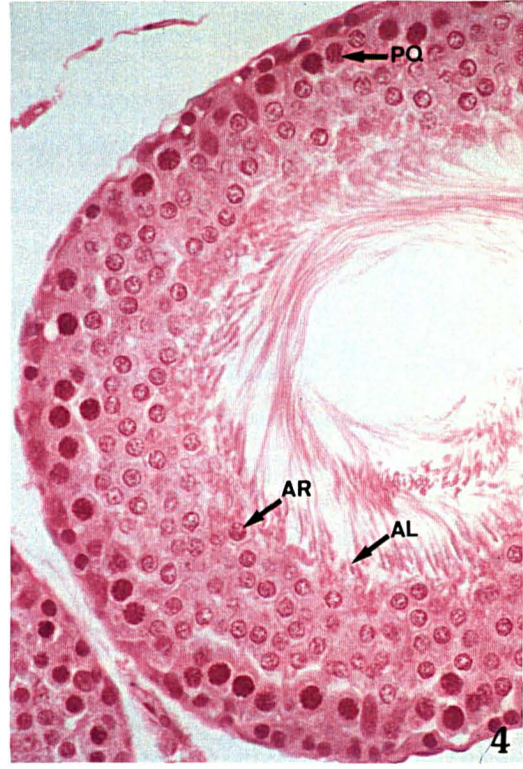
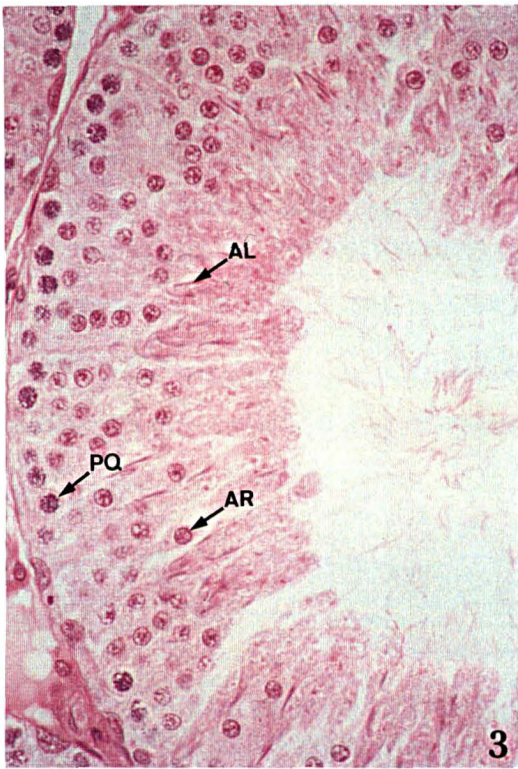
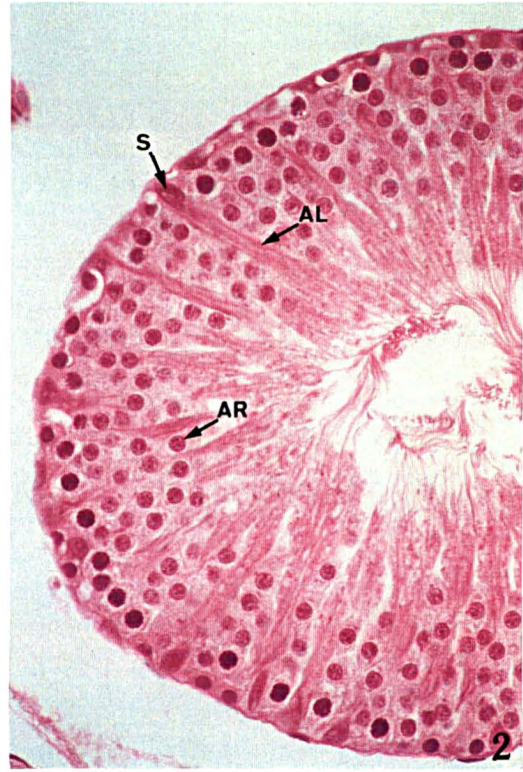
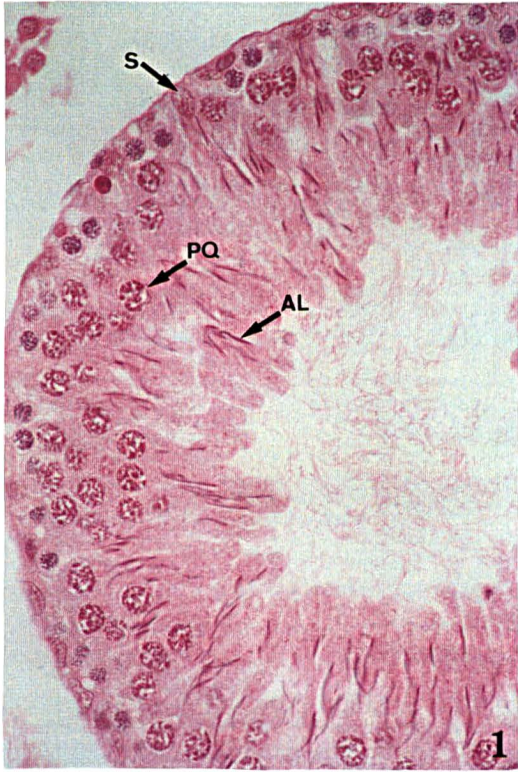
* Correção segundo ABERCROMBIE (1946).

FIGURA 1. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 3 DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO (CES). OBSERVAM-SE ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO (PQ), ESPERMÁTIDES ALONGADAS AGRUPADAS EM FEIXES (AL) E CÉLULAS DE SERTOLI (S). H.E., 40X.

FIGURA 2. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NOS ESTÁGIOS 5/6 DO CES. SÃO OBSERVADOS ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS (AR), FEIXES DE ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL) PROFUNDAMENTE LOCALIZADOS NO EPITÉLIO, PRÓXIMOS A NÚCLEOS DE CÉLULAS DE SERTOLI (S). H.E., 40X.

FIGURA 3. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 7 DO CES. EVIDENCIAM-SE ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO (PQ), ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS (AR) E ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL) CHEGANDO À BORDA LUMINAL. H.E., 40X.

FIGURA 4. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 8 DO CES. VÊEM-SE ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO (PQ), ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS (AR), ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL) ANCORADAS NA BORDA LUMINAL. H.E., 40X.



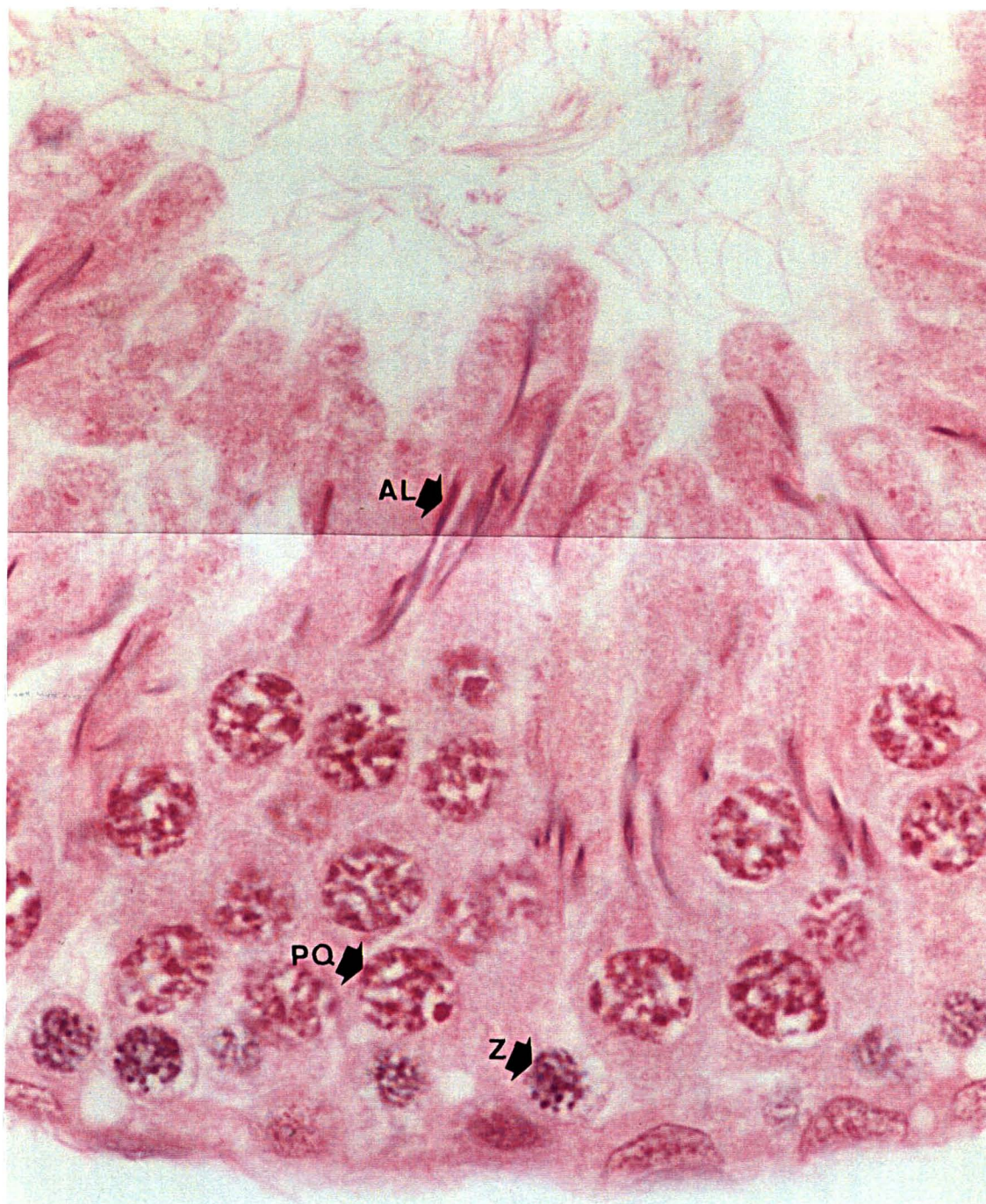


FIGURA 5. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 3 DO CES. SÃO VISTOS ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM ZIGÓTENO (Z), ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO (PQ), ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL) EM FEIXES. H.E., 100X.

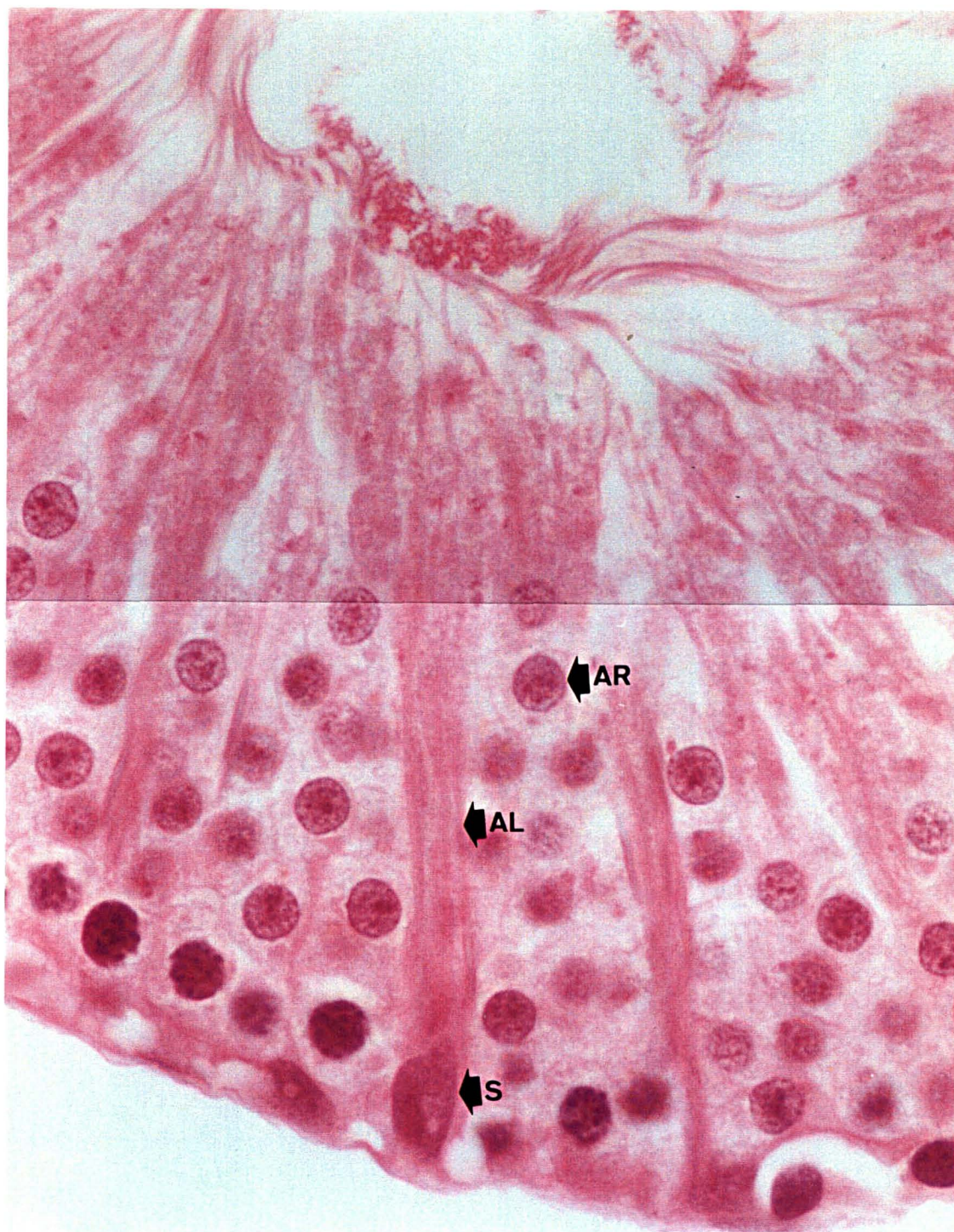


FIGURA 6. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NOS ESTÁGIOS 5/6 DO CES. SÃO OBSERVADAS ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS (AR) E FEIXES DE ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL) NO TERÇO BASAL DO EPITÉLIO, PRÓXIMOS A NÚCLEOS DE CÉLULAS DE SERTOLI (S). H.E., 100X.

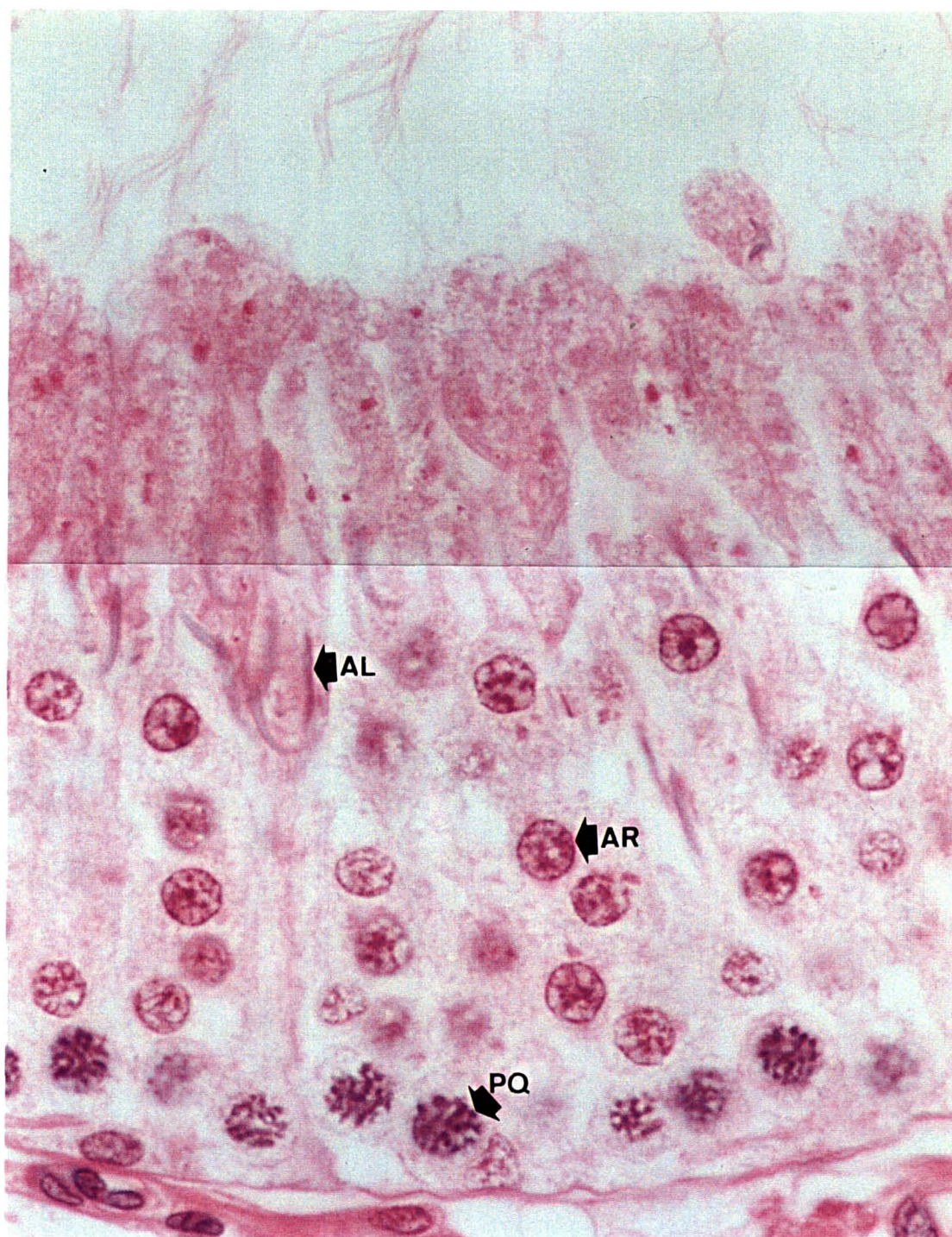


FIGURA 7. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 7 DO CES. OBSERVAM-SE ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO (PQ), ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS (AR), ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL). H.E., 100X.

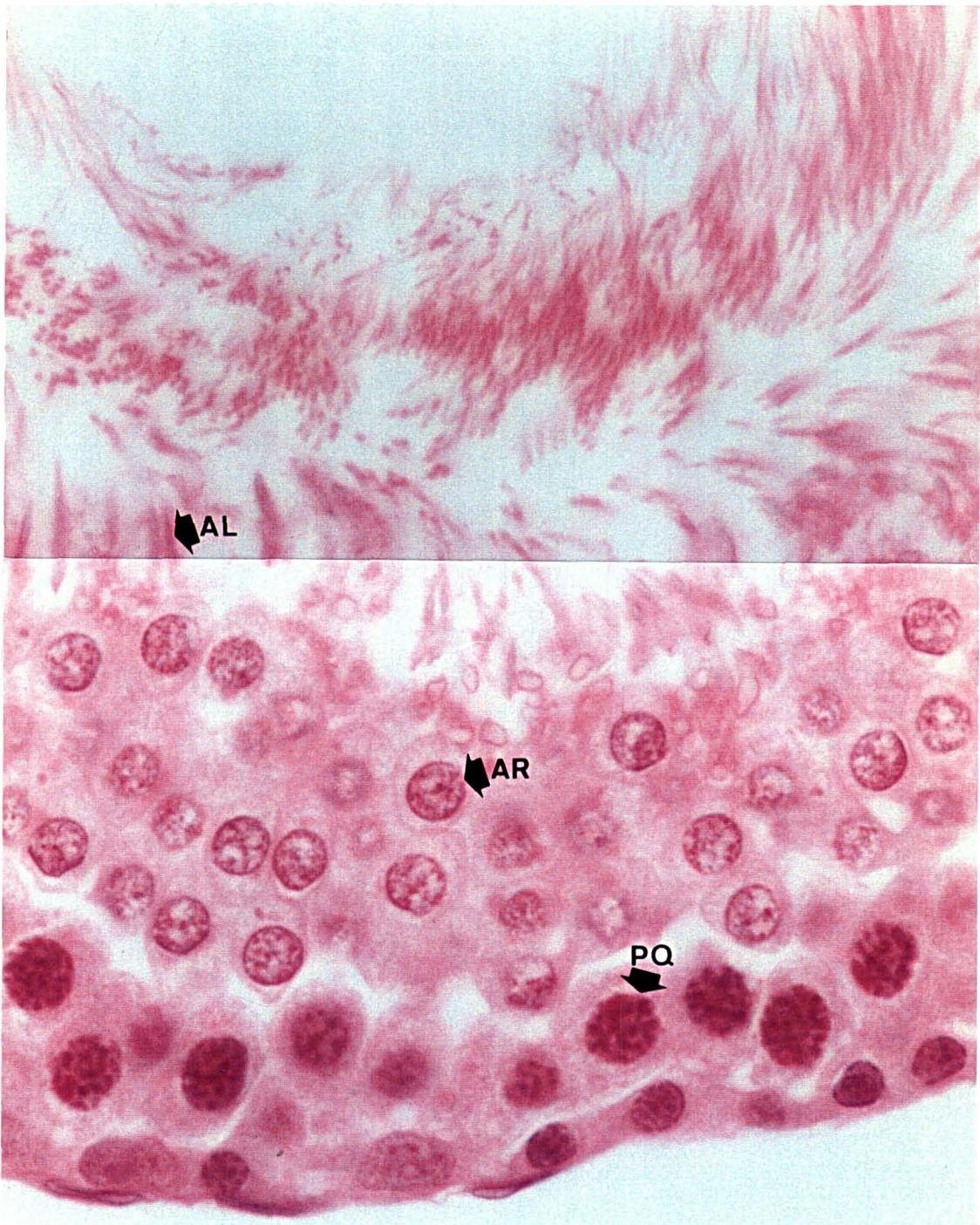


FIGURA 8. SECÇÃO TRANSVERSAL DE TÚBULO SEMINÍFERO NO ESTÁGIO 8 DO CES. VÊEM-SE ESPERMATÓCITOS PRIMÁRIOS EM PAQUÍTENO (PQ), ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS (AR), ESPERMÁTIDES ALONGADAS (AL) ANCORADAS NA BORDA LUMINAL DO EPITÉLIO. H.E., 100X.

5 DISCUSSÃO

Devido à ausência de estudos relacionando o uso do DMSO com a espermatogênese de machos de qualquer espécie, o presente experimento tem caráter inédito e os dados obtidos somente podem ser comparados com valores médios observados nos animais do Grupo Controle.

A reação exotérmica produzida pela fricção da droga foi verificada em todos os animais submetidos à sua aplicação (GE I, GE II e GE III), porém foi transitória e não causou desconforto nem reações de pele. O odor característico foi percebido em todas as aplicações.

5.1 PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA ENTRE COMPONENTES DO TESTÍCULO

Os valores médios encontrados para a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos para os animais sacrificados 23 e 50 dias após o início do Tratamento I e para os animais sacrificados 1 dia após o término do Tratamento II estão expostos nas tabelas 13, 14 e 15. Os valores encontrados para o Grupo Experimental e para o Grupo Controle foram muito próximos, variando de 82,78% a 83,90% e de 82,75% a 83,42% respectivamente.

Encontra-se nos animais dos Grupos Controles (GC I, GC II e GC III) proporção volumétrica de túbulos seminíferos ligeiramente inferior à observada em outros roedores, como no *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990) e em ratos albinos Sprague-Dawley (ROOSEN-RUNGE, 1955). Aproxima-se bastante da observada em suínos Piau adultos (FRANÇA, 1991) e em bovinos da raça Nelore (CARDOSO, 1981).

Comparada com a de outras espécies, verifica-se que a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos dos animais dos Grupos Controles ocupa uma posição intermediária entre a do gambá *Didelphis albiventris* (QUEIROZ, 1991) e a do coelho (AMANN, 1970). Essas diferenças refletem a maior ou a menor quantidade de tecido intertubular que caracteriza o testículo de uma determinada espécie. Segundo SETCHELL (1982), a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos de mamíferos varia de 90,0% (rato, ovino e bovino) a 60,0% (suíno, eqüino e alguns marsupiais). Tal assertiva, portanto, em relação aos animais dos Grupos Controles não encontrou confirmação no presente trabalho. BERNDTSON (1977), avaliando o método para a determinação da proporção volumétrica, observou que a retração tecidual pode apresentar erros nas estimativas dessas proporções, pois a percentagem relativa ocupada por um determinado componente pode ser ou não alterada, dependendo de ser igual ou diferente a retração entre vários componentes teciduais. Entretanto os resultados podem ser válidos quando métodos clássicos de processamento tecidual são usados para avaliar as diferenças relativas da proporção volumétrica de um componente em particular.

5.2 DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Nas tabelas 13, 14 e 15 são apresentados os valores médios gerais obtidos para o diâmetro dos túbulos seminíferos entre o Grupo Experimental e o Grupo Controle dos animais sacrificados 23 e 50 dias após o início do Tratamento I, e 1 dia após o término do Tratamento II.

No Grupo Controle dos animais sacrificados 23 dias após o início do Tratamento I (GC I), os valores registrados para o diâmetro dos túbulos seminíferos são superiores aos observados por ROOSEN-RUNGE (1955) em ratos Sprague-Dawley e por PARREIRA e CARDOSO (1993) em roedores silvestres *Bolomys lasiurus*. São comparáveis aos observados em gambá *Didelphis albiventris* por QUEIROZ (1991).

Segundo SETCHELL (1982), na grande maioria dos mamíferos o diâmetro dos túbulos seminíferos situa-se entre 200,0 e 250,0 μm , podendo chegar até 450 μm em alguns marsupiais.

O valor da média geral para os animais do Grupo Controle (277,6 \pm 4,77) mostra que nesses animais os túbulos seminíferos são mais largos que no carneiro (HOCHEREAU-De REVIERS et al., 1990), e algo superior aos valores registrados em carneiros deslanados (QUEIROZ, 1985) e em bovinos (SWIERSTRA, 1966; CARDOSO, 1981).

O valor médio encontrado para o diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais do Grupo Controle GC I revelou-se inferior àquele observado no Grupo Experimental GE I, mas a diferença não foi estatisticamente significativa.

Já o Grupo Controle GC II dos animais sacrificados 50 dias após o início do Tratamento I obteve média geral superior (286,64 \pm 1,78) àquela observada para o Grupo Experimental GE II (277,81 \pm 4,23). Houve diferença significativa entre o Grupo Controle e o Experimental, e, devido à limitação da amostragem, os dados obtidos não podem ser atribuídos a possíveis efeitos da droga sobre a espermatogênese; sugerem, mais provavelmente, retração tecidual resultante do tipo de fixador utilizado. Segundo SWIERSTRA (1968), os diversos tempos de fixação e inclusão utilizados no processamento histológico de fragmentos de parênquima testicular resultam em índices médios de retração volumétrica similares, havendo, porém, diferenças significativas entre animais.

Nos animais sacrificados 1 dia após o término do Tratamento II, a média geral observada para os animais do Grupo Controle GC III (282,75 \pm 6,40) revelou-se comparável à observada em gambá *Didelphis albiventris* (QUEIROZ, 1991) e superior à de roedores silvestres (PARREIRA e CARDOSO, 1993).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros tubulares medidos nos testículos dos animais do Grupo Controle GC III e dos animais do Grupo Experimental GE III.

5.3 POPULAÇÃO CELULAR DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS E RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE

Conforme mencionado por CARDOSO (1981), os dados disponíveis na literatura demonstram que os números de células por secção transversal de túbulo seminífero, quando considerados em termos absolutos, apresentam grande variação, não só entre espécies como também entre populações diferentes dentro de uma mesma espécie, que pode refletir diferenças reais na amostragem utilizada, mas também pode ser atribuída a variações na metodologia empregada, especialmente no que se refere à correção dos números celulares brutos para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico.

Nos animais sacrificados 23 dias após o início do Tratamento I, a contagem dos espermátocitos primários em paquíteno feita no estágio 3 não apresentou variação significativa entre os dois grupos Experimental e Controle. A uniformidade dos números celulares encontrada em ambos indica, assim, que a produção espermática dos animais não parece ter sido afetada pela droga em questão. Segundo ORTAVANT et al. (1984), é o padrão de divisões espermatogoniais que controla a produção quantitativa de espermátocitos primários. Essa produção pode ser avaliada pelo cálculo do coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais, isto é, pelo número de espermátocitos primários resultante da divisão de uma espermatogônia A-tronco. Esse coeficiente foi estimado em 16 para o boi e o carneiro, em 28 para o rato e em 4 para o homem. Abordando o problema do rendimento da espermatogênese em mamíferos, COUROT et al. (1970) afirmaram que, teoricamente, cada espermátocito primário dá origem a quatro espermátides, mas isso praticamente nunca acontece devido à ocorrência de degenerações durante as divisões meióticas.

No presente trabalho, a população de espermátocitos primários em paquíteno apresentou-se, em números corrigidos, dentro dos limites mencionados por PARREIRA (1990) em relação ao roedor silvestre *Bolomys lasiurus*, mas revelou-se ligeiramente inferior em comparação com outros dados nessa mesma

espécie (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; CLERMONT, 1962; CLERMONT e HARVEY, 1967). Entretanto, os valores médios observados em ratos albinos (CLERMONT e MORGENTALER, 1955) foram inferiores aos apresentados no presente estudo. Em relação a outras espécies, o número de espermatócitos primários por secção transversal de túbulo revelou-se inferior ao do touro Zebu (CARDOSO, 1981) e do suíno (GODINHO e CARDOSO, 1979; FRANÇA, 1991), comparável aos de bovinos europeus (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974; BERNDTSON et al., 1979), mas acima do observado no gambá *Didelphis albiventris* (QUEIROZ, 1991) e em carneiros deslanados (QUEIROZ, 1985).

Segundo ROOSEN-RUNGE (1973), há evidências qualitativas e quantitativas de que durante a espermatogênese normal de mamíferos ocorrem degenerações celulares, de maneira regular e específica, afetando principalmente as espermatogônias em proliferação e as duas divisões meióticas dos espermatócitos.

Quanto ao rendimento da espermatogênese, evidencia-se entre o número de espermatócitos primários em paquíteno e o número de espermátides arredondadas a razão de 1:3,1 tanto para o grupo dos animais controles como para o grupo dos animais experimentais, indicando, assim, uma igualdade no rendimento meiótico e uma perda de cerca de 25% em relação ao número esperado da divisão de todos os espermatócitos. Assim, pode-se concluir que nos animais estudados, à semelhança do observado em bovinos europeus (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974), no carneiro deslanado (QUEIROZ, 1985), no Zebu (CARDOSO, 1981), no suíno (FRANÇA, 1991), no roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990) e no rato (CLERMONT, 1962), ocorre razoável incidência de degenerações afetando as células espermatogênicas durante as duas divisões meióticas.

O número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal de túbulo obteve valor médio de $69,82 \pm 2,42$ para o Grupo Controle e de $67,46 \pm 2,69$ para o Grupo Experimental, não sendo consideradas significativas as diferenças.

É sabido que as células de Sertoli dos mamíferos adultos não se dividem e mantêm o seu número constante no epitélio seminífero (HOCHEREAU-De REVIERS et al., 1987).

Os valores médios observados entre os animais do Grupo Controle e os do Grupo Experimental não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, e os resultados aproximam-se daqueles encontrados em ratos Sprague-Dawley (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950), no carneiro deslanado (QUEIROZ, 1985) e no Zebu (CARDOSO, 1981). Apresentam-se superiores aos observados em roedores silvestres *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990), no gambá *Didelphis albiventris* (QUEIROZ, 1991) e no suíno (FRANÇA, 1991).

Nos animais sacrificados 50 dias após o início do Tratamento I, a contagem dos espermátocitos primários em paquíteno feita no estágio 3 apresentou diferença significativa entre o Grupo Controle ($18,98 \pm 0,48$) e o Grupo Experimental ($20,44 \pm 0,69$).

Com a metodologia utilizada no presente estudo não foi possível analisar a evolução da população de células espermatogênicas desde espermatogônias até a formação de espermátocitos primários, quando se verifica a ocorrência, segundo ROOSEN-RUNGE e GIESEL (1950) de quatro picos de atividade mitótica — dois referentes à espermatogônia A e dois referentes à espermatogônia B. Estudando quantitativamente a espermatogênese do rato, CLERMONT (1962) constatou que cerca de 10,6% das espermatogônias A sofriam degeneração, levando a uma redução do número de espermátocitos primários esperados da divisão de cada espermatogônia-tronco.

Embora o resultado tenha apresentado diferença significativa entre os grupos Controle e Experimental, existem condições que podem ter produzido esse fator, dentre elas o número limitado da amostragem e a variação individual. Segundo BERNDTSON e CLEGG (1992), a utilização de maior número de animais constitui um meio recomendável para aumentar a amostragem e possibilitar resultados mais consistentes nesse aspecto.

O rendimento meiótico, ou seja, a razão entre o número de espermátocitos primários em paquíteno e o número de espermátides arredondadas, foi de 1:3,4 para o Grupo Experimental e de 1:3,6 para o Grupo Controle, mostrando que 85% do número esperado de espermátides foi alcançado para o Grupo Experimental e que 90% do número esperado de espermátides foi alcançado para o Grupo Controle, indicando, assim, que o processo espermatogênico no presente estudo foi pouco afetado por degenerações durante as duas divisões meióticas. Tal variação numérica dentro de uma mesma espécie foi observada no rato (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; CLERMONT, 1962), nos bovinos europeus (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974), no carneiro deslanado (QUEIROZ, 1985), no Zebu (CARDOSO, 1981), no suíno (FRANÇA, 1991) e no roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990).

Quanto às células de Sertoli, os valores médios observados entre os grupos Controle e Experimental apresentaram variação significativa. Os números médios dessas células encontrados no Grupo Controle são comparáveis aos observados em ratos albinos Sprague-Dawley (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950) e superiores aos encontrados em roedores silvestres *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990). Deve-se ressaltar que as discrepâncias encontradas entre o Grupo Controle e o Grupo Experimental parecem resultar da variação individual e do número limitado de amostragem e não devem ser atribuídas a possíveis efeitos da droga, já que, segundo CLERMONT e MORGENTALER (1955), a população de células de Sertoli mantém-se estável em animais adultos, sendo essas células extremamente resistentes a injúrias drásticas capazes de afetar os demais tipos celulares do epitélio seminífero.

Nos animais sacrificados 1 dia após o término do Tratamento II, os valores médios de células espermatogênicas bem como os de células de Sertoli observados não apresentaram variação significativa entre os grupos Controle e Experimental. Todos os valores obtidos mostraram-se estáveis, sendo discretamente superiores nos animais do Grupo Experimental.

A população de espermátocitos primários em paquíteno observada no Grupo Controle é equiparável à constatada em roedores silvestres *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990) e ligeiramente inferior quando comparada com outros dados nessa mesma espécie (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; CLERMONT, 1962; CLERMONT e HARVEY, 1967).

O número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal de túbulo, embora dentro dos limites médios observados em roedores silvestres *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990), em carneiros deslanados (QUEIROZ, 1985) e em bovinos europeus (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974), apresentou-se consideravelmente baixo em relação ao observado em ratos albinos (CLERMONT, 1962), em suínos (FRANÇA, 1991) e em Zebu (CARDOSO, 1981). Entretanto revelou-se superior ao encontrado no gambá (QUEIROZ, 1991) e no coelho (SWIERSTRA e FOOTE, 1963).

Essas discrepâncias numéricas entre os valores observados dentro da mesma espécie e entre espécies podem ser resultantes do estágio em que as espermátides arredondadas foram analisadas no presente estudo, já que o número de células pode variar de um estágio para outro e também de espécie para espécie.

Entre o número de espermátocitos primários em paquíteno e o número de espermátides arredondadas constata-se uma razão de 1:3,2 tanto para os animais do Grupo Controle como para os animais do Grupo Experimental. Isso indica, com base na razão teórica esperada (1:4,0), uma perda de cerca de 20,0% das espermátides arredondadas. Resultados equiparáveis foram observados em suínos Piau (FRANÇA, 1991), bem como em várias espécies de ruminantes (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974; CARDOSO e GODINHO, 1985; QUEIROZ, 1985), no coelho (SWIERSTRA e FOOTE, 1963) e em alguns roedores (PARREIRA, 1990).

Degenerações celulares na espermatogênese normal de mamíferos adultos têm sido observadas por inúmeros autores não só na fase de divisões meióticas como também durante a fase de proliferação espermatogonial (ROOSEN-RUNGE, 1973; BERNDTSON e DESJARDINS, 1974).

Quanto às células de Sertoli, os valores médios observados entre os grupos Controle e Experimental não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O número de células de Sertoli observado no Grupo Controle é comparável ao registrado em ratos albinos (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950), no carneiro deslanado (QUEIROZ, 1985) e no bovino indiano (CARDOSO, 1981), e manteve-se constante entre os animais do Grupo Controle e do Grupo Experimental. A constância desse número, conforme salientam ORTAVANT et al. (1984), é uma característica geral de todos os mamíferos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação da influência do dimetil sulfóxido sobre a espermatogênese permitem as seguintes conclusões:

1. No protocolo posológico empregado, o DMSO não interferiu na contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero, no diâmetro dos túbulos seminíferos, nas proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular e no rendimento intrínseco da espermatogênese.

2. O calor ocasionado pela fricção do DMSO no escroto aparentemente não alterou a espermatogênese.

3. Há necessidade de maiores estudos, com experimentos mais poderosos da aplicação do DMSO na cinética da espermatogênese, na avaliação da morfologia da célula de Leydig e na conseqüente fertilidade dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.*, v. 94, p. 238-248, 1946.
- 2 ALBIN, M.S.; BUNEGIN, L.; HELSEL, P. Dimethyl sulfoxide and other therapies in experimental pressure induced cerebral focal ischemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 261-268, 1983.
- 3 ALLEN, E. Studies on cell division in the albino rat. *J. Morphol.*, v. 31, p. 133-185, 1918.
- 4 ALSUP, E.M. Dimethyl sulfoxide. *J.A.V.M.A.*, Schaumburg, v. 185, n. 9, p. 1011-1014, Nov. 1984.
- 5 AMANN, R.P. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertil. Steril.*, v. 21, n. 9, p. 662-672, 1970.
- 6 AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.*, v. 45, p. 774-781, 1962.
- 7 ANTONY, V.B.; SAHN, S.A.; REPINE, J.E. Effect of dimethyl sulfoxide on chemotaxis of phagocytic cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. 321-323, 1983.
- 8 BALDINI, M.J. Discussion paper : dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for platelet preservation by freezing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 243, p. 306-307, 1975.
- 9 BANTHORPE, D.V.; LAMONT, D.M. Potential toxicity of solutions of dimethyl sulfoxide. *Nature*, v. 215, p. 1296-1297, 1967.
- 10 BERLINER, D.L.; RUHMAN, A.G. The influence of dimethyl sulfoxide on fibroblastic proliferation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 159-164, 1967.
- 11 BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis : a review. *J. Anim. Sci.*, v. 44, n. 5, p. 818-833, 1977.

- 12 BERNDTSON, W.E.; CHENOWETH, P.J.; SEIDEL, G.E. et al. Influence of prostaglandin F_{2α} on spermatogenesis, spermatozoal output, seminal quality, testosterone levels and libido of yearling beef bulls. *J. Anim. Sci.*, v. 49, p. 736-742, 1979.
- 13 BERNDTSON, W.E.; CLEGG, E.D. Developing improved strategies to determine male reproductive risk from environmental toxins. *Theriogenology*, v. 38, p. 223-237, 1992.
- 14 BERNDTSON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am. J. Anat.*, v. 140, p. 167-178, 1974.
- 15 BLUMENTHAL, L.S.; FUCHS, M. The clinical use of dimethyl sulfoxide on various headaches, musculoskeletal and other general medical disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 572-585, 1967.
- 16 BLYTHE, L.; CRAIG, A.; CHRISTESEN, J. et al. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. *Amer. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1738, 1986.
- 17 BRADHAM, G.B.; SAMPLE, J.J. The vascular and thermal effects of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 225-230, 1967.
- 18 BRAUDE, M.C.; MONROE, R.R. Effects of dimethyl sulfoxide and alfa-glucocloralose on pentylenetetrazol convulsive thresholds in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 248-253, 1967.
- 19 BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO) : a review. *Cornell Vet.*, v. 76, p. 61-90, 1986.
- 20 _____. Kirk's current veterinary therapy. In: BONAGURA, J.D. *Small animal practice*. Philadelphia : W.B. Saunders, 1995. cap. 12.
- 21 BROADWELL, R.D.; SALEMAN, M.; KAPLAN, R.S. Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood brain barrier. *Science*, v. 217, p. 169-176, 1982.
- 22 BROWN, S.A. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *J.A.V.M.A.*, v. 12, p. 1849-1858, 1992.
- 23 CARDOSO, F.M. *Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebus (*Bos indicus*)*. Belo Horizonte, 1981. 208 p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- 24 CARDOSO, F.M.; GODINHO, H.P. Daily sperm production of Zebus (*Bos indicus*) estimated by quantitative histology of the testis. **Theriogenology**, v. 23, n. 6, p. 841-847, 1985.
- 25 CASTRO, A.C.S. **A proposed acrosomal system for identifying stages of the cycle of the seminiferous epithelium and a model for the kinetics of spermatogenesis in the rabbit.** Durham, 1995. 148 p. Tese (PhD in Animal and Nutritional Sciences) - University of New Hampshire.
- 26 CASTRO, A.C.S.; BERNDTSON, W.E.; CARDOSO, F.M. Cinética e quantificação da espermatogênese : bases morfológicas e sua aplicação em estudos da reprodução de mamíferos. **Arqu. Bras. Repr.**, v. 27, 1997.
- 27 CAUJOLLE, F.M.E.; CAUJOLLE, D.H.; CROS, S.B.; CALVET, M.J. Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 110-125, 1967.
- 28 CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals : seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol. Rev.**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- 29 _____. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat : a revised model for the renewal of spermatogonia. **Am. J. Anat.**, v. 111, p. 111-129, 1962.
- 30 CLERMONT, Y.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". **Am. J. Anat.**, v. 122, p. 237-248, 1968.
- 31 CLERMONT, Y.; HARVEY, S.C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. **Endocrinology**, v. 76, p. 80-89, 1965.
- 32 _____. Effects of hormones on spermatogenesis in the rat. **Endocrinology**, v. 16, p. 173-196, 1967.
- 33 CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P. Renewal of spermatogonia in the rat. **Amer. J. Anat.**, v. 93, p. 475-502, 1953.
- 34 CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P.; MESSIER, B. Durée du cycle de l'épithelium séminal du rat. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Suppl.**, v. 48, p. 37-55, 1959.
- 35 CLERMONT, Y.; MORGENTALER, H. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. **Endocrinology**, v. 57, p. 369-382, 1955.

- 36 COUROT, M.; HOCHEREAU-De REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.). **The testis**. New York : Academic Press, 1970. v. 1, p. 339-432.
- 37 DAVID, N.A. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. **Ann. Rev. Pharmacol.**, v. 12, p. 353-374, 1972.
- 38 De La TORRE, J.C. Role of dimethyl sulfoxide in prostaglandin-tromboxane and platelet systems after cerebral ischemia. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 411, p. 293-308, 1983.
- 39 _____. Spinal cord injury : review of basic and applied research. **Spine**, v. 6, p. 315-335, 1981.
- 40 DEMOS, C.H.; BECKLOFF, G.L.; DONIN, M.N.; OLIVER, P.M. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 517-523, 1967.
- 41 DJKAN, T.I.; GUNBERG, D.L. Percutaneous absorption of two steroids dissolved in dimethyl sulfoxide in the immature female rat. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 406-413, 1967.
- 42 DYM, N.; CLERMONT, Y. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-irradiation of the rats testis. **Anat. Rec.**, v. 122, p. 237-248, 1970.
- 43 ELIAS, H.; HENNIG, A.; SCHWARTZ, D.E. Stereology : applications to biomedical research. **Physiol. Rev.**, v. 51, p. 158-200, 1971.
- 44 FERRARI, M.V. **Características reprodutivas de ovinos (*Ovis aries*) submetidos a tratamentos com dimetil sulfóxido (DMSO)**. Curitiba, 1995. 62 p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná.
- 45 FIGUEIREDO, J.B.; ANDRADE, J.R.A.; LINS, J.L.F.H.A. Controle da mamite bovina através da antibioticoterapia coadjuvada pelo dimetil sulfóxido. **Arqu. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 45, n. 5, p. 465-474, 1993.
- 46 FINNEY, J.W.; URSCHEL, H.C.; BALLA, G.A. et al. Protection of the ischemic heart with DMSO alone or DMSO with hydrogen peroxide. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 231-241, 1967.
- 47 FOX, R.B.; FOX, W.K. Dimethyl sulfoxide prevents hydroxyl radical mediated depolymerization of hyaluronic acid. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 411, p. 14-18, 1983.

- 48 FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau.** Belo Horizonte, 1991. 185 p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 49 FRANKS, B.C.; COLEY, S.L.; BETTERBEEL, B.; PAGE, R.D. The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates and freezing units on the survival of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 23, p. 194, 1985. Abstract.
- 50 GODINHO, H.P.; CARDOSO, F.M. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. **Arq. Es. Vet. UFMG**, v. 31, n. 3, p. 351-361, 1979.
- 51 GOLDMAN, L. A brief resume of clinical observations in the treatment of superficial burns, trigeminal neuralgia, acute bursitis, and acute musculoskeletal trauma with DMSO. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 653-654, 1967.
- 52 GOLDMAN, L.; IGELMAN, J.I.; KITZMILLER, K. Investigative studies with DMSO in dermatology. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, n. 1, p. 428-436, 1967.
- 53 GOROG, P.; KOVACS, I.B. Antiarthritic and antithrombotic effects of topically applied dimethyl sulfoxide. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 243, p. 91-97, 1975.
- 54 HAMEROFF, S.R.; OTTO, C.W.; KANEL, J. et al. Acute cardiovascular effects of dimethyl sulfoxide. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 411, p. 94-99, 1983.
- 55 HILL, P.K.; De La TORRE, J.C.; THOMPSON, S.M. et al. Ultrastructural studies of rat fasciculi gracilis unmyelinated fibers after contusion and DMSO treatment. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 411, p. 200-217, 1983.
- 56 HOCHEREAU-De REVIERS, M.T. Variation in the stock of testicular stem cell and in the yield of spermatogonia divisions in ram and bull testis. **Andrologia**, v. 8, n. 2, p. 137-146, 1976.
- 57 HOCHEREAU-De REVIERS, M.T.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. **J. Reprod. Fertil.**, v. 34, p. 101-114, 1987. Suppl.
- 58 HOCHEREAU-De REVIERS, M.T.; PERREAU, C.; PISSELET, C. et al. Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov Rams. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 7, n. 1, p. 63-73, 1990.

- 59 HOERLEIN, B.F.; REDDING, R.W.; HOFF, E.J.; MacGUIRE, J.A. Evaluation of dexametasone, DMSO, mannitol and solcoseryl in acute spinal cord trauma. *J. Amer. An. Hosp. Assoc.*, v. 19, p. 216-226, 1983.
- 60 HUCKINS, C. Duration of spermatogenesis in pre- and postpuberal Wistar rat. *Anat. Record*, v. 151, p. 364, 1965. Abstract.
- 61 HUCKINS, C.; OAKBERG, E.F. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubule. II. The irradiated testes. *Anat. Rec.*, v. 192, p. 529-541, 1978.
- 62 JACOB, W.W.; HERSCHLER, R. Introductory remarks : dimethyl sulfoxide after twenty years. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. xiii-xvii, 1986.
- 63 JIMENEZ, R.H.; WILKENS, R.F. Dimethyl sulfoxide : a perspective of its uses in rheumatic disease. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 100, p. 489-500, 1982.
- 64 JOHN, H.; LAUDAHN, G. Clinical experiences with the topical applications of DMSO in orthopedic diseases : evaluation of 4180 cases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 506-516, 1967.
- 65 KEDAR, I.; JACOB, E.T.; BAR-NATAN, N.; RAVID, M. Dimethyl sulfoxide in acute ischemia of the kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. 131-134, 1983.
- 66 KHARASCH, N.; THYAGARAJAN, B.S. Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. 391-402, 1983.
- 67 KLEBERGER, K.W. An ophthalmological evaluation of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 381-385, 1967.
- 68 KLIGMAN, A.M. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). *JAMA*, v. 193, p. 140-148, 1965.
- 69 KOLB, K.H.; JAENICKE, G.; KRAMER, M.; SHULZE, P.E. Absorption, distribution and elimination of labelled dimethyl sulfoxide in man and animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, n. 1, p. 85-95, 1967.
- 70 KNOWLES, R.P. Clinical experiences with DMSO in small animal practice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 478-483, 1967.
- 71 KOCSIS, J.J.; HARTWAY, S.; VOGEL, W.H. Dimethyl sulfoxide : breakdown of the blood-brain barrier. *Science*, v. 160, p. 1472-1473, 1968.
- 72 LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous spithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 55, p. 548-584, 1952.

- 73 LEY, W.B.; BOWRN, J.M.; SPONENBERG, D.P.; LESSARD, P.N. Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare : effects upon endometrial histological features and biopsy classification. **Theriogenology**, v. 32, p. 263-276, 1989.
- 74 LEY, W.B.; OCHS, D.L.; METCALF, E.S. et al. Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare : effect upon uterine-derived neutrophil function. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1177-1189, 1990.
- 75 LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M.W.H. Prevention of freezing damage to cells by dimethyl sulfoxide. **Nature**, v. 183, p. 1394-1395, 1959.
- 76 MAIBACH, H.I.; FELDMAN, R.J. The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortizone and testosterone in man. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 471-477, 1967.
- 77 MALLACH, H.J. Interaction of DMSO and alcohol. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 471-477, 1967.
- 78 MATSUMOTO, J. Clinical trials of dimethyl sulfoxide in rheumatoid arthritis patients in Japan. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 411, p. 560-568, 1967.
- 79 MAYHEW, I.G.; MacKAY, R.J. Neurologic disease. In: **EQUINE medicine and surgery**. 3. ed. Santa Barbara : American Veterinary Publications, 1982. v. 2, p. 131-140.
- 80 MICHALANY, J. Operações fundamentais da técnica histológica. In: _____. **Técnica histológica em anatomia patológica : com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo : E.P.U., 1980. p. 22-31.
- 81 MISCH, D.W.; MISCH, M.S. The effects of dimethyl sulfoxide on a lysosomal membrane. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 243, p. 54-59, 1975.
- 82 MONDER, C. Discussion : effects of DMSO on enzyme activity. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 141, p. 300-301, 1967.
- 83 ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-De REVIERS, M.T. Espermatogénesis en los mamíferos domésticos. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduccion de los animales domésticos**. 3. ed. Zaragoza : Editorial Acribia, 1984. p. 171-190.
- 84 PARREIRA, G.G. **Morfologia e variação sazonal da atividade dos testículos e órgãos genitais acessórios de *Bolomys lasiocerus* Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae)**. Belo Horizonte, 1990. 97 p. Tese (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- 85 PARREIRA, G.G.; CARDOSO, F.M. Seasonal variation of the spermatogenic activity in *Bolomys lasiurus* (Lund, 1841) (Rodentia, Cricetidae), from Southeastern Brazil. *Mammalia*, v. 57, n. 1, p. 27-34, 1993.
- 86 PENROD, D.S.; BACHARACH, B.; TEMPLETON, H.I. Dimethyl sulfoxide for incisional pain after thoracotomy : preliminary report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 493-495, 1967.
- 87 PERLMAN, R.L.; WOLFF, J. Dimethyl sulfoxide : an inhibitor of liver alcohol dehydrogenase. *Science*, v. 160, p. 317-319, 1968.
- 88 PERSKI, L.; STEWART, B.H. The use of dimethyl sulfoxide in the treatment of genitourinary disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 551-554, 1967.
- 89 PESTRONK, A.; DRACHMAN, D.B. Dimethyl sulfoxide reduces antibody titers in experimental myasthenia gravis. *Nature*, v. 193, p. 548-550, 1980.
- 90 POCCIA, D. Introduction. In: _____ (Ed.). *Molecular aspects of spermatogenesis*. Austin : CRC Press, 1994. p. 1-9.
- 91 POTTS, G.E.; RAMPEY, J.H.; BENJAMIN, F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of group of medically important microorganism : preliminary report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 261-272, 1967.
- 92 QUEIROZ, G.F. Estudo morfológico e quantitativo da atividade testicular do gambá *Difelphis albiventris* (Marsupialia). Belo Horizonte, 1991. 83 p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 93 _____. Estudo morfológico e quantitativo da espermatogênese de carneiros deslanados. Belo Horizonte, 1985. Tese (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 94 RAVID, M.; VanDICK, D.; BERNHEIM, J.; KEDAR, I. The protective effect of dimethyl sulfoxide in experimental ischemia of the intestine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. 100-104, 1983.
- 95 RAMMLER, D.H.; ZAFFARONI, A. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 13-23, 1967.
- 96 REED, S.M. Head trauma. In: CURRENT therapy in equine medicine. Philadelphia : W.B. Saunders, 1983.

- 97 REGAUD, C. Études sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères. *Arch. Anat. Microscop.*, v. 11, p. 291-431, 1909.
- 98 REPINE, J.E.; EATON, J.W.; ANDERS, M.W. et al. Generation of hydroxyl radicals by enzymes, chemicals and human phagocytes *in vitro* : detection using the antiinflammatory agent — dimethyl sulfoxide. *J. Clin. Invest.*, v. 64, p. 1642-1651, 1979.
- 99 REPINE, J.E.; FOX, R.B.; BERGER, E.M. Effect of dimethyl sulfoxide on the bactericidal function of polymorphonuclear leukocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. 11-14, 1983.
- 100 ROOSEN-RUNGE, E.C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 35, p. 339-348, 1973.
- 101 _____. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Anat. Rec.*, v. 123, n. 4, p. 384-398, 1955.
- 102 ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL JR., L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.*, v. 87, n. 1, p. 1-30, 1950.
- 103 ROSENBLUM, W. Dimethyl sulfoxide effects on platelet aggregation and vascular reactivity in pial microcirculation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 411, p. 110-119, 1983.
- 104 ROSENBLUM, W.; El-SABBAN, F. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol, hydroxyl radical scavengers, impair platelet aggregation within and eliminate the accompanying vasodilatation of injured mouse pial arterioles. *Stroke*, v. 13, p. 35-39, 1982.
- 105 RUBIN, L.F. Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 243, p. 98-103, 1975.
- 106 RUBIN, L.F.; BARNETT, K.C. Ocular effects of oral and dermal applications of dimethyl sulfoxide in animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 333-345, 1967.
- 107 RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHAHIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. The classification and timing of spermatogenesis. In: _____ (Eds.). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater : Cache River Press, 1990. p. 41-58.
- 108 SAMS JR., W.M. The effects of dimethyl sulfoxide on nerve conduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 242-247, 1967.

- 109 SCHUCH, J.; ROSS, C.; MESCHTER, C. Concurrent mercuric blister and dimethyl sulfoxide (DMSO) application as a cause of mercury toxicity in two horses. *Equine Vet. J.*, v. 20, p. 68, 1988.
- 110 SEHTMAN, L. Dimethyl sulfoxide therapy in various dermatologic disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 243, p. 395-402, 1975.
- 111 SEIBERT, F.B.; FARRELY, F.K.; SHEPHERD, C.C. DMSO and other combatants against bacteria isolated from leukemia and cancer patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, n. 1, p. 175-201, 1967.
- 112 SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. (Ed.). *Reproduction in mamalian*. London : Elek, 1982. v. 1, cap. 4, p. 63-101.
- 113 SHLAFER, M.; KAROW JR., A.M. Effects of dimethyl sulfoxide on mammalian myocardium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 243, p. 110-121, 1975.
- 114 SINHAHIKIM, A.P.; MAITI, B.R.; GHOSH, A. Spermatogenesis in the bandicoot rat. I. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium. *Arch. Androl.*, v. 14, p. 151-154, 1985.
- 115 SMITH, E.R.; MASON, M.M.; EPSTEIN, E. The influence of dimethyl sulfoxide on the dog with emphasis on the ophtalmologic evaluation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 386-391, 1967a.
- 116 SMITH, E.R.; HADIDILAN, Z.; MASON, M.M. The single and repeated dose toxicity of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 96-109, 1967b.
- 117 STEINBERG, A. Employment of dimethyl sulfoxide as an antiinflammatory agent and steroid transporter in diversified clinical diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 532-550, 1967.
- 118 SULZBERGER, M.B.; CORTESE, T.A.; FISHMA, L et al. Some effects of DMSO on human skin *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 417-450, 1967.
- 119 SWIERSTRA, E.D. Structural composition of shorthorn bull testes and daily spermatozoa production as determined by quantitative testicular histology. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 46, n. 2, p. 107-119, 1966.
- 120 _____. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar : duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat. Rec.*, v. 161, p. 171-186, 1968.

- 121 SWIERSTRA, E.D.; FOOTE, R.H. Citology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, v. 5, p. 309-322, 1963.
- 122 SWIERSTRA, E.D.; WHITEFIELD, J.W.; FOOTE, R.H. Action of amphotericin B (Fungizone) on spermatogenesis in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, v. 7, p. 13-19, 1964.
- 123 SZMANT, H.H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, n. 1, p. 21-23, 1967.
- 124 TERVILL, H.R.; GOOLD, P.G. Deep freezing sheep embryos. *Theriogenology*, v. 21, n. 1, p. 268, 1984. Abstract.
- 125 TIEGLAND, M.B. Clinical evaluation of dimethyl sulfoxide in equine application. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 471-477, 1967.
- 126 WOOD, D.C.; WOOD, J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 243, p. 7-19, 1975.
- 127 WOOD, D.C.; SWEET, D.; Van DOLAH, J.; SMITH, J.C. A study of DMSO and steroids in rabbit eyes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 141, p. 346-380, 1967.
- 128 WOOLEY, R.E.; GILBERT, J.P.; SHOTTS, E.B. Antibacterial action of combinations of oxytetracycline, dimethyl sulfoxide and EDTA - trommethamine on *Proteus*, *Salmonella* and *Aeromonas*. *Amer. J. Vet. Res.*, v. 43, p. 130-133, 1982.
- 129 YELLOWLEES, P.; GREENFIELD, C.; McINTYRE, N. Dimethyl sulfoxide induced toxicity. *Lancet*, v. 2, n. 8207, p. 1044-1046, 1980.
- 130 ZIMMERMAN, S.J.; MAUDE, M.B.; MOLDAUER, M. Freezing and storage of human semen in 50 healthy medical students. *Fert. & Steril.*, v. 15, p. 505-510, 1964.