

MARIA DE LOURDES GOMES PEREIRA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO TUBO SEMINÍPARO
POR ACÇÃO DA NITROFUZONA.
ESTUDO EXPERIMENTAL NO RATINHO**

UNIVERSIDADE DE AVEIRO

1990

MARIA DE LOURDES GOMES PEREIRA

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO
TUBO SEMINÍPARO POR ACÇÃO DA
NITROFURAZONA.
ESTUDO EXPERIMENTAL NO RATINHO



universidade de aveiro

SBIDM

oferta

*Dissertação apresentada à Universidade
de Aveiro para obtenção do grau de
Doutor em Biologia.*

SDUA



319249

UNIVERSIDADE DE AVEIRO

1990

Este trabalho foi realizado com o patrocínio do Centro de Farmacologia e Toxicologia Veterinária do INIC da Universidade Técnica de Lisboa (Director: Prof. Doutor Alfredo Jorge Silva), sob a orientação do Prof. Doutor J.F. Cardoso Pessoa.

Os estudos ultraestruturais foram executados na Secção de Microscopia Electrónica (Responsável: Doutora Maria Helena Ferronha de Brito) do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária de Lisboa.

A redacção final desta Dissertação foi efectuada no Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (Director: Prof. Doutor J.F. David-Ferreira).

Em Homenagem à Memória do

Prof. Doutor J. F. Cardoso Pessoa

AGRADECIMENTOS

O meu especial agradecimento é dirigido ao Prof. Doutor Carlos Azevedo do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, pelo esforço que dedicou na minha preparação técnico-científica. Assim, deu-me a possibilidade de estagiar no referido Departamento onde adquiri os conhecimentos básicos de microscopia electrónica para a realização das Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, bem como a prossecução do presente trabalho.

Esta Dissertação foi possível graças ao estágio que realizei no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, a cujo Director Dr. Matos Aguas agradeço ter proporcionado as condições necessárias à sua realização.

A Doutora Maria Helena Ferronha de Brito, Responsável pelo Serviço de Microscopia Electrónica daquele Laboratório, fico reconhecida pelas críticas e conselhos que me deu e que muito contribuíram para a minha formação. Não esqueço a excelente colaboração prestada pelo Sr. José Cristina Afonso na preparação do material iconográfico durante os anos em que estagiei naquela Secção, a quem fico muito grata. A todas as outras pessoas em especial às Sras. D. Maria Lapão,

D. Sara e D. Maria Filomena, quero expressar o meu agradecimento pelo apoio concedido durante a minha permanência naquele Serviço. Ao António Pedro Alves de Matos fico reconhecida pelas sugestões que me deu.

Ao Prof. Doutor Alfredo Jorge Silva, actual Responsável pelo Centro de Farmacologia e Toxicologia Veterinária do INIC, fico devedora de ter dado continuidade ao apoio que recebi do referido Centro durante a preparação deste trabalho.

Ao Prof. Doutor J.F. David-Ferreira de quem recebi provas de estima e amizade, agradeço a disponibilidade por ter aceite ser meu orientador na elaboração final desta Dissertação, nomeadamente a sua revisão crítica pormenorizada, o apoio e sugestões imprescindíveis à realização desta Tese. Cumpre-me ainda uma palavra de sentido reconhecimento por me ter permitido estagiar no Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, tornando deste modo possível a conclusão deste trabalho. Aos seus colaboradores com destaque muito particular para a D. Inês Condado pela constante disponibilidade e zelo que dispensou na preparação gráfica desta Dissertação e ao Sr. José Carlos Lemos, por alguns documentos fotográficos que ilustram este trabalho.

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Aveiro, Prof. Doutor Joaquim Renato de Araújo e em especial ao Departamento de Biologia agradeço as facilidades concedidas permitindo os estágios que efectuei com vista à realização desta Dissertação.

Cabe-me ainda referir uma palavra de muita simpatia a todos quantos de algum modo incentivaram à realização desta Tese.

Ao Prof. Doutor J. F. Cardoso Pessoa, já desaparecido, presto a minha profunda homenagem pela generosidade, ânimo, confiança e amizade com que sempre me distinguiu, integrando-me no Projecto de Investigação do Centro de Farmacologia e Toxicologia Veterinária do INIC e iniciando a orientação da presente Dissertação.

I N D I C E

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPITULO I	
MATERIAL E METODOS	
A. Material. Animais	19
B. Métodos. Protocolos experimentais	19
1. Protocolo de administração/intoxicação com Nitrofurazona e calendário das colheitas	20
2. Técnicas de fixação, inclusão e corte utilizadas no estudo das colheitas do testículo de animais normais e intoxicados	21
3. Protocolo das experiências realizadas com o objectivo de estudar as alterações da barreira hemato-testicular e suas modificações no transporte nas células de Sertoli	24
4. Protocolo das experiências com o objectivo de estudar a possível reversibilidade da acção da Nitrofurazona no epitélio seminíparo	26
 CAPITULO II	
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA ESPERMATOGENESE PROVOCADAS PELA NITROFURAZONA	
2.1. Introdução	27
2.2. Resultados	30
2.2.1. Alterações nas células germinativas	31
2.2.2. Células multinucleadas	35
2.2.3. Alterações nas células de Sertoli	37
2.3. Discussão	38
ILUSTRAÇÕES	53

CAPITULO III
MODIFICAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR EM RATINHOS INTOXICADOS COM NITROFURAZONA

3.1. Introdução	75
3.2. Resultados	80
3.2.1. Animais controlo	80
3.2.2. Animais intoxicados	81
3.3. Discussão	83
ILUSTRAÇÕES	89

CAPITULO IV
REGENERAÇÃO DO EPITELIO SEMINIPARO DE RATINHOS PREVIAMENTE INTOXICADOS COM NITROFURAZONA

4.1. Introdução	105
4.2. Resultados	110
4.3. Discussão	112
ILUSTRAÇÕES	117
SUMÁRIO E CONCLUSÕES	125
SUMMARY AND CONCLUSIONS	129
BIBLIOGRAFIA	133

INTRODUÇÃO GERAL

... The blood-testis barrier should be kept in mind in any studies on the effects of toxic compounds on the testis.

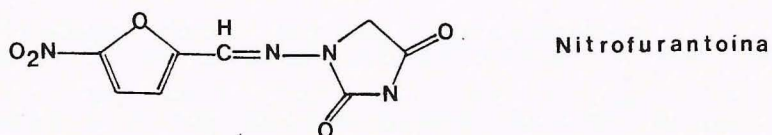
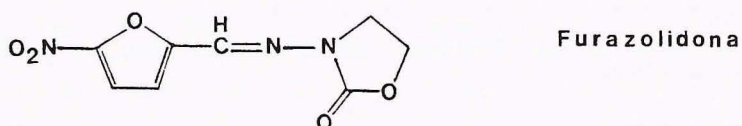
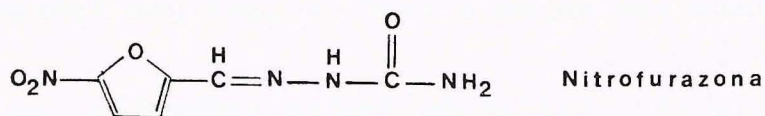
B.P. Setchell (1980)

Uma das características mais importantes das células do epitélio seminiparo é constituírem uma população celular em constante renovação. De forma semelhante ao que acontece com as células da medula óssea e do epitélio intestinal, as células germinativas dividem-se muito activamente durante a vida adulta, sendo por isso particularmente susceptíveis à acção de numerosos agentes físicos e químicos.

Além da divisão mitótica, as células germinativas do epitélio seminiparo têm ainda a particularidade de serem sede de um tipo único de divisão celular no organismo, a meiose, que hoje sabemos só se poder processar no "meio adequado" que resulta da existência da barreira hemato-

-testicular. A desorganização estrutural desta barreira em consequência de lesões dos elementos celulares que a constituem, tem por isso sido apontada como um dos possíveis mecanismos responsáveis pela desorganização do processo espermatogénico.

A degenerescência dos elementos celulares que constituem o epitélio seminíparo e a sua vacuolização, são os sinais morfológicos mais frequentemente assinalados em diversas situações experimentais ou patológicas de lesão testicular. Estas alterações têm sido descritas na sequência da acção de vários agentes químicos (Gomes 1970, Meistrich e col. 1982, ver revisão por Davies 1980 e Drife 1987). Dentro destes destacam-se os nitrofuranos que são compostos orgânicos caracterizados pela presença de um anel heterocíclico formado por quatro átomos de carbono e um de oxigénio, com um radical nitro ($-NO_2$) na posição 5 e um radical ($-CH=N-R$) na posição 2 do anel, em que R pode variar segundo o composto, tomando então respectivamente as designações de Nitrofurazona, Furazolidona, Nitrofurantoina (Esquema I).



Esquema I

Devido ao seu largo espectro bacteriano estes compostos têm sido largamente utilizados em Medicina como agentes terapêuticos (ver revisão por Silva 1976).

Os efeitos nocivos dos nitrofuranos na função e morfologia do testículo têm sido referidos por vários autores. Sabe-se que estes fármacos têm acção antifertilizante, o que tem sido confirmado num número variado de espécies de mamíferos e aves (ver revisão por Fontes 1988).

A Nitrofurazona (5-Nitro-2-Furaldeído Semi-carbazona), é um dos nitrofuranos cuja acção antiespermatogénica tem sido extensivamente estudada em várias espécies animais (ver revisão por Fontes 1988).

A larga utilização destes compostos em Medicina Veterinária (Morales e col. 1987, Nouws e col. 1987), nomeadamente em coccidioses, justifica que se aprofundem os estudos das suas acções em modelos experimentais.

Em trabalhos anteriores (Pereira e col. 1988a, 1988b, 1988c, 1988d) que serviram de base para a execução desta dissertação, também verificamos que a Nitrofurazona quando administrada por via subcutânea a ratinhos, provocava a degenerescência e necrose das células do epitélio seminíparo. Com o presente estudo pretendeu-se:

1. Analisar as alterações provocadas pela Nitrofurazona ao nível do epitélio germinativo do ratinho (Charles River) concretamente o seu efeito na espermatogénese.
2. Investigar os efeitos da Nitrofurazona na barreira hemato-testicular e no transporte de substâncias pelas células de Sertoli.

3. Estudar, em animais previamente intoxicados a reversibilidade das alterações observadas.

Partimos da hipótese que as alterações descritas no epitélio seminíparo dos animais tratados podem ser uma consequência da alteração das células de Sertoli e da barreira hemato-testicular.

Utilizámos como modelo experimental o ratinho, pelo facto de se tratar de uma espécie facilmente manipulável em laboratório, em que são bem conhecidas as diferentes etapas da espermatogénese e também as características morfológicas e ultraestruturais das células de Sertoli e da barreira hemato-testicular.

Parte do material que integra a presente Dissertação foi apresentado sob a forma de comunicações em Reuniões Científicas conforme se descreve:

- . L. Pereira, J.F.C. Pessoa, A.J. Silva e E.M. Fontes
Degenerescência e necrose do tubo seminífero induzidas pela Nitrofurazona. Resultados preliminares. In: Ciênc. Biol., 131:103, 1988. Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica, Évora, 13-15 Outubro, 1987.
- . L. Pereira, J.F.C. Pessoa, A.J. Silva and E.M. Fontes
Ultrastructural study of Nitrofurazone - induced seminiferous tubules injury in the mouse. In: Quaderni Di Anatomia Pratica, 44:311, 1988. VIII International Symposium on Morphological Sciences. Roma, 10-15 Julho, 1988.
- . L. Pereira, J.F.C. Pessoa, A.J. Silva and E.M. Fontes
Ultrastructural study of spermiogenesis on Nitrofurazone - Treated mice. In: Inst. Phys. Conf. Ser., 93:245-246, 1988. 9th European Congress on Electron Microscopy (EUREM 88). York, England, 4-9 Setembro, 1988.
- . L. Pereira, J.F.C. Pessoa, A.J. Silva e E.M. Fontes
Células multinucleadas em tubos seminíferos de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona. Resultados preliminares. In: IBEREM Abstracts. II Reunião conjunta das Sociedades Portuguesa e Espanhola de Microscopia Electrónica, IBEREM. Lisboa, 14-16 Dezembro, 1988.
- . J.F.C. Pessoa, L. Pereira, A.J. Silva and E.M. Fontes
Mice seminiferous tubules followed by Nitrofurazone treatment. Horseradish peroxidase transport through Sertoli cells junctions. In: Proc. of the Fifth Zagazig World Conference on Obstetrics and Gynaecology "Fertility Problems" Cairo, 18-20 Fevereiro, 1989.

De acordo com o Decreto-Lei 388/70 (Artº 8º) informo que a minha participação nesses trabalhos em co-autoria, consistiu no planeamento e execução do trabalho laboratorial, na redacção dos resumos publicados e na sua apresentação.

CAPITULO I

MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL. ANIMAIS

Em todas as experiências foram utilizados ratinhos machos (Charles River) de dois meses de idade, com o peso compreendido entre 37 e 43 gramas, fornecidos pelo Biotério da Centro de Biologia do Instituto Gulbenkian de Ciência em Oeiras.

B. MÉTODOS. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Neste sub-capítulo reúnem-se os dados relativos aos métodos utilizados neste trabalho. Está subdividido em quatro secções correspondentes aos quatro tipos de experiências realizadas nomeadamente:

1. Protocolo de administração/intoxicação com Nitrofurazona e calendário das colheitas;
2. Técnicas de fixação, inclusão e corte utilizadas no estudo das colheitas do testículo de animais normais e intoxicados;

3. Protocolo das experiências realizadas com o objectivo de investigar as alterações da barreira hemato-testicular e suas modificações no transporte nas células de Sertoli;
4. Protocolo das experiências com o objectivo de estudar a possível reversibilidade da acção da Nitrofurazona no epitélio seminíparo.

1. Protocolo de administração/intoxicação com Nitrofurazona e calendário das colheitas

Os animais utilizados nesta experiência (n = 24) foram divididos em dois grupos que se pesaram regularmente, a fim de determinar a dose de Nitrofurazona a administrar (0,2 mg/g.p.v.).

No grupo controlo, os animais foram injectados subcutaneamente com parafina líquida (WHITREX 309 Mobil Oil). Os animais do grupo experimental foram analogamente injectados com a suspensão de Nitrofurazona (FREDA)/parafina (40 mg/ml). O tratamento foi efectuado por um período de 10 dias e com a periodicidade de 72 horas.

A suspensão de Nitrofurazona em parafina líquida foi previamente homogeneizada e esterilizada.

Ao fim de 10 dias, os animais foram anestesiados com vapores de éter e a colheita do testículo foi feita por via escrotal. Os fragmentos de tecido foram processados para microscopia óptica e microscopia electrónica pelos métodos a seguir descritos.

2. Técnicas de fixação, inclusão e corte utilizadas no estudo das colheitas do testículo de animais normais e intoxicados

Para a obtenção do testículo, os animais (n = 24) foram sujeitos a anestesia com vapores de éter e colocados em decúbito dorsal. Após incisão na região escrotal o testículo foi exposto.

Numa fase inicial utilizaram-se dois métodos para a fixação dos testículo; (a) fixação por injeção sub-capsular do fixador segundo o método de Lago e Lucke (1973) e (b) fixação após incisão da cápsula albuginea e isolamento dos tubos seminíparos.

O estudo comparativo de colheitas fixadas por ambos os métodos mostrou que o grau de conservação ultraestrutural das preparações de tubos seminíparos fixados após isolamento era nitidamente superior ao das preparações obtidas após fixação sub-capsular, razão pela qual adoptamos esse método para processamento das colheitas efectuadas.

Os fragmentos de tubos seminíparos foram fixados por imersão em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,075M a pH 7,2 - 7,4 durante 1 hora a 4° C. Após três banhos de lavagem no mesmo tampão procedeu-se à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato de sódio durante 2 horas a 4° C.

Seguidamente e após lavagem no referido tampão (2 banhos rápidos a temperatura ambiente), os fragmentos foram desidratados e incluídos de acordo com o seguinte esquema:

- Alcool etílico a 70° - 2 banhos no total de 15 min.
- Alcool etílico a 95° - 2 banhos no total de 15 min.
- Alcool etílico a 100° - 6 banhos no total de 45 min.
- Óxido de propileno - 2 banhos no total de 30 min.
- Infiltração com a mistura Epon-Araldite + óxido de propileno (1:1) - 2 banhos no total de 30 min.
- Infiltração em Epon-Araldite (2 a 3 mudas) no vácuo

- Inclusão em Epon-Araldite, polimerização na estufa a 60° C durante 24 horas

Os blocos obtidos foram posteriormente cortados num ultramicrotomo (Ultratome III-LKB), utilizando para esse efeito facas de vidro. Prepararam-se dois tipos de cortes:

. Cortes semifinos

- com aproximadamente 1 um de espessura para observação e estudo ao microscópio óptico, após coloração com azul de toluidina a 1% numa solução de carbonato de sódio durante 1 - 2 minutos à temperatura de 60° C.

. Cortes ultrafinos

- os cortes obtidos com aproximadamente 50 - 70 nm de espessura e destinados à observação e estudo ao microscópio electrónico foram recolhidos em grelhas de cobre de 200 malhas por polegada quadrada, previamente cobertas de formvar reforçado com carbono. Os cortes foram duplamente corados de acordo com a seguinte técnica:

- solução aquosa de acetato de urânio a 2% a 50° C - 30 minutos (protegido da luz)
- lavagem em H₂O destilada - 2-3 min.
- citrato de chumbo (Hanaichi e col. 1986) -
- 6 min.
- lavagem em H₂O destilada - 2-3 min.

A observação e microfotografias foram realizadas num microscópio electrónico de transmissão JEOL 100B, trabalhando a 80 KV.

3. Protocolo das experiências realizadas com o objectivo de estudar as alterações da barreira hemato-testicular e suas modificações no transporte nas células de Sertoli

As experiências correspondentes ao protocolo que se descreve tiveram por objectivo estudar os mecanismos de transporte de uma proteína nos tubos seminíferos de animais intoxicados com a Nitrofurazona, de forma a contribuir para um melhor conhecimento da fisiologia das células de Sertoli, nomeadamente na manutenção da integridade da barreira hemato-testicular.

Nesta perspectiva realizámos experiências in vitro, utilizando como traçador, a peroxidase de rábano (Horseradish Peroxidase HRP Sigma Tipo II).

Após procedimento para a colheita do testículo como nas experiências anteriormente descritas, isolaram-se porções de tubos seminiparos de animais controlo (n=12) com cerca de 2 - 3 cm de comprimento numa caixa de petri contendo meio de Eagle à temperatura de 31 - 32° C (pH 7), ao qual se adicionou 10% de soro de vitela. As extremidades dos fragmentos tubulares foram previamente laqueadas com fio de algodão e mantidos em meio de Eagle nas condições de incubação já referidas no parágrafo anterior, ao qual se adicionou peroxidase na concentração de 5 mg/ml de meio (Pessoa 1976, Pessoa e David-Ferreira 1980).

Depois de se ter efectuado a colheita aos 5, 10, 15 e 30 minutos após o início da experiência, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,075 M a pH 7,2 - 7,4 durante uma hora. Seguidamente e após lavagem no mesmo tampão (3 x 10') efectuou-se a pré-incubação durante 10', à temperatura ambiente, numa solução de Diaminobenzidina (DAB) dissolvida em tampão Tris-HCl (5 mg/10 ml) a pH 7,6 (Graham e Karnovsky 1966).

Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para um novo banho de DAB durante 45 minutos, ao qual se adicionou 0,1 ml de H₂O₂ a 1%. Depois de efectuada a

lavagem no mesmo tampão, os fragmentos foram pré-fixados em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão durante uma hora a 4° C e preparados para a microscopia electrónica de acordo com as técnicas já referidas na alínea anterior.

O mesmo procedimento foi efectuado para os animais intoxicados com a Nitrofurazona (n = 24).

4. Protocolo das experiências com o objectivo de estudar a possível reversibilidade da acção da Nitrofurazona no epitélio seminíparo

Os animais utilizados nestas experiências (n = 18) foram previamente submetidos à intoxicação por via subcutânea com Nitrofurazona, de acordo com o protocolo já descrito (ver pág. 20). Findo o período de intoxicação, os animais foram mantidos durante 30 dias sem qualquer tratamento. Para o estudo aos microscópios óptico e electrónico os fragmentos de testículo foram processados de acordo com as técnicas de fixação, inclusão e corte também já referidas (ver pág. 21).

A fim de testar a permeabilidade da barreira hemato-testicular nestes animais efectuaram-se experiências in vitro, conforme o procedimento experimental mencionado na alínea 3.

CAPITULO II

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA ESPERMATOGÉNESE PROVOCADAS PELA NITROFURAZONA

2.1. INTRODUÇÃO

Como referimos no início deste trabalho, os nitrofuranos têm vindo a revelar acções tóxicas específicas que afectam o epitélio seminiparo com consequente alteração da espermatogénese. A acção tóxica dos nitrofuranos sobre o epitélio seminiparo têm sido motivo de alguns trabalhos com o objectivo de identificar as alterações produzidas, o seu mecanismo e a sua reversibilidade (ver revisão por Silva 1976). Assim, em estudos experimentais com ratos tratados durante 5 - 30 dias com Furadroxil Steinberger e Nelson (1957) observaram ao fim de dez dias de administração desta substância, paragem da espermatogénese na fase de espermatócito primário e alterações degenerativas do epitélio dos tubos seminiparos. Ao 15º dia, o epitélio era constituído unicamente por células de Sertoli, espermatogónias e alguns espermatócitos primários. Estes autores assinalaram ainda que, após paragem da administração da

droga se dava a regeneração do epitélio seminíparo, observando-se espermatozóides maduros ao fim de dois meses. São também de destacar as alterações descritas por Ali (1984) na morfologia dos tubos seminíparos de galos tratados com Furazolidona. Em ambos os trabalhos nada é referido quanto ao mecanismo de acção destes nitrofuranos.

No que se refere à Nitrofurazona, em 1953 Nelson e Steinberger descreveram em ratos tratados com este fármaco, a paragem da espermatogénese no estágio de espermátócito primário. No mesmo ano, Paul e colaboradores (1953) observaram e descreveram atrofia dos tubos seminíparos do rato após duas semanas de administração da Nitrofurazona, verificando ausência de espermátides e espermatozóides. Em ambos os trabalhos é assinalado que se tratam de alterações reversíveis.

Posteriormente Miyagi e colaboradores (1964) confirmaram que a Nitrofurazona provocava efeitos nocivos no testículo do rato, tendo como resultado a degenerescência e atrofia nos tubos seminíparos.

Em galos sexualmente imaturos foi também descrito (Neuman e col. 1965) que a exposição à Nitrofurazona provoca um atraso significativo na diferenciação das células germinativas.

Em 1966 Uematsu descreveu que, 72 horas após alimentação com uma dieta contendo Nitrofurazona se observavam modificações ultraestruturais em todas as células germinativas do testículo de rato, com exceção das espermatogônias. Essas alterações eram inicialmente do tipo degenerativo, evoluindo para necrótico quando se prolongava a administração do fármaco.

Na sequência destes resultados, estudos efectuados in vitro por Albert e colaboradores (1975) demonstraram que a Nitrofurazona também tinha efeitos adversos sobre a mobilidade dos espermatozoides. Assim, após a incubação durante 5 minutos em meio contendo uma concentração de 1 mg/ml de Nitrofurazona, observaram a total imobilização dos espermatozoides. Também concluíram que a percentagem de células imobilizadas variava com a concentração do fármaco no meio, observando-se já uma grande percentagem de células imobilizadas com concentrações de 0,5 mg/ml.

Neste capítulo descrevemos as alterações ultraestruturais do epitélio seminíparo observadas no ratinho adulto após injeção de Nitrofurazona por via subcutânea, de acordo com o protocolo referido no capítulo de materiais e métodos.

2.2. RESULTADOS

Os tubos seminíparos de animais controle apresentam a morfologia característica (Figs. 1a e 1c) não se constatando alterações morfológicas nos elementos que os constituem.

Nos animais sacrificados após 10 dias de administração de Nitrofurazona o testículo tinha uma coloração amarelo-acastanhada e estava nitidamente reduzido de volume. A observação ao microscópio óptico dos cortes semifinos dos blocos correspondentes às colheitas destes animais revelou nitida desorganização do epitélio seminíparo, assim como alterações degenerativas de todos os elementos celulares com exceção das espermatogônias e de alguns espermátócitos (Figs. 1b e 1d).

A observação ao microscópio óptico de cortes transversais e longitudinais de tubos seminíparos de animais intoxicados pôs em evidência uma clara modificação do padrão de organização do tubo seminíparo, notando-se o desaparecimento do lume e a existência de espaços alargados (vacuolização intra-epitelial) entre as células do epitélio (Figs. 1b e 1d). De uma forma geral, os núcleos das células germinativas apresentam uma coloração mais intensa.

As observações ao microscópio electrónico de cortes finos de tubos seminíparos dos animais intoxicados revelam alterações ultraestruturais em quase todos os elementos celulares (Fig. 2).

A existência de espaços alargados e a separação dos elementos celulares do epitélio seminíparo põe em evidência nitidas alterações de relação entre as células germinativas e sugere o desaparecimento das pontes intercelulares, nomeadamente entre alguns desses elementos (Fig. 2).

Na membrana basal não se observaram sinais de alterações morfológicas (Fig. 2).

2.2.1. Alterações nas células germinativas

Nas preparações observadas ao microscópio electrónico de cortes de tubos seminíparos dos animais intoxicados com Nitrofurazona também são evidentes modificações degenerativas nas células da linhagem germinal. Além de discontinuidades nas membranas celulares, as alterações mais frequentes são:

- a - condensação heterogénea da cromatina;
- b - irregularidades na disposição e volume do sistema acrosómico;

- c - dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, particularmente nitida na cisterna perinuclear;
- d - irregularidade e variabilidade dos perfis mitocondriais;
- e - alterações no complexo axonémico.

O citoplasma das células germinativas de animais intoxicados contém numerosos vacúolos de dimensões variadas, contrastando com as observações efectuadas no epitélio seminíparo de animais controlo.

Nas células do epitélio seminíparo de animais intoxicados a condensação da cromatina é geralmente heterogénea, observando-se massas de heterocromatina dispostas de forma irregular, entre as quais sobressaem numerosos grânulos densos (Figs. 3a e 3d). De igual modo, nalgumas preparações observou-se uma nitida dilatação da cisterna perinuclear, sendo o espaço entre as duas membranas do envólucro ocupadas por uma substância grânulo-filamentosa pouco densa aos electrões (Fig. 3b). Também se observaram frequentemente anomalias muito acentuadas na forma do núcleo e na disposição da cisterna perinuclear cuja formação parece incompleta, resultando uma aparente contiguidade entre o

nucleoplasma e o citoplasma (Fig. 3c). Nestas células observa-se ainda um nítido aumento no volume do espaço sub-acrosômico, verificando-se o afastamento do acrosoma. Contrariamente ao observado nos tubos seminíparos dos animais normais, é evidente a dilatação irregular das cisternas perinucleares, contendo nalguns casos, acumulações de material granular (Figs. 3d e 3e).

Nas espermatídes, as cisternas golgianas que participam na formação do sistema acrosômico estão nitidamente dilatadas (Fig. 4a). O sistema acrosômico tem aparentemente um volume maior, contornos irregulares e os elementos que o constituem apresentam formas muito bizarras, apresentando protuberâncias ou prolongamentos na sua superfície, o que confere à espermatíde um aspecto nitidamente anormal (Figs. 4b e 4c). As vesículas periacrosômicas contêm pequenos agregados de material granular e pequenas vesículas (Fig. 4c). São também frequentes vesículas adicionais contendo no seu interior uma substância finamente granular (Fig. 4d). Nos animais intoxicados o grânulo acrosômico das espermatídes é frequentemente de maior volume (Fig. 4e). Algumas vezes foram também observadas células com vários acrosomas (Fig. 4f).

De uma forma geral, o citoplasma das espermatídes

degeneradas é mais denso e vacuolizado. Nestas células, os microtúbulos da manchete mantêm-se aparentemente sem alterações e têm uma orientação normal.

A observação ao microscópio electrónico revelou multiplicidade nos defeitos estruturais do flagelo. Assim, nas espermatídes em fases mais avançadas da sua diferenciação as alterações na região do flagelo são muito acentuadas, sendo especialmente nítidas no complexo mitocondrial e no axonema. As figuras 5a a 5g ilustram o espectro de anormalidades no flagelo de espermatídes de ratinhos tratados com a Nitrofurazona. Nalgumas células não se observa o axonema ou ainda se verifica a presença de axonemas múltiplos, envolvidos pela mesma membrana citoplasmática (Figs. 5a e 5b). Também se observou na região do colo da espermatíde, a inserção de dois esboços flagelares (Fig. 5c). Em cortes transversais constatou-se muito frequentemente a desorganização ou mesmo a perda de elementos do complexo axonémico, nomeadamente o desaparecimento do par central (Fig. 5e). Por vezes não se observa a membrana celular em tais flagelos desorganizados. Os pares de microtúbulos periféricos e fibras externas têm aparentemente uma disposição normal, muito embora também possam apresentar formas irregulares. A interrupção na continuidade da bainha mitocondrial ao longo do

comprimento da peça intermédia foi também observada (Figs. 5d e 5g). A sua morfologia está nitidamente alterada, não sendo possível reconhecer as suas cristas (Fig. 5f). No entanto, a observação destas alterações mitocondriais é menos frequente do que as anomalias observadas no sistema acrosômico e no núcleo.

Nos tubos seminíparos dos animais tratados com Nitrofurazona coexistem espermátides de morfologia normal e de morfologia atípica, sendo numerosas as formas aberrantes. A figura 6 ilustra a diversidade de anomalias morfológicas verificadas nas espermátides de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona.

2.2.2. Células multinucleadas

Embora em pequeno número, observam-se no epitélio seminíparo de murganhos tratados com Nitrofurazona, células multinucleadas (2 a 4 núcleos) (Figs. 7a-7d e Figs. 8a-8c).

Algumas destas células, provavelmente resultantes da agregação de espermátides jovens, têm um nucleoplasma homogéneo e finamente granular (Figs. 7a e 7c). Outras,

são formadas por agregados de espermatídes nitidamente em degenerescência, apresentando os respectivos núcleos um nucleoplasma granular e heterogéneo (Figs. 7b e 7d).

Entre as células multinucleadas e as células de Sertoli não se observam especializações juncionais. Contudo, nalguns casos observaram-se pontes intercelulares entre células multinucleadas e espermatídes adjacentes.

As células multinucleadas podem ainda apresentar estruturas flagelares de morfologia aparentemente normal. Com frequência tem dois ou mais núcleos associados a uma vesícula do sistema acrosômico, contendo inclusões vesiculares. Nalguns casos, os núcleos destas células estão associados a acrosomas bizarros, contendo material pouco denso aos electrões. Nalgumas imagens a lâmina central do acrosoma insinua-se entre as massas nucleares. Também se observaram frequentemente células multinucleadas cujos núcleos apresentam a cromatina muito condensada (Figs. 8a-8c). As principais características morfológicas das células multinucleadas observadas em tubos seminíparos de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona são apresentadas nas figuras 8d e 8e.

2.2.3. Alterações nas células de Sertoli

A vacuolização observada ao microscópio óptico no epitélio seminíparo dos animais tratados com Nitrofurazona corresponde a nível ultraestrutural ao alargamento dos espaços intercelulares e à presença de numerosos vacúolos nas regiões basal a apical das células de Sertoli (Figs. 9a e 9b). Estes vacúolos, de dimensões variadas, parecem resultar da distensão das cisternas do retículo endoplasmático liso. No que se refere a outras alterações ultraestruturais observam-se nas células de Sertoli numerosos lisosomas e nas mitocôndrias uma aparente desorganização das cristas. O núcleo mantém uma morfologia normal (Fig. 9a). Em certas áreas do tubo seminíparo o grau de alteração das células de Sertoli torna mesmo difícil identificar os diferentes organitos citoplasmáticos (ver Fig. 2).

O retículo endoplasmático liso encontra-se severamente alterado, especialmente as cisternas associadas aos complexos juncionais que se apresentam geralmente muito dilatadas (Fig. 9c), contrariamente às imagens obtidas de animais controlo cujos complexos juncionais são formados por junções de oclusão associadas a microfilamentos e cisternas do retículo

endoplasmático liso paralelas à superfície celular.

Nas regiões que separam as células de Sertoli das células germinativas, observa-se alargamento dos espaços intercelulares tornando-se mais aparente as relações entre as células germinais adjacentes (ver Fig. 2). Contudo em algumas zonas continuam a observar-se complexos juncionais inter-sertolianos aparentemente integros, embora apresentando as cisternas dilatadas.

2.3. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos põem em evidência nitidas alterações no epitélio seminiparo dos animais intoxicados com Nitrofurazona. As alterações observadas são de um modo geral semelhantes às descritas na literatura na sequência da acção de outros agentes antiespermatogénicos (Meistrich e col. 1982, ver revisão por Davies 1980 e Drife 1987).

E reconhecida a sensibilidade do epitélio seminiparo a uma grande variedade de agentes físicos e químicos com conseqüente degenerescência das células germinativas e vacuolização do epitélio (Chapin e col.

1983, Bi e col. 1985, Corrier e col. 1985, McNeil e Bhatnagar 1985, Boekelheide 1988, Kainz e col. 1988, Audring e col. 1989, Kadota e col. 1989, Mesfin e col. 1989). Entre as alterações referidas destacam-se os vacúolos intracelulares e intercelulares que também já foram referidos na literatura (Abreu e David-Ferreira 1982, Hoffer 1983). A susceptibilidade do epitélio seminiparo a agentes químicos e outros factores tem sido atribuída à complexidade e duração do processo espermatogénico (Russell 1983, Gray 1986). Contudo, também em situações normais tem sido observada uma ligeira vacuolização deste epitélio associada à degenerescência espontânea de algumas células durante o processo espermatogénico (Amann 1962, Fawcett 1975, Russell e Clermont 1977, Russell e col. 1981, Hoffer 1983, Morton e col. 1986, Veeramachanemi e col. 1986, Peirce e Breed 1987). Também estudos recentes puseram em evidência que no ratinho, uma certa percentagem de células espermatogénicas apresenta morfologia anormal. A frequência de tais anomalias varia nas diferentes estirpes estudadas mas apresenta um padrão constante para cada estirpe (Ribeiro e col. 1987).

Embora a estrutura do epitélio seminiparo esteja alterada não observamos modificações a nível da parede tubular, contrariamente ao que tem sido descrito

em várias situações experimentais e patológicas, onde a alteração da espermatogênese é acompanhada do espessamento da lâmina basal (Uematsu 1966, Anosa e Kaneko 1984, Amat e col. 1985, Corrier e col. 1985, Swan e Christidis 1987, Johansen e col. 1988, Hamasaki 1989, Kadota e col. 1989, Martinova e col. 1989, Saegusa 1989).

O desaparecimento do lume tubular que também observamos nos animais tratados tem sido referido na literatura, em relação a alguns agentes químicos que afectam o testículo (Foster e col. 1982, Snow e Hays 1983, Chapin e col. 1984, Creasy e col. 1987, Pelletier e Friend 1986, Hamasaki 1989) e também em tubos seminíparos de ratos irradiados no período pré-natal (Abreu e David-Ferreira 1982, Hatier e col. 1982). Entre as explicações possíveis para o desaparecimento do lume tubular que não é discutido em nenhum dos trabalhos que a referem, é que seja uma consequência da obliteração do lume por elementos resultantes da degenerescência das células germinativas e consequente desorganização do epitélio. Uma outra explicação possível, mas sem suporte experimental é que a produção e pressão do "fluido tubular" estejam diminuídas nos animais tratados com agentes que provocam degenerescência do epitélio e lesões nas

células de Sertoli.

No presente estudo, a vacuolização do epitélio seminíparo e as alterações degenerativas de todos os seus elementos, com excepção das espermatogónias e da membrana basal, foi unicamente observada nos animais tratados. Este facto sugere que as espermatogónias são mais resistentes ao tratamento com a Nitrofurazona o que é um indicativo da possível reversibilidade das alterações degenerativas observadas.

A desorganização na condensação da cromatina que observámos nas espermátides dos animais tratados com Nitrofurazona foi também observada por Ballachey e colaboradores (1987) em algumas espécies animais. Estes autores admitiram estar associado à infertilidade desses animais. A desorganização observada na condensação da cromatina nestes elementos celulares é um sinal da sua degenerescência e pode eventualmente estar associada a uma diminuição da sua fertilidade. Em 1979 Hrudka e Eljack e no ano seguinte Courtens e colaboradores (1980) também descreveram a condensação irregular da cromatina nas células germinativas de mamíferos, apresentando lesões testiculares após aplicação de um fumigante, o dibrometo de etileno. Em qualquer destes trabalhos não é referido o mecanismo dessa acção.

A presença de fagossomas e acentuada vacuolização nas células de Sertoli põe em evidência um nítido aumento da actividade fagocitária destas células, o que pode relacionar-se com as intensas alterações degenerativas do epitélio germinativo. A presença de inclusões heterogéneas no seu citoplasma, nomeadamente axonemas ou mesmo células germinativas degeneradas, pode interpretar-se como resultante da actividade fagocitária das células de Sertoli, que nesta situação são activas na remoção dos elementos em degenerescência, o que aliás tem sido sugerido por vários autores (Chemes 1986, Shemi e col. 1989). As alterações observadas nas células de Sertoli incluem rarefacção da matrix citoplasmática e uma aparente diminuição dos seus organitos, nomeadamente do reticulo endoplasmático liso. Imagens semelhantes às referidas anteriormente como a retracção das zonas laterais da célula de Sertoli, tendo como consequência uma aproximação das células germinativas a que estão associadas, foram também observadas por vários autores em tubos seminíparos de animais submetidos a fármacos para o tratamento da Doença de Chagas (Bernacchi e col. 1986), ou com substâncias utilizadas no fabrico de plásticos e tintas (Creasy e col. 1987, Blackburn e col. 1988). É possível que a desorganização verificada no epitélio seminíparo de animais intoxicados com a

Nitrofurazona seja uma consequência da retracção observada nas células de Sertoli.

A vacuolização não é seguramente uma reacção específica da célula de Sertoli à acção da Nitrofurazona. Tem sido descrita em várias situações de patologia testicular como por exemplo na criptorquidia (Singh e Ezeasor, 1989). As células de Sertoli servem de suporte mecânico e participam directa ou indirectamente no metabolismo das células germinativas (Bloom e Fawcett 1975). Contudo, tem sido ainda atribuído a estas células um papel activo no início, maturação e controlo da espermatogénese (Philips e col. 1985). Sabe-se que a espermiogénese é um processo que requer células de Sertoli integras. Por outro lado, a organização fundamental e a integridade dos tubos seminíparos é mantida pelas células de Sertoli (Russell 1983). Estas células são responsáveis pelo metabolismo das células germinativas, pela manutenção da barreira hemato-testicular, formação de substâncias específicas e coordenação da espermatogénese (Russell 1984, Russell e Peterson 1985, Tindall e col. 1985, Parvinen e Mali 1988, Shenck e Schill 1988, Heindel e Treinen 1989, Sakai e Yamashina 1989). Podemos pois admitir que as alterações do epitélio seminíparo observadas nos ratinhos tratados com Nitrofurazona

resultem de uma acção directa desta substância nas células de Sertoli, sendo as lesões observadas nas células germinativas uma consequência da disfunção daqueles elementos celulares. Do mesmo modo e de acordo com Wong e colaboradores (1988) como as células de Sertoli desempenham um papel importante na maturação das células germinativas as suas alterações podem por isso afectar a espermatogénese.

Uma das observações que consideramos mais importantes neste estudo é a presença, em certas áreas do tubo seminíparo, de cisternas muito dilatadas e descontinuidades de membrana nos complexos juncionais inter-sertolianos, com consequente alteração do microambiente do compartimento adluminal do tubo, que se considera indispensável para a diferenciação das células espermatogénicas e prosseguimento do processo espermatogénico (Vogl 1989). Trabalhos anteriores com marcadores electrodensos indicaram que, nos animais adultos, as junções de oclusão entre células de Sertoli são a base morfológica da barreira hemato-testicular (Dym e Fawcett 1970, Fawcett e col. 1970, Dym 1973). Estas junções dividem o tubo seminíparo em dois compartimentos, com microambientes específicos. As alterações que observamos na morfologia dos complexos juncionais inter-sertolianos levam-nos a admitir que

existam alterações funcionais da barreira hemato-testicular. Aspectos idênticos, nomeadamente a dilatação das junções inter-sertolianas foram também observadas e referidas, entre outros, por Kainz e colaboradores (1988) em ratos intoxicados com Gossipol e por Huang e colaboradores (1988), em trabalhos experimentais sobre hipovitaminose A.

Nos nossos ensaios observámos nitidas alterações dos elementos germinativos do epitélio seminíparo nomeadamente a presença de células multinucleadas. Estes elementos têm sido referidos na literatura com outras designações, nomeadamente espermátides multinucleadas, sincício de células gigantes e simplasma multinucleado (Morton e col. 1986). A formação das células multinucleadas tem sido interpretada como uma resposta degenerativa a vários factores. Foram descritas células multinucleadas em tubos seminíparos após a ligação dos ductos eferentes (Pessoa 1976), vasectomia (Alexander e Tung 1977, Flickinger e col. 1990) orquite por tripanosomas (Anosa e Kaneko 1984) ou tratamento com agentes quimicos entre os quais a Nitrofurazona (Uematsu 1966, Chapin e col. 1983, Bi e col. 1985, Corrier e col. 1985, Linder e col. 1986, Boekelheide 1988, Pereira e col. 1988d, Fukuoka e col. 1989, Mesfin e col. 1989). Embora a presença destas células esteja associada a

processos degenerativos do tubo seminiparo (Holstein e Eckmann 1986) também foram descritas células multinucleadas em animais normais, sendo nestes casos interpretadas como elementos normais do epitélio seminiparo (Bryan 1971, Bryan e Wolosewick 1973, Morton e col. 1986, Schenck e Schill 1988, Hamasaki 1989). Factores ambientais tais como a dieta e mesmo factores climáticos, também podem induzir a formação destes elementos multinucleados no epitélio seminiparo de animais normais (Feito 1990).

Sabe-se, na sequência dos trabalhos de Fawcett e colaboradores (Dym e Fawcett 1971, Bloom e Fawcett 1975) que durante a espermatogénese as células germinativas permanecem ligadas por pontes intercelulares, só se separando na fase de maturação e libertação dos espermatozoides (Bloom e Fawcett 1975). Assim, de uma alteração do seu mecanismo de separação pode resultar a formação de sincícios multinucleados.

Uma das razões para a formação de espermatozoides macrocéfalos deve-se, segundo Escalier (1983), a um defeito na citocinese. Holstein e Eckmann (1986) e Burkhart e Malling (1989) consideram ainda um outro processo responsável pela formação de elementos multinucleadas que, segundo estes autores resultariam da

fusão das membranas plasmáticas de células germinativas adjacentes. Estes dois mecanismos de formação das células multinucleadas, nomeadamente a fusão de espermátides e o alargamento das pontes intercitoplasmáticas entre células germinativas adjacentes é também partilhada por Morton e colaboradores (1986) e Flickinger e colaboradores (1990). Das observações que realizámos concluímos que as células multinucleadas presentes nos animais intoxicados pela Nitrofurazona resultam da alteração do processo de citocinese.

Na sequência de uma citocinese incompleta também podem resultar células com vários flagelos (Bartoove e col. 1981). Axonemas supranumerários poderão também resultar de alterações nas pontes intercelulares ou mesmo à sua ausência (Swan e Christidis 1987). A observação de múltiplos flagelos rodeados pelo mesmo plasmalema que observámos no presente trabalho, foi também assinalada por outros autores em casos de infertilidade (Czaker e Mayr 1984, Escalier e Serres 1985), ou na sequência da acção de agentes químicos como o Gossipol (Hoffer 1982, 1983) e o dibromocloropropano (Shemi e col. 1989).

Alterações nos flagelos das células germinativas do epitélio seminiparo têm sido descritas como constituindo

uma anomalia frequente durante a sua diferenciação (Holstein 1975). Nas nossas condições experimentais também foram observadas alterações na organização dos microtúbulos do axonema de um grande número de espermatídes. Surpreendentemente, não observámos modificações nos feixes de fibras axiais do flagelo, o que sugere que o desenvolvimento do sistema centriolar não foi totalmente afectado pela administração da Nitrofurazona.

No presente estudo foram observadas com alguma frequência alterações morfológicas nas mitocôndrias bem como na sua disposição ao longo do flagelo das espermatídes, verificando-se a interrupção na continuidade da bainha mitocondrial, o que também já foi descrito na literatura, na sequência de intoxicação experimental de ratos com agentes antiespermatogénicos (Oko e Hrudka 1982, Hoffer 1982, 1983 e Shemi e col. 1989) e com etanol (Anderson e col. 1989). Uma vez que estes organitos constituem a fonte de energia de que depende o movimento do flagelo do espermatozóide, a sua disposição irregular pode estar associada a alterações da propulsão do espermatozóide (Bartoove e col. 1981). Consideramos ainda e de acordo com Swan e Christidis (1987) que nas células germinativas que apresentam

múltiplos axonemas, a propagação de um movimento coordenado, seria um factor de alteração dessas células, podendo assim contribuir para as alterações na sua motilidade. Deste modo, admitimos que a ocorrência de tais anomalias na estrutura do flagelo possa contribuir para uma motilidade anormal ou mesmo imobilidade dos espermatozoides, com óbvias consequências na capacidade de fertilização destas células.

O facto de não existirem microtúbulos centrais em algumas axonemas pode igualmente estar relacionado com consequente imobilidade dos espermatozoides (McClure e col. 1983). Albert e colaboradores (1975) referiram a acção da Nitrofurazona na motilidade dos espermatozoides humanos, tendo constatado nos estudos efectuados in vitro que se observava imobilização dos mesmos, quando incubados com o referido nitrofurano.

Sabe-se que o complexo de Golgi está envolvido na formação do sistema acrosómico, constituindo o primeiro passo da espermiogénese. Da alteração deste complexo pode resultar uma morfogénese irregular ou agénese completa do acrosoma (Bartoove e col. 1981). Esta poderá, portanto, ser uma explicação para as anomalias morfológicas que observamos no presente trabalho. Inclusões vesiculares da matrix acrosómica foram também

observadas por Hrudka e Eljack (1979) em espermátides de carneiros intoxicados com um fumigante, o dibrometo de etileno e em animais que foram submetidos à acção de factores climáticos e nutricionais (Feito 1990).

Sabe-se que a membrana acrosômica interna desempenha um papel importante na interacção com o oócito durante a fertilização. Esta conclusão baseia-se em estudos ultraestruturais sobre a interacção entre as microvilosidades da superfície do oócito e a membrana acrosômica interna (Yanaguimachi e Noda 1970, Bedford e col. 1978). Como muitas espermátides apresentam alterações morfológicas da membrana interna do acrosoma, não é de surpreender que a sua capacidade de se ligar ao oócito durante a fertilização seja deficiente.

A Nitrofurazona é um agente tóxico para o testículo do ratinho, sendo as alterações que provoca mais nitidas do que as descritas para outros nitrofuranos incluindo o Furadroxil (Steinberger e Nelson 1957), a Furadantina (Nelson e Bunge 1957), a Furazolidona (Ali 1984, Quesada e col. 1987) e a Furaltadona (Miyaji e col. 1964).

As alterações que observámos no testículo do ratinho após administração subcutânea de Nitrofurazona demonstram que o epitélio seminíparo é, neste modelo experimental, muito sensível a este fármaco. Confirma-se

assim que, também no ratinho, se observam as alterações já descritas no rato (Uematsu 1986, Hagenäs e col. 1978). As modificações histológicas e ultraestruturais observadas estão seguramente associadas à redução da fertilidade dos animais tratados.



universidade da aveiro
SBIDM
oferta

ILUSTRAÇÕES

FIG. 1 — TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS COM 70 DIAS DE IDADE

Cortes semifinos corados pelo Azul de Toluidina.

Fotografias ao microscópio óptico.

a. 220x; b. 220x; c. 600x; d. 600x

Corte transversal (a) e corte oblíquo (c) de tubos seminíparos de animais controle. O epitélio seminíparo apresenta a morfologia característica e o lume do tubo é aparente.

Corte transversal (b) e corte oblíquo (d) de tubos seminíparos de animais intoxicados com Nitrofurazona.

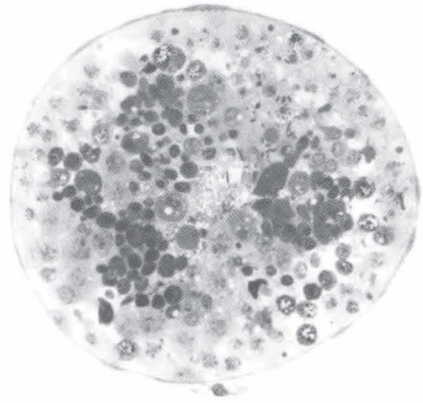
Notar a redução do lume tubular e a degenerescência de alguns elementos do epitélio seminíparo que se apresentam intensamente corados (b).

A desorganização do epitélio seminíparo é nítida, observando-se acentuada vacuolização intra-epitelial e degenerescência das células da linha germinativa com exceção das espermatogônias (d).

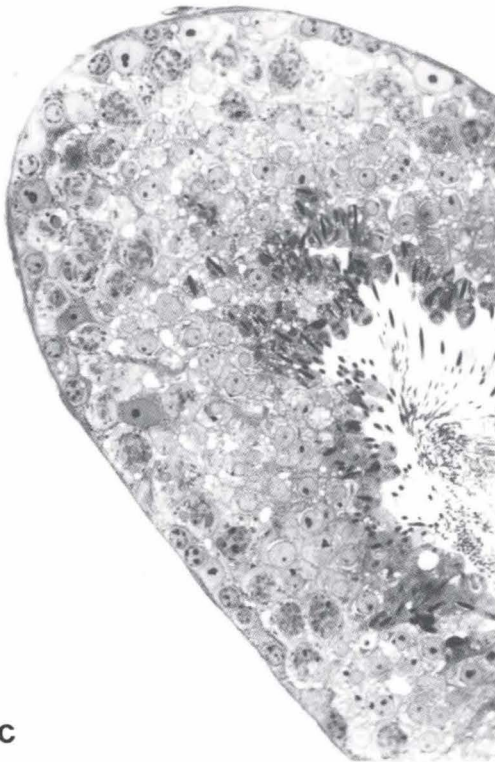
O lume do tubo seminíparo encontra-se completamente obstruído por elementos em degenerescência (d).



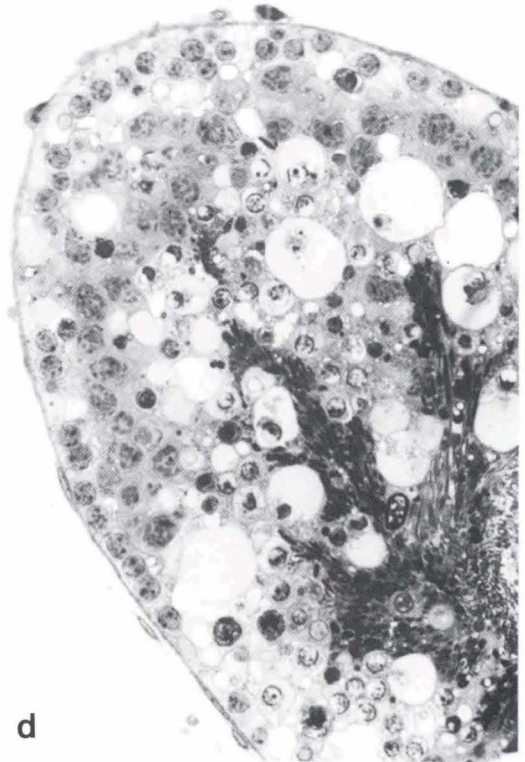
a



b



c



d

FIG. 2 — TUBO SEMINÍPARO DE RATINHO APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFUZAZONA

Microfotografia electrónica. 8 100x

O tecido peritubular e a lâmina basal têm aparência normal, assim como as células germinativas (G) situadas na região basal. Os elementos do compartimento adluminal do epitélio seminíparo apresentam nítidos sinais de degenerescência com picnose nuclear, vacuolização do citoplasma e desagregação dos organitos celulares. O citoplasma das células de Sertoli (S) é menos denso do que nos animais controlo. Na região basal observam-se dois grandes vacúolos intercelulares (★).

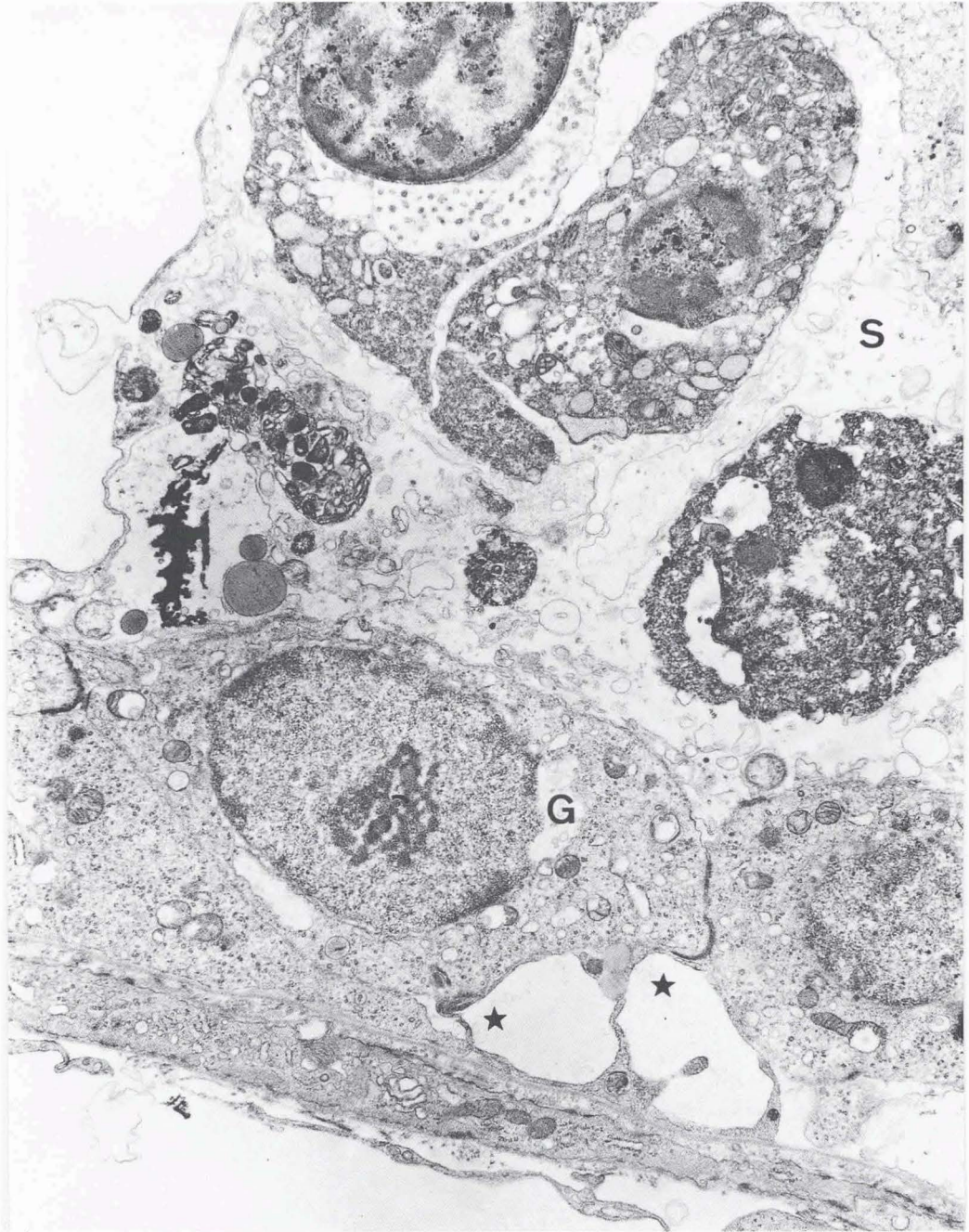


FIG. 3 — **TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA**

Microfotografias electrónicas.

a. 12 000x; b. 11 000x; c. 12 000x;
d. 10 000x; e. 12 000x

ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DAS ESPERMÁTIDES

Modificações do núcleo e cisterna perinuclear

Nas espermátides dos animais intoxicados com Nitrofurazona são nítidas as alterações nucleares, sendo de notar: irregularidades na condensação da cromatina (a-e), presença de grânulos densos no nucleoplasma (a-e), alargamento das cisternas perinucleares (c-e) em cujo interior se podem observar massas granulares (e), irregularidade na forma do núcleo (c) e formação incompleta da cisterna perinuclear (↑ ↑) (c, d).

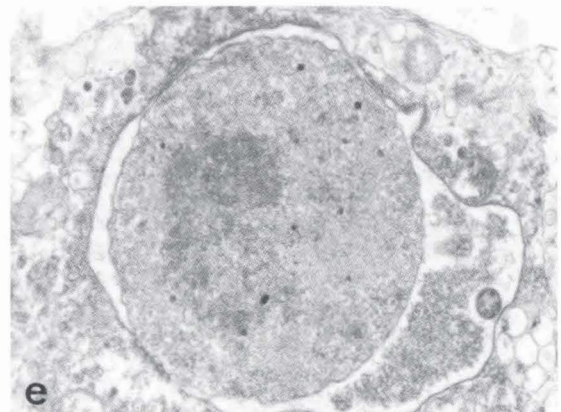
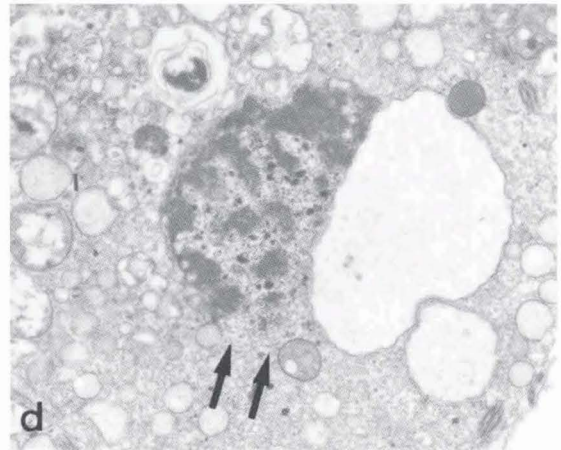
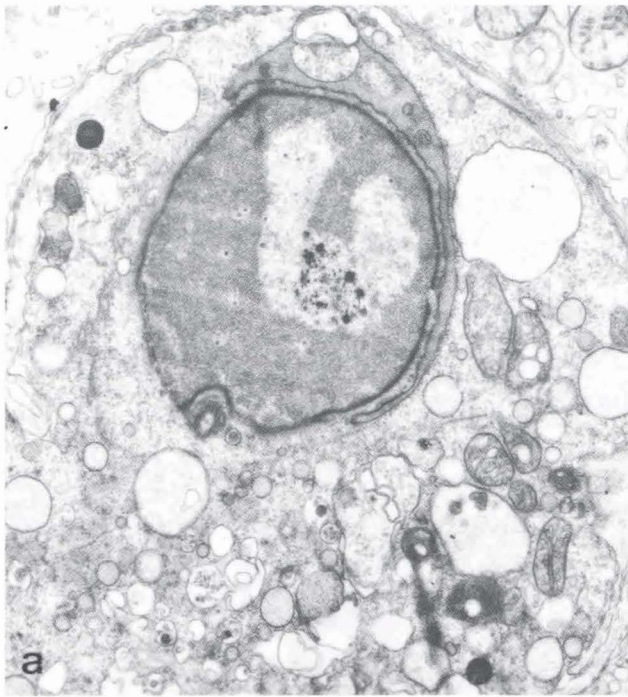


FIG. 4 — **TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA**

Microfotografias electrónicas.

a. 13 400x; b. 12 000x; c. 10 000x;

d. 9 000x; e. 12 000x; f. 10 000x

ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DAS ESPERMÁTIDES

Modificações do sistema acrosómico

Além das alterações nucleares observam-se nas espermátides de animais intoxicados com Nitrofurazona numerosas aberrações do sistema acrosómico, nomeadamente: presença na vesícula acrosómica de agregados multivesiculares (a) ou vesículas dispersas (c, d), grande irregularidade na forma da vesícula e grânulo acrosómico (b) e alterações do número e posição do grânulo acrosómico (e, f).

Notar também neste conjunto de microfotografias as irregularidades na condensação da cromatina (c-e), os grânulos densos intranucleares (c-e) e a degenerescência dos organitos celulares (b, c).

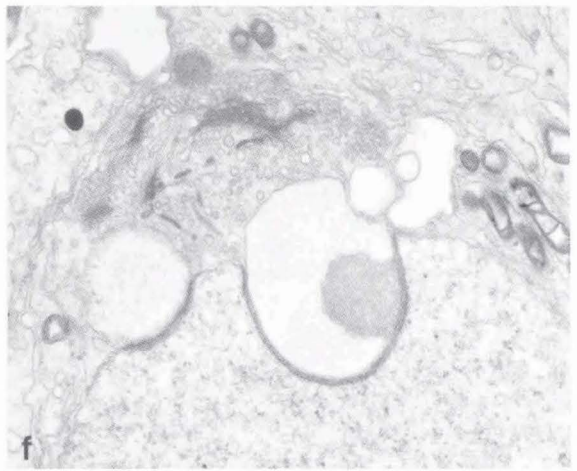
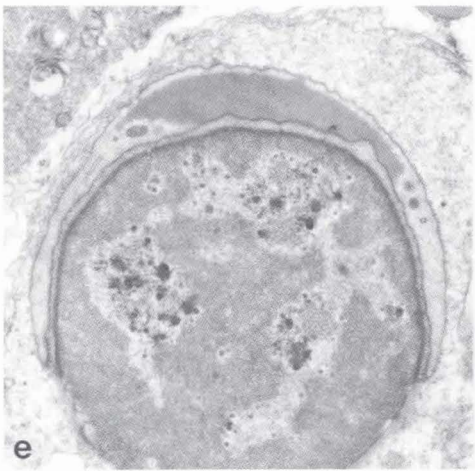
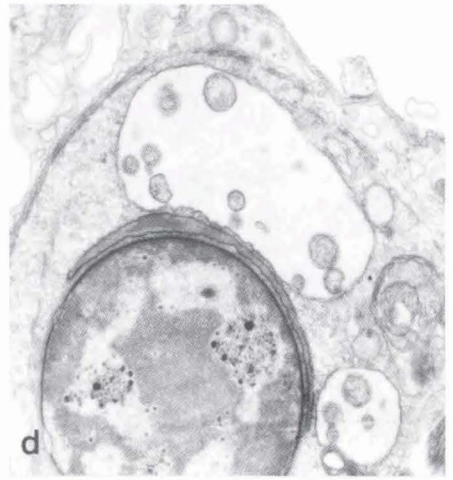
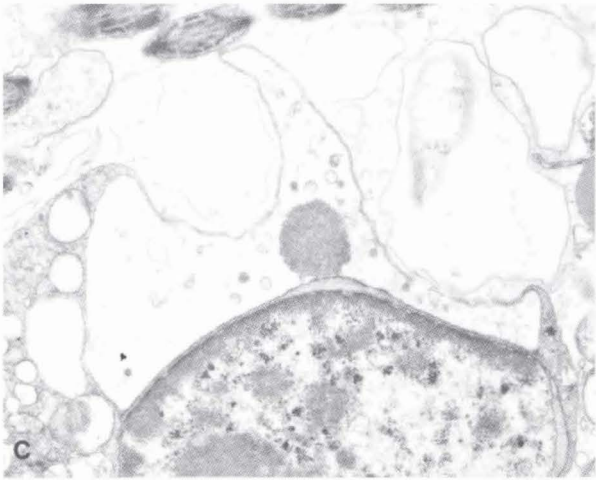
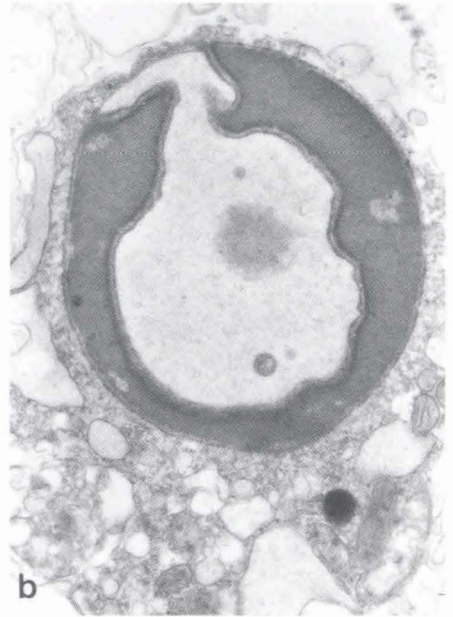
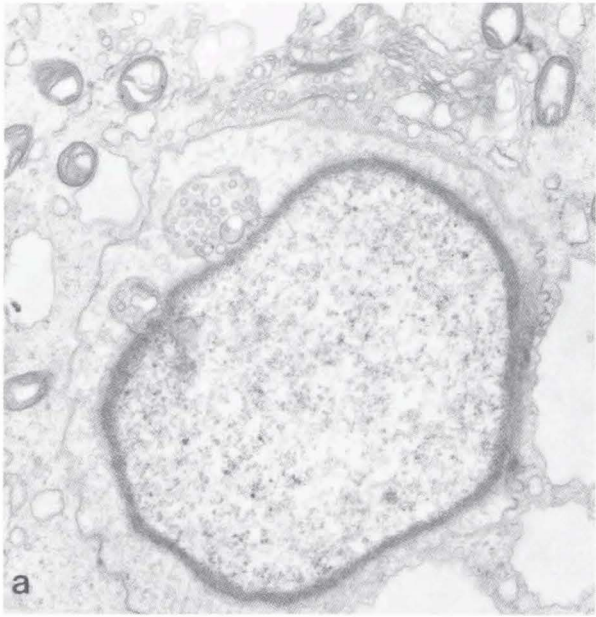


FIG. 5 — TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA

Microfotografias electrónicas.

a. 9 000x; b. 9 000x; c. 13 400x;

d. 9 000x; e. 40 000x; f. 10 700x;

g. 10 000x

ALTERAÇÕES DAS ESPERMÁTIDES

Modificações do flagelo

Nos animais intoxicados são frequentes as anomalias nos flagelos das espermátides. Neste conjunto de microfotografias estão documentadas algumas alterações mais comuns nos vários segmentos do flagelo nomeadamente: presença de peças intermédias múltiplas (a, b), duplicação dos elementos do colo (c), irregularidades na disposição (†) e ultraestrutura da bainha mitocondrial (d, f, g) e desorganização de elementos do axonema (e).

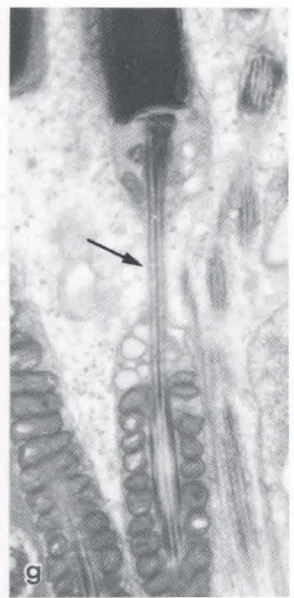
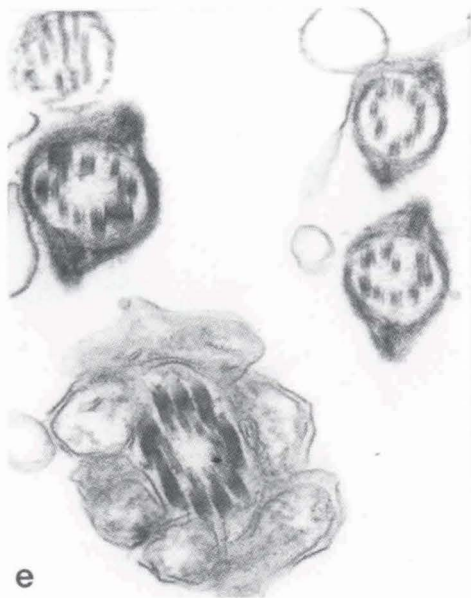
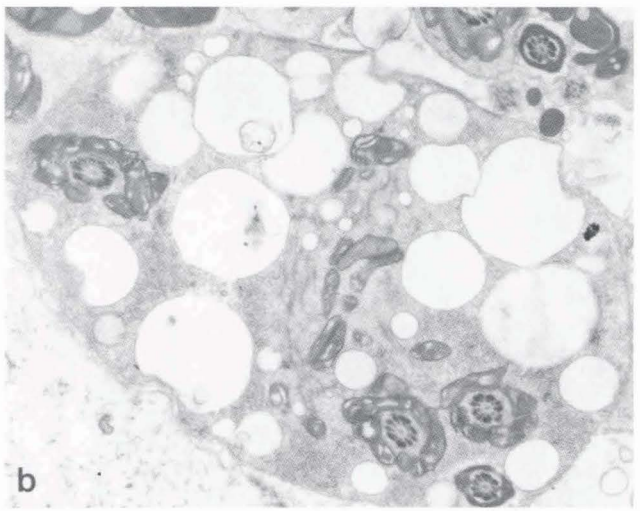


FIG. 6 — REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS ANOMALIAS MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM ESPERMÁTIDES DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA

Ax — axonema; **CP** — cisterna perinuclear
N — núcleo; **SA** — sistema acrosômico

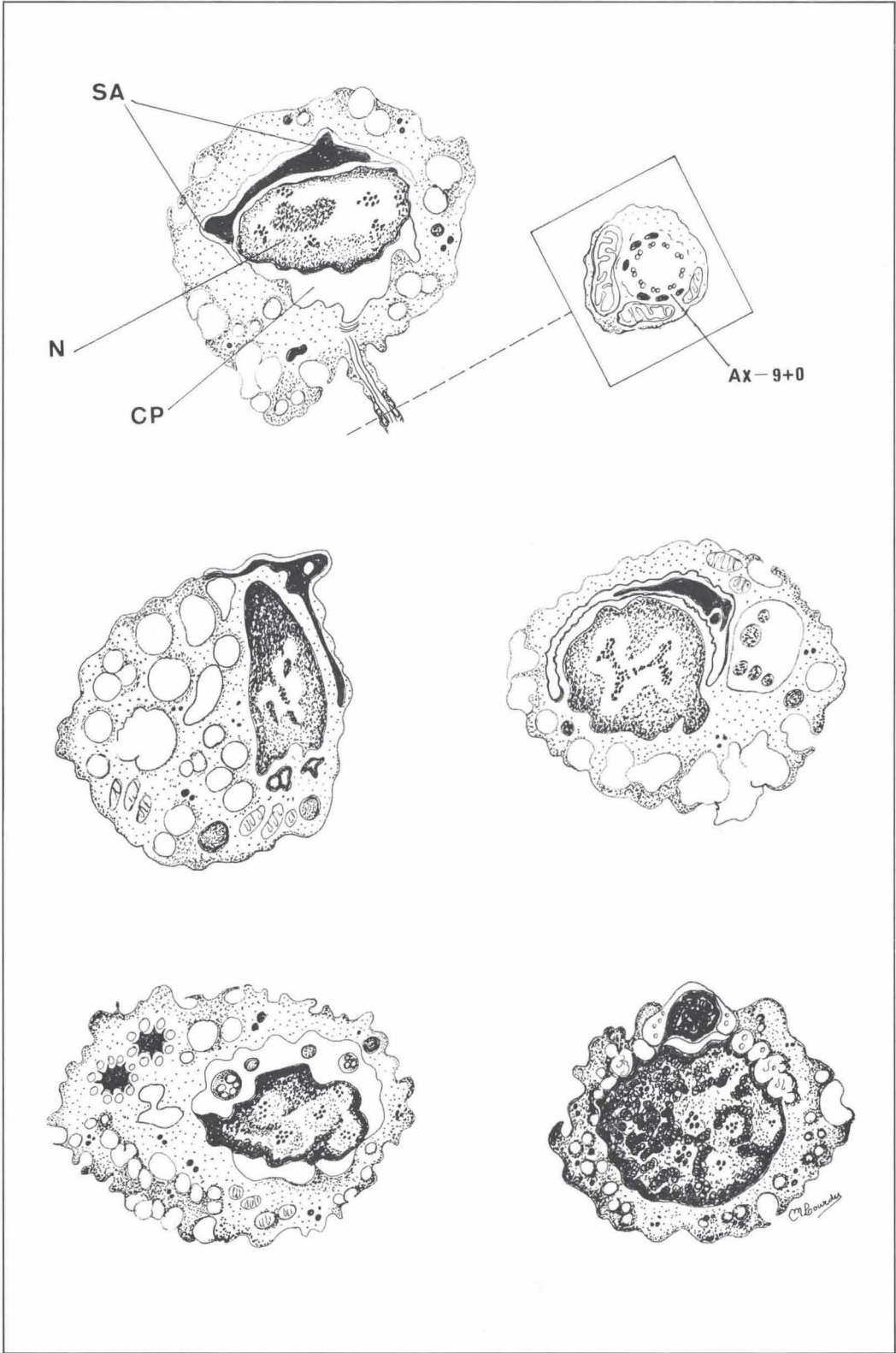


FIG. 7 — TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA

Microfotografias electrónicas.

a. 7 500x; b. 6 000x; c. 9 000x;
d. 4 500x

CÉLULAS MULTINUCLEADAS

A presença de células multinucleadas no epitélio seminíparo de animais sujeitos à acção de agentes tóxicos tem sido interpretada como um sinal de degenerescência dos elementos germinativos. Após intoxicação pela Nitrofurazona observam-se elementos multinucleados como se documenta nas figuras (a-d).

No caso da observação de elementos binucleados em cortes finos (a-c) a interpretação não deve excluir a possibilidade de corresponderem a perfis duplos de um único núcleo de morfologia muito irregular. Nas figuras b e d são também evidentes as alterações nucleares e citoplasmáticas já assinaladas.

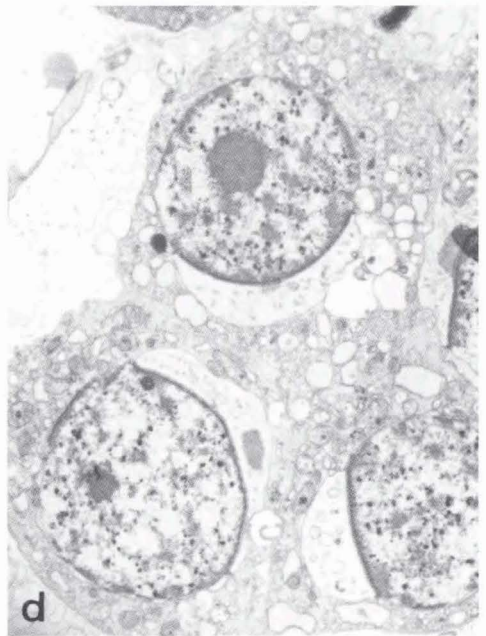
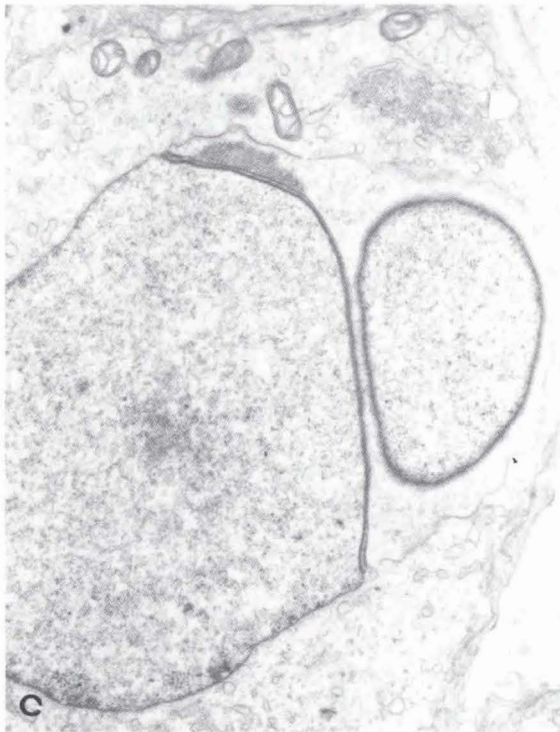
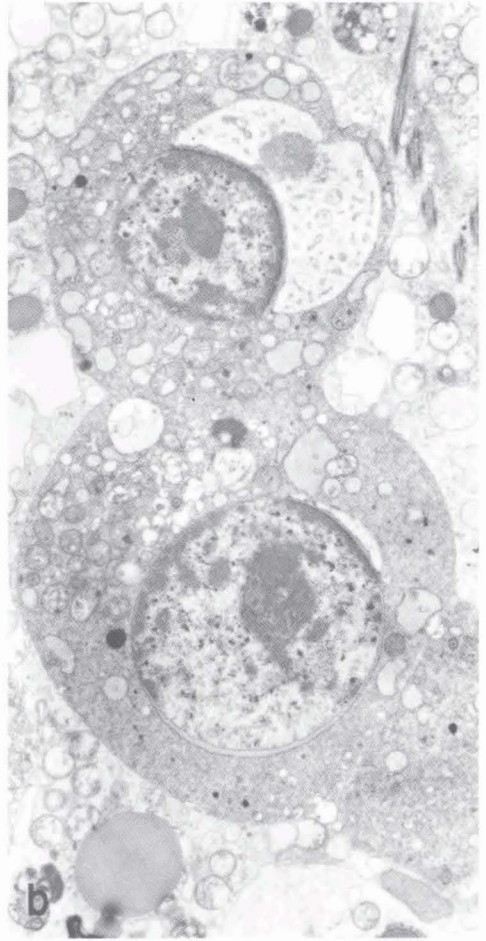
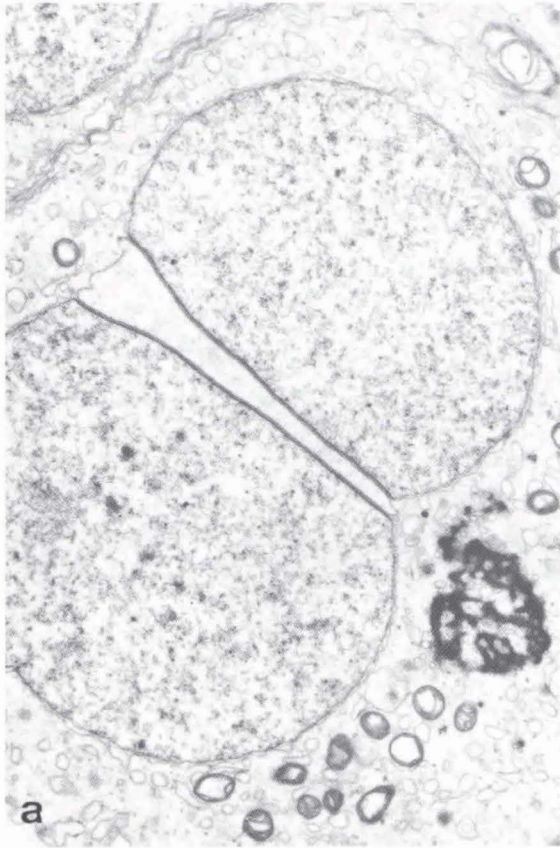


FIG. 8 — TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA

Microfotografias electrónicas.

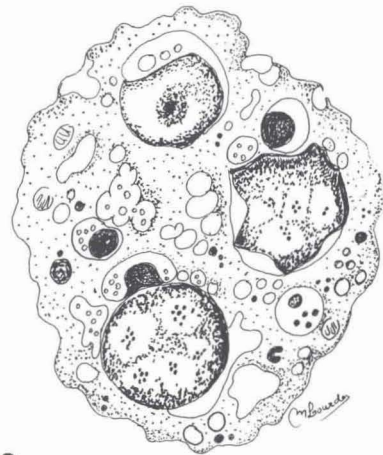
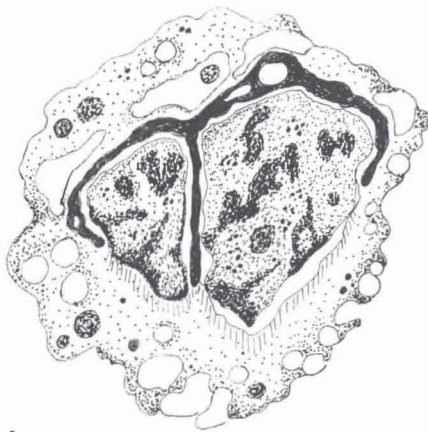
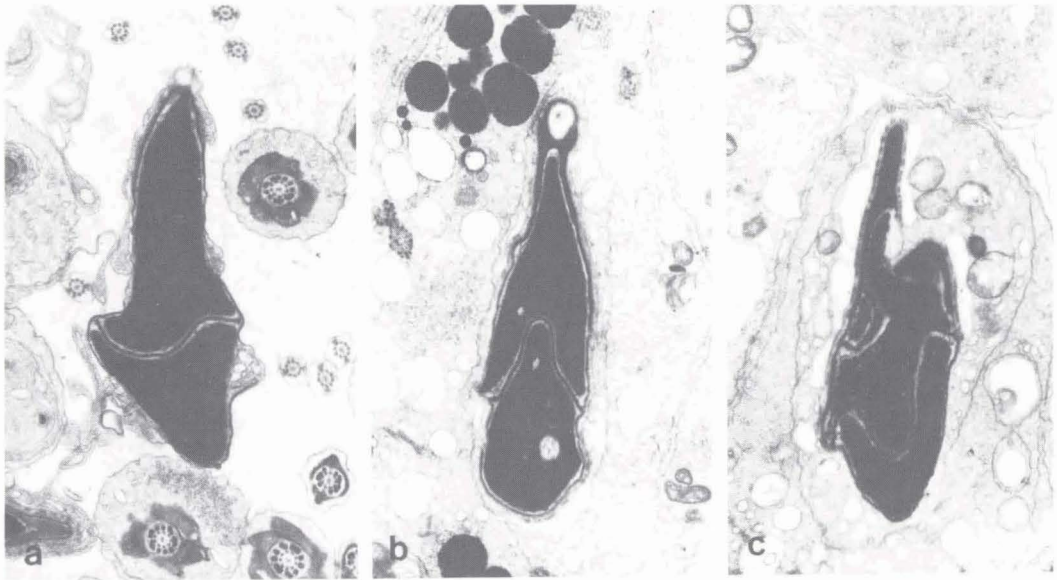
a. 10 000x; b. 9 100x; c. 7 500x

CÉLULAS MULTINUCLEADAS (Cont.)

Em espermátides em estádios mais avançados de maturação (a-c) observam-se anomalias que se podem interpretar como consequência da duplicação do núcleo antes do processo de maturação se ter iniciado.

Notar neste conjunto de microfotografias a aparente duplicação do núcleo e também as alterações do sistema acrosómico.

Em (d, e) representação esquemática das células multinucleadas observadas em tubos seminíparos de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona, em que estão assinaladas as alterações ultraestruturais mais frequentemente observadas.



d

e

FIG. 9 — TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA

Microfotografias electrónicas.

a. 12 000x; b. 12 000x; c. 20 000x

ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DAS CÉLULAS DE SERTOLI.

No citoplasma das células de Sertoli destacam-se numerosos vacúolos (a, b). O núcleo (N) da célula de Sertoli mantém uma aparência normal (a). São também de destacar as alterações dos componentes da barreira hemato-testicular (c), nomeadamente a dilatação das cisternas dos complexos juncionais inter-sertolianos. É também de assinalar a existência de espaços alargados (★) entre as células de Sertoli adjacentes.

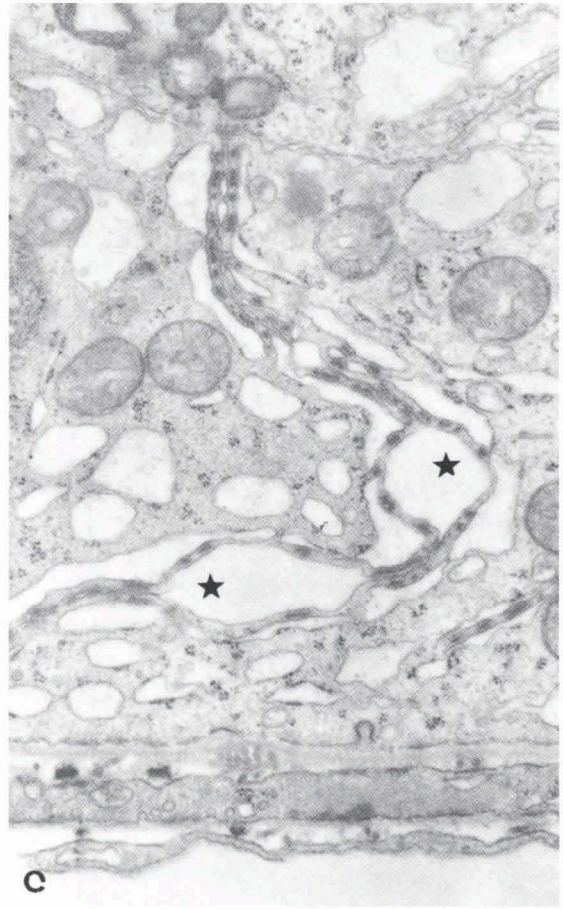
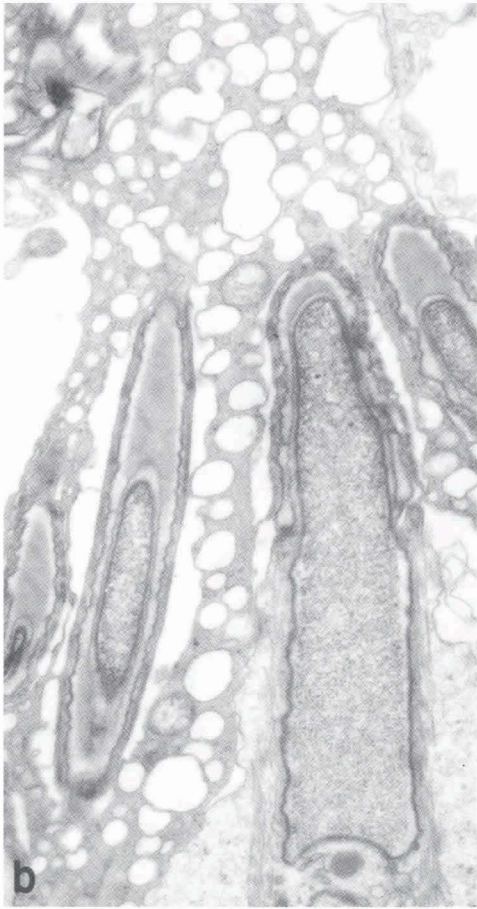
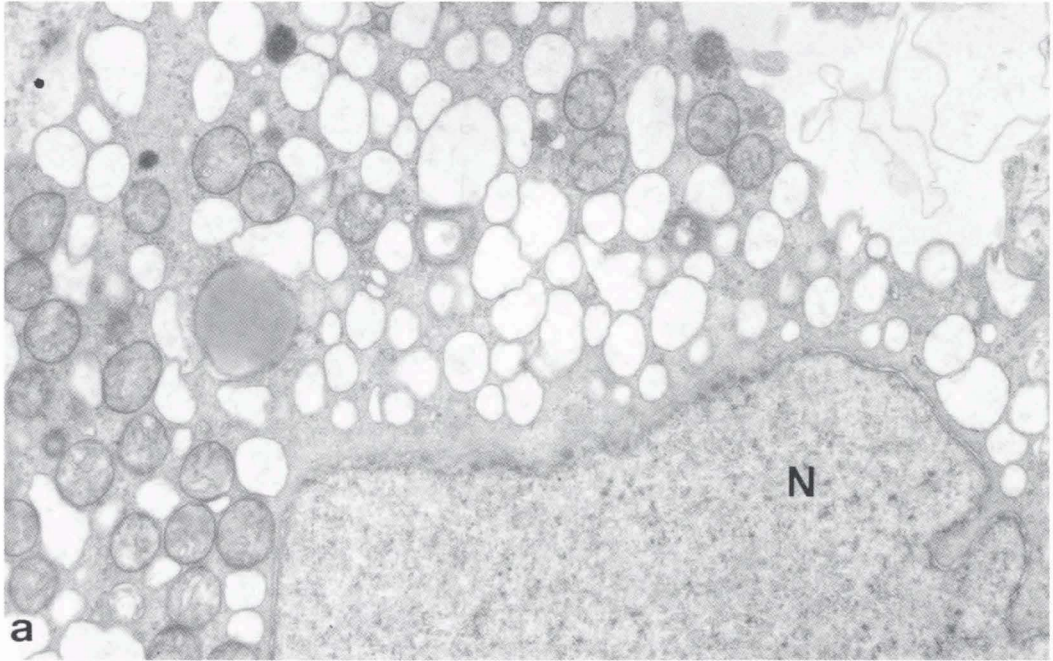
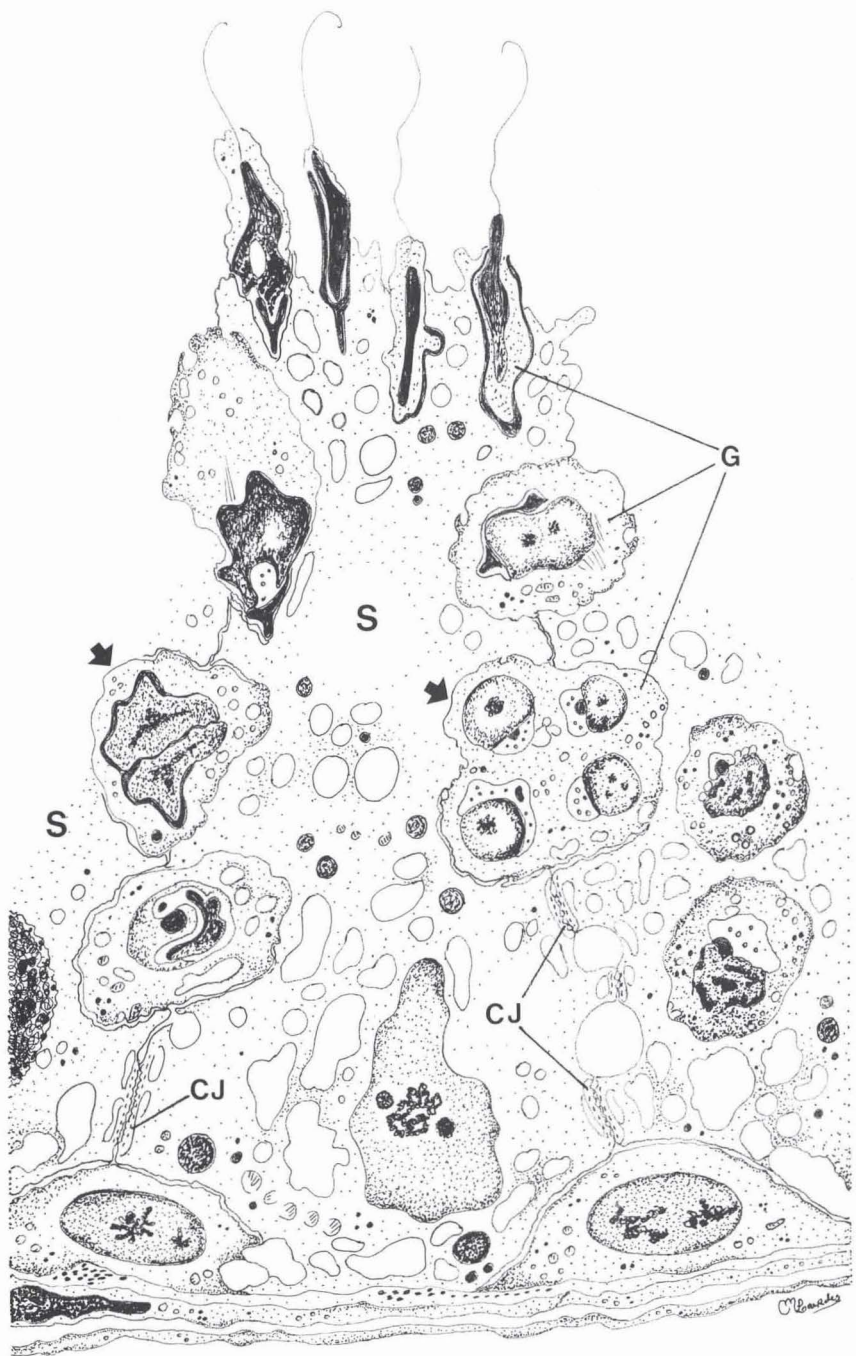


FIG. 10 — RECONSTRUÇÃO ESQUEMÁTICA DO TUBO SEMINÍPARO DE RATINHO INTOXICADO COM NITROFURAZONA, ILUSTRANDO AS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES OBSERVADAS AO MICROSCÓPIO ELECTRÔNICO, SENDO DE DESTACAR A VACUOLIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI (S) DEGENERESCÊNCIA E MALFORMAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS (G), PRESENÇA DE CÉLULAS MULTINUCLEADAS (†) E ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DOS COMPLEXOS JUNCIONAIS INTER-SERTOLIANOS (CJ).



CAPITULO III

MODIFICAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS

DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR EM RATINHOS INTOXICADOS COM NITROFUZAZONA

3.1. INTRODUÇÃO

O conceito da barreira hemato-testicular emergiu e adquiriu credibilidade inequívoca na sequência dos trabalhos de Setchell e colaboradores (1969). Estes trabalhos, de natureza fisiológica demonstraram que algumas substâncias nomeadamente a albumina iodada e a inulina, quando introduzidas na corrente sanguínea de carneiros apareciam rapidamente na linfa, mas eram completamente excluídas do fluido da rete testis, tendo estes autores concluído que a barreira hemato-testicular se localizava, não na parede dos capilares, mas na parede dos tubos seminíferos.

Em estudos morfológicos anteriores, Bouffard (1906) e Pari (1910) demonstraram que corantes injectados intravenosamente em animais de experiência, com a finalidade de estudar a sua distribuição no organismo, eram excluídas do testículo. Mais recentemente Korman

(1967) postulou a existência de uma barreira hemato-testicular, em virtude de ter verificado que, após administração intravenosa de acridina, os núcleos do epitélio seminíparo não se apresentavam corados.

A localização morfológica da barreira hemato-testicular encontrava-se porém por esclarecer até aos trabalhos de Fawcett e colaboradores (1970) e de Dym e Fawcett (1970) que, após a utilização de traçadores nomeadamente a peroxidase de rábano e o nitrato de lantânio, localizaram e identificaram dois componentes desta barreira, um situado nas junções entre as células mióides e outro nas junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes.

Estudos ultraestruturais realizados em mamíferos demonstraram que o substrato anatómico da barreira hemato-testicular é representado pelas junções de oclusão entre as células de Sertoli (Flickinger e Fawcett 1967, Dym e Fawcett 1970, Ross 1970, Dym 1973, Dym e Cavicchia 1977, Bergmann e Dierichs 1983, Berg 1984, Bergmann e col. 1984 e Yazama e col. 1988). Foram utilizados com esse objectivo traçadores identificáveis aos microscópios óptico e electrónico, com a finalidade de testar a função das junções inter-sertolianas e das células de Sertoli na barreira hemato-testicular. Entre

esses traçadores foram usados o nitrato de lantânio, a peroxidase de rãbano, o dióxido de tório coloidal, o carbono e a ferritina. A conclusão geral destes trabalhos é que, em condições normais, as junções inter-sertolianas impedem a passagem dos traçadores para o compartimento adluminal.

Foi ainda demonstrado em tubos seminíparos de rato isolados e colocados num meio de incubação contendo peroxidase, que as células de Sertoli têm a capacidade de transportar o traçador para o compartimento adluminal (Pessoa 1976 e Pessoa e David-Ferreira 1980).

Também tem sido referido que as junções inter-sertolianas, que constituem o principal substrato da barreira hemato-testicular, podem tornar-se permeáveis em animais submetidos à acção de alguns agentes químicos, processos experimentais ou ainda patológicos (ver Quadro I).

QUADRO I

ALGUMAS SITUAÇÕES EXPERIMENTAIS E PATOLÓGICAS EM QUE FOI
DEMONSTRADA OU SUGERIDA ALTERAÇÃO DA BARREIRA
HEMATO-TESTICULAR (BHT)

<u>Espécie</u>	<u>Factor</u>	<u>Método de demonstração</u>	<u>Referência</u>
Rato	Ligação dos ductos eferentes	Hidróxido e Silicato de lantânio	Neaves 1973
Rato	Ligação dos ductos eferentes	Peroxidase de rábano	Pessoa 1976
Ratinho	Idade (20-23 meses)	Nitrato de Lantânio	Gosden e col. 1982
Raposa	Genético	Nitrato de Lantânio	Berg 1984
Rato	1,2,3,-Trihidroxipropano	Sugere alteração da BHT	Wiebe e Barr 1984
Rato	Cobalto	Sugere alteração da BHT	Corrier e col. 1985
Cobaio	Gossipol (período neo-natal)	Filipina	Pelletier e Friend 1986
Rato	Criptorquidia	Nitrato de Lantânio	Hatier e Grignon 1986
Rato	Di-n-pentil-ftalato	Sugere alteração da BHT	Creasy e col. 1987
Rato	Cloreto de cádmio	Carbono coloidal	Gouveia 1988
Rato	Hipovitaminose A	Nitrato de Lantânio	Huang e col. 1988
Homem	Infertilidade	Nitrato de Lantânio (penetração parcial)	Bergmann e col. 1989
Ratinho	Nitrofurazona	Peroxidase de rábano	Pessoa e col. 1989

Foram ainda descritas situações em que, apesar da espermatogénese estar severamente alterada, não foram detectadas alterações morfo-funcionais nos complexos juncionais inter-sertolianos. É concretamente o que acontece após ligação dos ductos eferentes, criptorquidismo experimental, aplasia hereditária das células germinativas (Nagano e col. 1986, Singh e Ezeasor 1989) e após intoxicação experimental com Gossipol (Pelletier e Friend 1986).

Conforme assinalámos anteriormente (Capítulo II), a Nitrofurazona administrada subcutaneamente, provoca no ratinho alterações degenerativas do epitélio seminíparo. As experiências descritas neste capítulo tiveram por objectivo investigar se essas alterações estavam relacionadas com modificações na integridade da barreira hemato-testicular. Nas experiências realizadas procurámos analisar o estado funcional dos complexos juncionais inter-sertolianos e estudar a capacidade das células de Sertoli dos animais intoxicados, de incorporar e transportar um traçador proteico.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Animais controlo

Animais normais utilizados como controlo foram apenas injectados subcutaneamente com o veiculo.

Nas observações realizadas ao microscópio electrónico dos tubos seminíparos isolados incubados durante 5 minutos em meio de Eagle contendo peroxidase, o traçador foi identificado nos espaços intercelulares do compartimento basal. Verificou-se também que após 10 minutos os complexos juncionais inter-sertolianos se apresentavam integros (Figs. 11b e 11c), impedindo a passagem do traçador para o compartimento adluminal do tubo seminíparo.

Observa-se traçador associado à superfície dos tubos, aderente à sua membrana basal, no citoplasma das células mióides e no interior de pequenas vesículas de endocitose (Fig. 11a). No citoplasma das células de Sertoli observam-se ao fim de 15 minutos, vacúolos de dimensões variadas contendo produto de reacção (Fig. 12a). Ainda neste período de tempo foram também observados nas células germinativas, alguns depósitos densos no interior de vacúolos (Fig. 12b).

Após 15 minutos de incubação, observa-se o traçador nos espaços intercelulares do compartimento adluminal (Fig. 12c). Contudo, os complexos juncionais mantêm-se aparentemente normais, formando uma barreira à passagem do traçador. Foram igualmente observadas vesículas associadas à membrana celular, sugerindo o lançamento do produto de reacção para o espaço intercelular.

As imagens observadas ao microscópio electrónico revelam a presença de corpos multivesiculados contendo depósitos densos. Nunca observámos marcação no interior das cisternas do Complexo de Golgi.

Após 30 minutos de incubação a distribuição do traçador era semelhante à observada no tempo anterior. Porém, foram identificados depósitos densos em espermatídes (Fig. 12d).

3.2.2. - Animais intoxicados

A presença de vacúolos e vesículas com traçador no interior das células de Sertoli alteradas pela Nitrofurazona, indica que estes elementos celulares têm ainda a capacidade de incorporar e transportar a

peroxidase para o interior do tubo seminíparo.

A presença do traçador nos compartimentos basal (Figs. 13a - 13c), adluminal (Figs. 15a e 15b) e nos espaços intercelulares ao fim de 5 minutos de incubação pode pois ser uma consequência da permeabilização das junções inter-sertolianas, demonstrada pela presença do traçador (Figs. 14a - 14c) e do transporte do traçador pelas células de Sertoli. A existência de estruturas vesiculares marcadas nas células germinativas em estádios mais avançados do seu desenvolvimento que se observa já ao fim de 5 minutos de incubação (Figs. 15a e 15 b), traduz a capacidade destas células de incorporarem o traçador presente nos espaços intercelulares do compartimento adluminal. Nunca observamos marcação das cisternas do Complexo de Golgi.

Embora a localização ultraestrutural da peroxidase em células expostas durante 10 e 15 minutos (Figs. 16a - -16c e Fig. 17 respectivamente) seja semelhante à que se observa nas células expostas durante 5 minutos, o número de vesículas e vacúolos contendo o produto denso aumentou nitidamente. Nestes intervalos de tempo observou-se também a marcação de todos os espaços intercelulares.

3.3. DISCUSSÃO

Os resultados das experiências efectuadas in vitro põem em evidência a capacidade das células de Sertoli de transportar o traçador, o que se traduz na sua presença no interior de vesículas e vacúolos citoplasmáticos, confirmando o importante papel desempenhado por estas células no transporte da peroxidase desde a parede tubular até ao lume (Aragon e col. 1972, Aragon e Lustig 1973).

Nos tubos seminíparos de animais controlo, a sequência observada no que se refere ao transporte da peroxidase pelas células de Sertoli, indica que o traçador observado nos espaços intercelulares é primeiramente endocitado e, seguidamente transportado e libertado para o lume do tubo. Estas observações estão de acordo com estudos efectuados por Fawcett e colaboradores (1970), Willson e colaboradores (1973) e Pessoa e David-Ferreira (1980) que verificaram que, em testículos de animais normais a peroxidase penetra no compartimento adluminal através da célula de Sertoli. Deste modo, a barreira hemato-testicular, formada pelas junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes, impede que muitas substâncias atinjam as células germinativas do compartimento adluminal, a não ser que

essas substâncias passem através do citoplasma das células de Sertoli (Wauben-Penris e col. 1988). Contudo, as observações que realizamos mostraram uma diferença no comportamento da célula de Sertoli nos animais intoxicados com a Nitrofurazona, relativamente aos animais não submetidos ao tratamento e utilizados como controlo.

No epitélio seminíparo de animais intoxicados o processo de transporte pelas células de Sertoli é aparentemente mais rápido, verificando-se a presença do traçador no compartimento adluminal do tubo seminíparo ao fim de 5 minutos de incubação. De igual modo, o traçador penetra através das junções inter-sertolianas o que contrasta significativamente com as imagens observadas nos tubos seminíparos de animais controlo. As diferenças observadas não são surpreendentes, uma vez que se constatarem diferenças óbvias na sua morfologia, já referidas no capítulo anterior. A permeabilização dessas junções ao traçador utilizado sugere que sejam sensíveis à intoxicação com a Nitrofurazona.

Os nossos resultados são comparáveis de entre outros, aos de Huang (1988) em ratos alimentados com uma dieta deficiente em vitamina A, em que estes autores testaram com nitrato de lantânio, a

permeabilidade da barreira hemato-testicular. Contudo, apesar das semelhanças observadas, os nossos resultados diferem, uma vez que observamos traçador a um nível mais profundo do epitélio germinativo. De acordo com Huang e colaboradores (1988) as alterações nas junções inter-sertolianas podem implicar modificações noutras regiões da membrana da célula de Sertoli, podendo assim interferir com as interações entre estas e as células germinativas que, como se sabe, condicionam a diferenciação do epitélio seminíparo (Russel, 1980). Nestas circunstâncias, as células espermatogénicas não se desenvolvem normalmente.

Também recentemente, alterações na permeabilidade da barreira hemato-testicular foram descritas por Gouveia (1988) em ratos experimentalmente intoxicados com cloreto de cádmio.

Alterações semelhantes nos complexos juncionais inter-sertolianos, nomeadamente a presença de espaços alargados na região das junções, foram também descritas por Kainz e colaboradores (1988) em ratos, intoxicados experimentalmente com Gossipol.

Contrariamente ao observado no presente estudo, Hagenäs e colaboradores (1978) em trabalhos realizados em ratos intoxicados com a Nitrofurazona concluíram que

as junções inter-sertolianas se mantêm impermeáveis ao nitrato de lantânio.

De acordo com os resultados obtidos nos animais intoxicados com a Nitrofurazona verifica-se que as células de Sertoli apesar de aparentemente alteradas ainda têm a capacidade/capabilidade de transportar a peroxidase, por via transcelular. Há também passagem nos espaços intercelulares, o que põe em evidência a existência de alterações ao nível das junções inter-sertolianas que se tornam permeáveis ao traçador. Como consequência há alteração do microambiente do compartimento adluminal o que seguramente contribui para as alterações observadas na espermatogénese.

No seu conjunto as observações que referimos constituem um contributo para a explicação do mecanismo das alterações observadas no epitélio seminíparo de ratinhos submetidos à acção da Nitrofurazona. Na sequência destas observações concluímos que nas condições experimentais que utilizámos, as junções inter-sertolianas se tornam permeáveis, permitindo a livre passagem da peroxidase.

Considerando a natureza e o papel funcional que as junções inter-sertolianas desempenham no processo da espermatogénese e, ainda com base nos resultados obtidos

no presente trabalho, é pertinente notar que as alterações observadas no epitélio seminíparo de ratinhos tratados com a Nitrofurazona, estão eventualmente relacionados com as modificações no processo de transporte, nomeadamente na permeabilidade da barreira hemato-testicular.

ILUSTRAÇÕES

FIG. 11 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS (CONTROLO) INCUBADOS 5 - 10' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DIAMINOBENZIDINA (DAB).**

Microfotografias electrónicas.

a. 10 000x; b. 13 400x; c. 40 500x

A reacção pela DAB põe em evidência a presença de peroxidase nas células mióides, no interior de vesículas citoplasmáticas (†) e na membrana basal do tubo seminíparo (a, b). Também se observa traçador nos espaços intercelulares do compartimento basal, não se verificando contudo a sua presença nos complexos juncionais inter-sefolianos (CJ) (c).

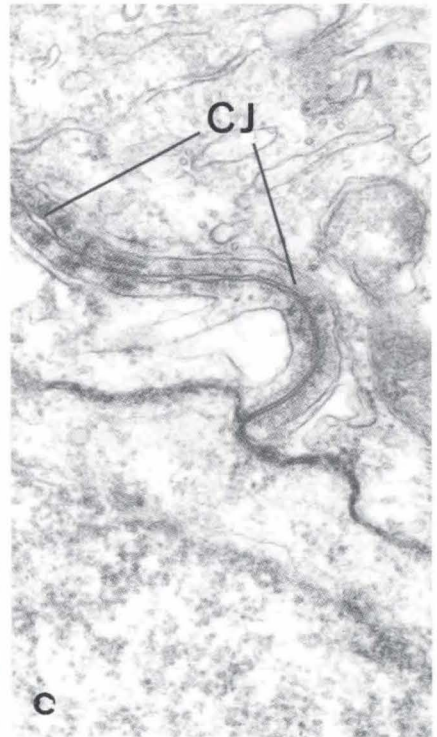
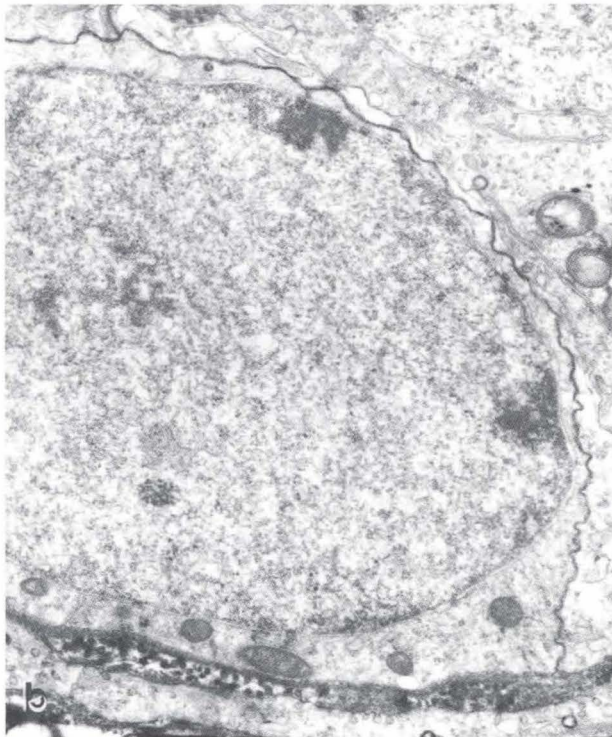
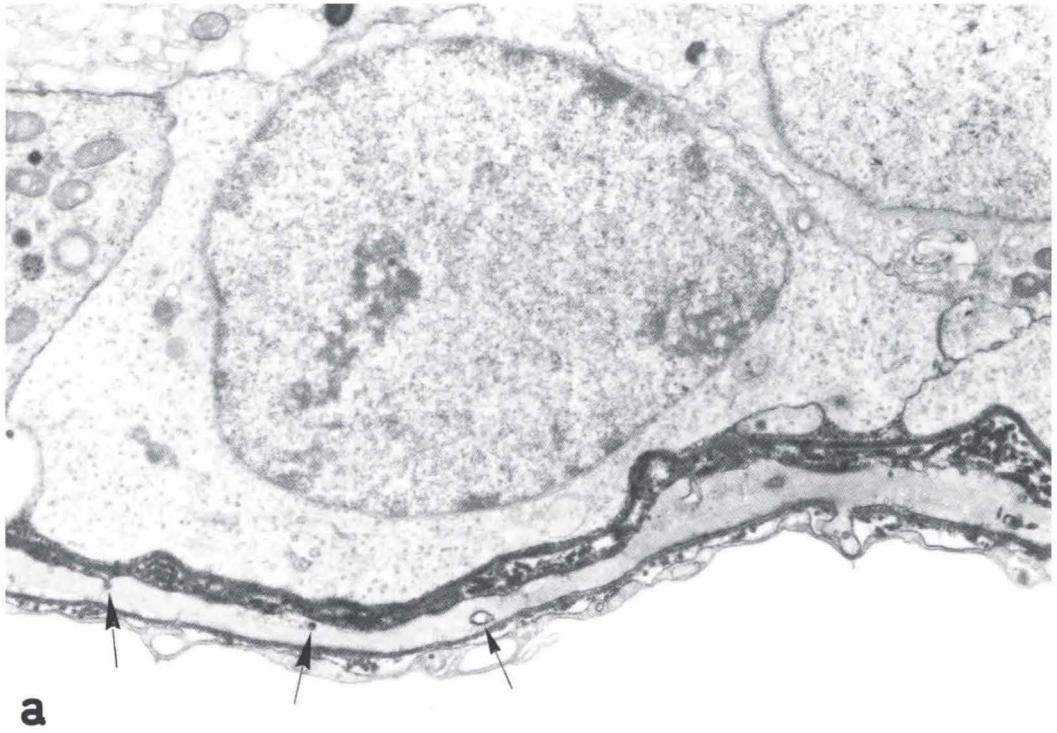


FIG. 12 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS (CONTROLO) INCUBADOS DURANTE 15 - 30' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DAB.**

Microfotografias electrónicas.

a. 12 000x; b. 10 000x; c. 10 000x;
d. 12 000x

Neste conjunto de microfotografias demonstra-se que a peroxidase não só é incorporada e transportada através das células de Sertoli (**S**) (a, c), como também pelas células germinativas (b, d) em cujo citoplasma se observam vesículas e vacúolos contendo o traçador (**t**).

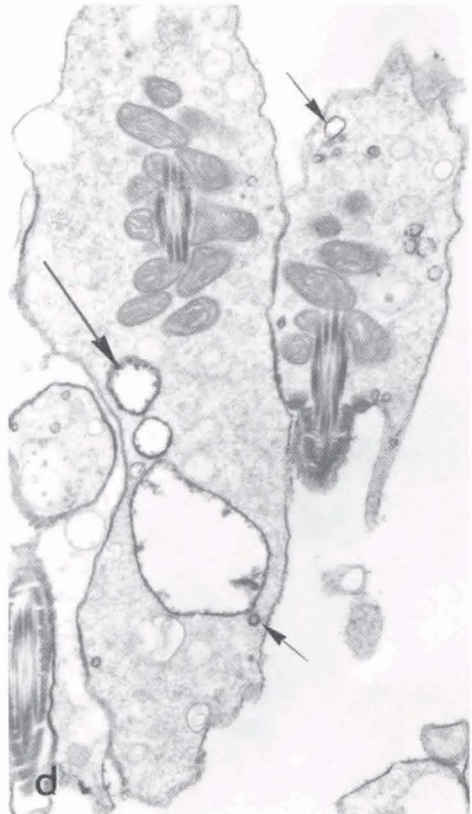
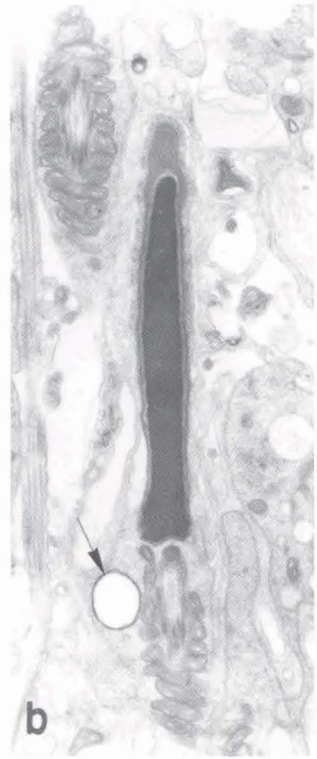
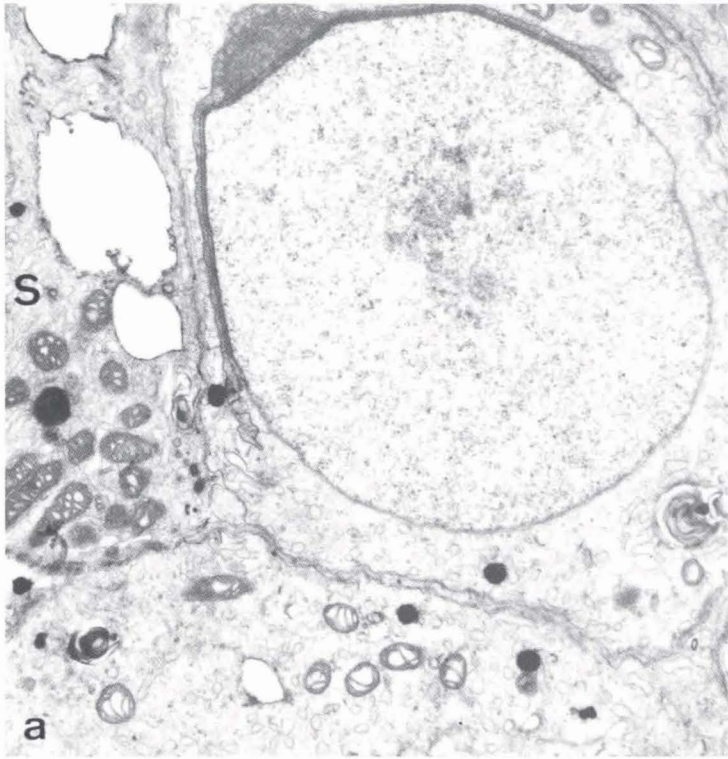


FIG. 13 — TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS INTOXICADOS COM NITROFURAZONA E INCUBADOS DURANTE 5' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DAB.

Microfotografias electrónicas.

a. 40 000x; b. 28 000x; c. 20 000x

Nas experiências realizadas *in vitro* o traçador está presente no citoplasma das células de Sertoli (S), no interior de vesículas (a, b), vacúolos (a, b) e corpos multivesiculados (b). Ainda ao fim de 5' de incubação no meio contendo peroxidase também se observa traçador nos espaços intercelulares (c).

G — célula germinativa

P — ponte intercelular

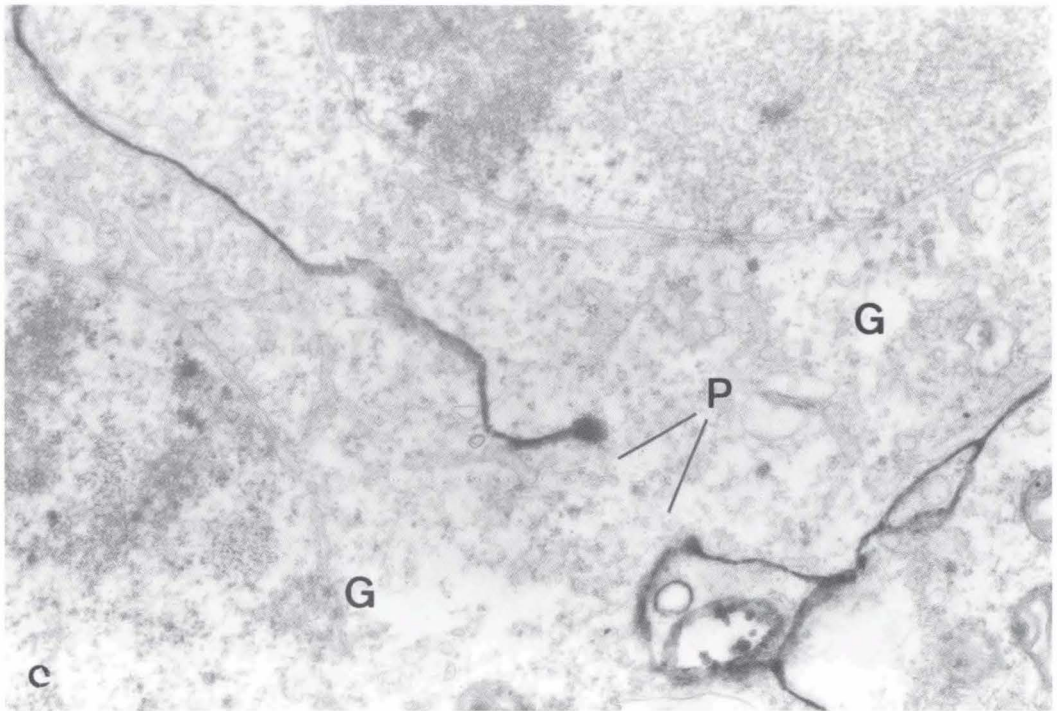
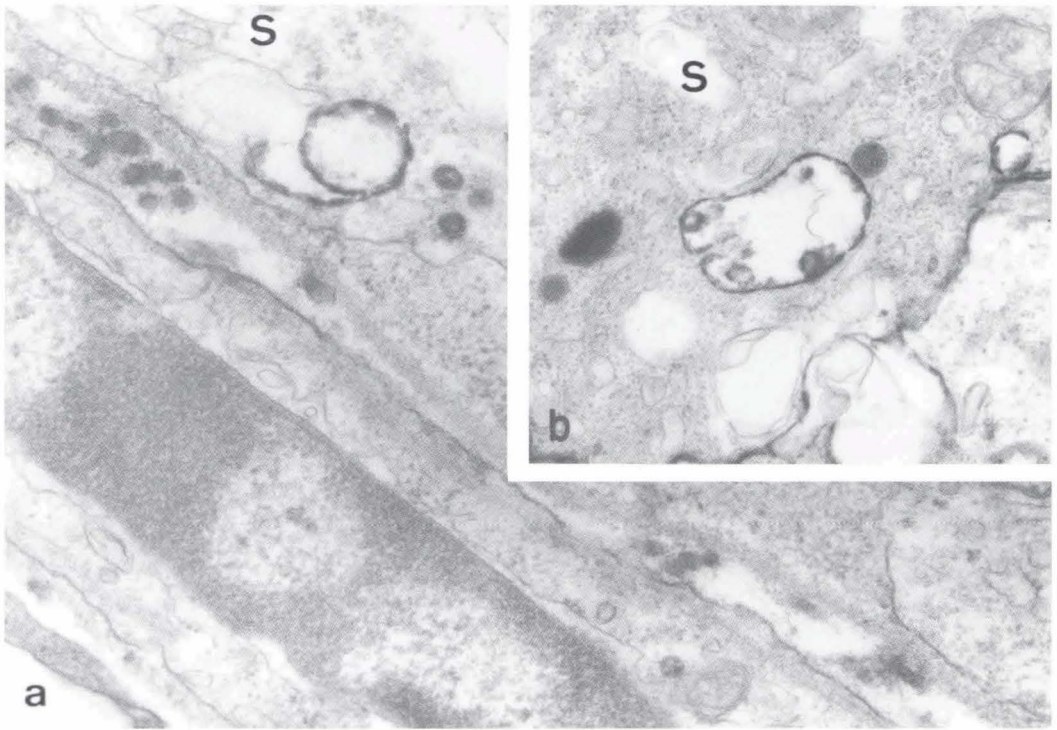


FIG. 14 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS INTOXICADOS COM NITROFUZONA E INCUBADOS DURANTE 5' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DAB.**

Microfotografias electrónicas.

a. 14 400x; b. 17 000x; c. 17 800x

Neste conjunto de microfotografias é de salientar a presença do traçador nos complexos juncionais inter-seertolianos (†), demonstrando a sua permeabilização nos animais intoxicados (a-c). São de notar os vacúolos (★) contendo peroxidase situados no trajecto dos complexos juncionais (c).

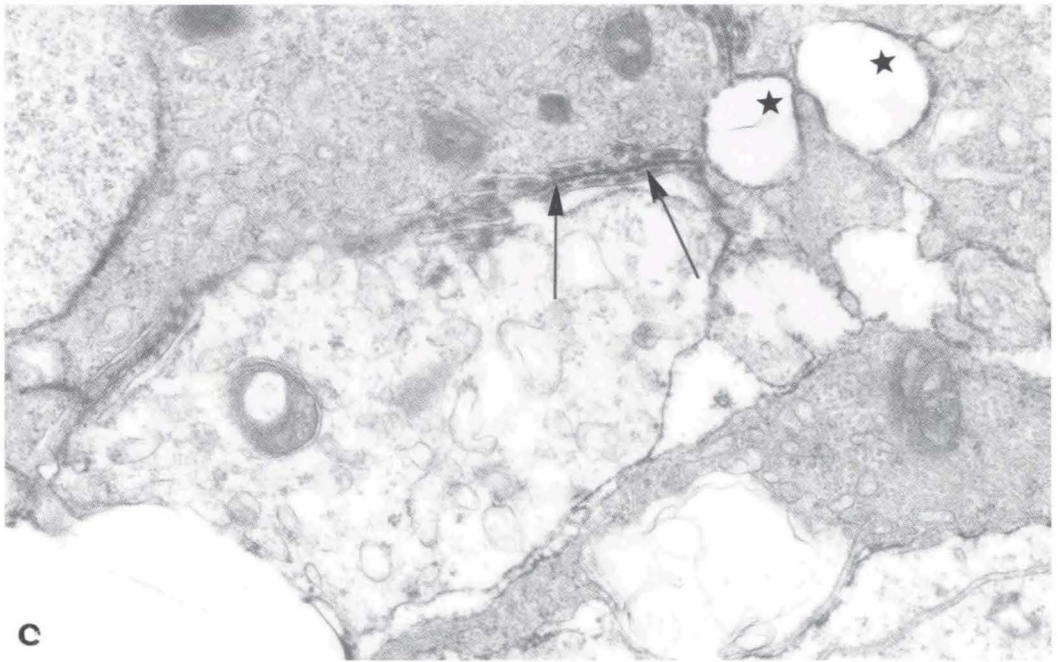
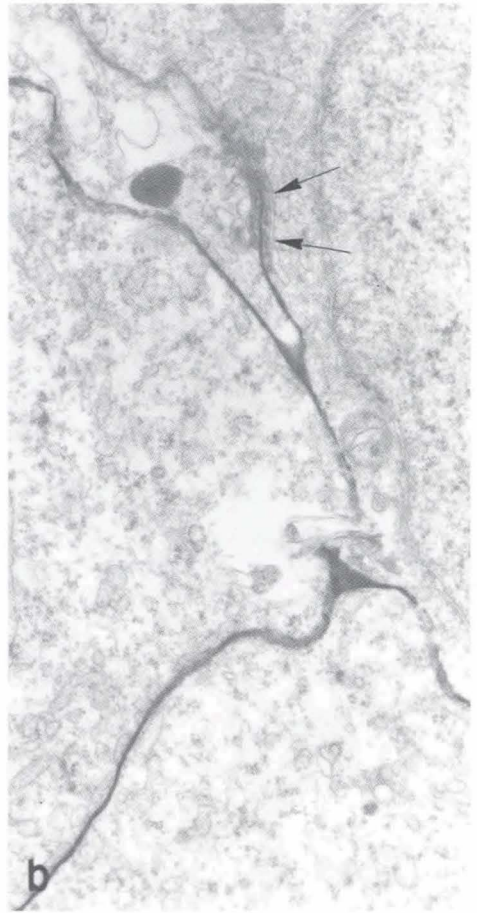
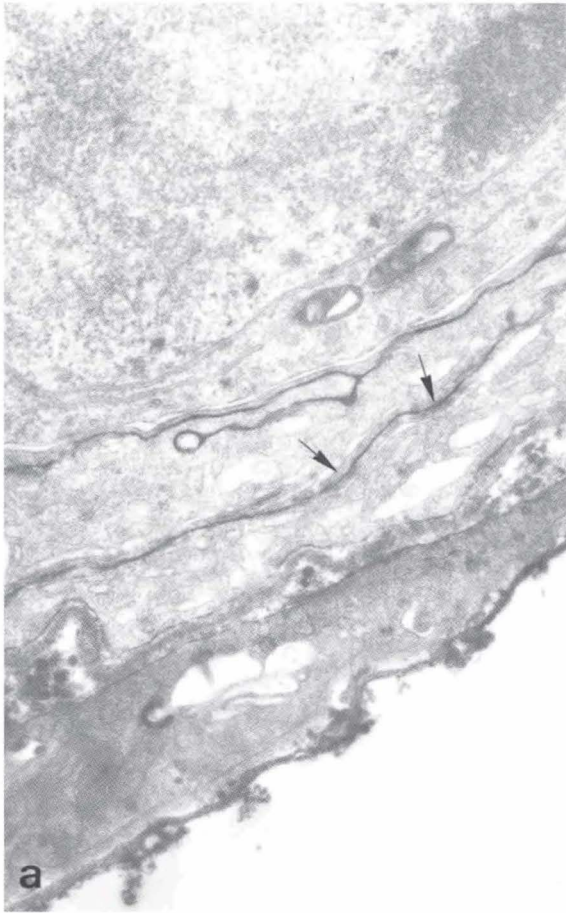


FIG. 15 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS INTOXICADOS COM NITROFURAZONA E INCUBADOS DURANTE 5' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DAB.**

Microfotografias electrónicas.
a. 8 000x; b. 12 000x

Ao fim de 5' de incubação verifica-se que o traçador permeia todos os espaços intercelulares do compartimento adluminal (a, b). São também de assinalar as alterações morfológicas em espermatídes binucleadas (a) em cujo nucleoplasma se observam zonas de rarefacção e vacúolos citoplasmáticos (★). Para além destas anomalias destaca-se ainda um complexo de Golgi vacuolizado (CG) e de localização irregular.

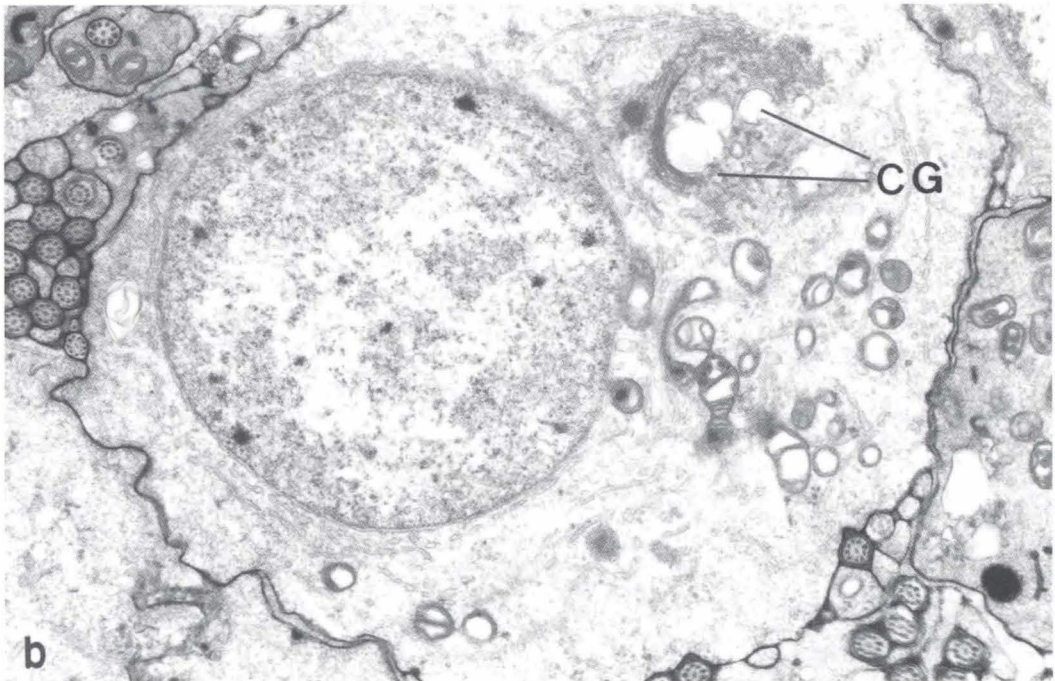
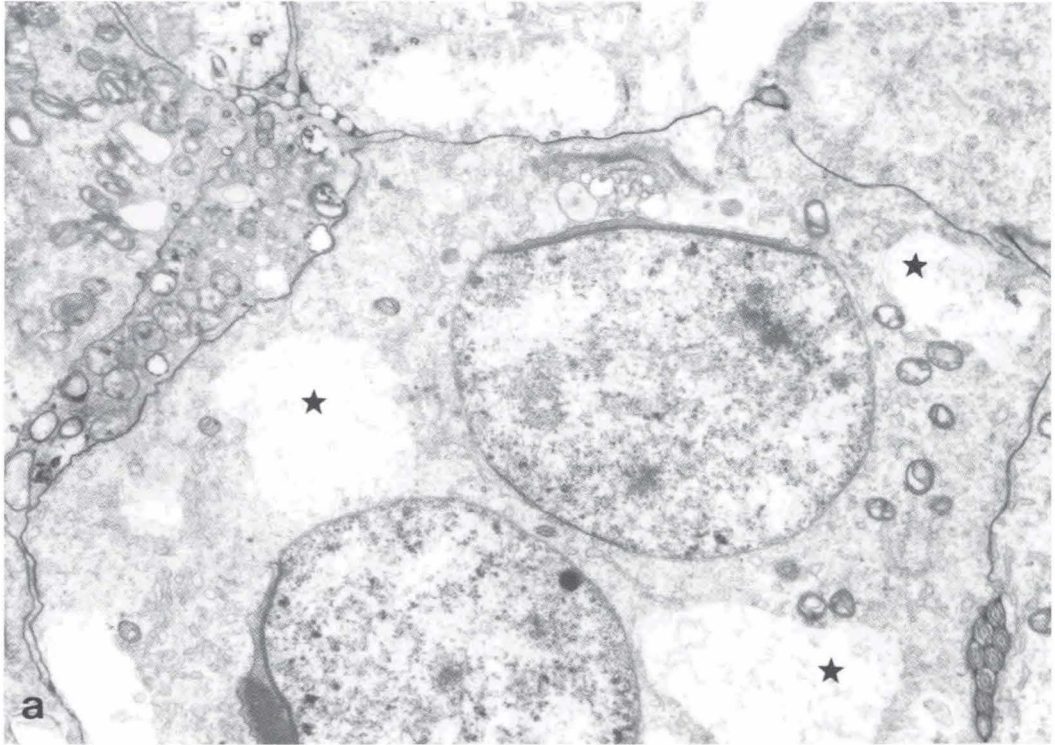


FIG. 16 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS INTOXICADOS COM NITROFUZZONA E INCUBADOS DURANTE 10' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DAB.**

Microfotografias electrónicas.

a. 10 000x; b. 13 400x; c. 13 400x

Em (a) a distribuição do traçador é semelhante à que se observa ao fim de 5' de incubação. No citoplasma da célula de Sertoli observam-se vacúolos contendo peroxidase (1) (b, c).

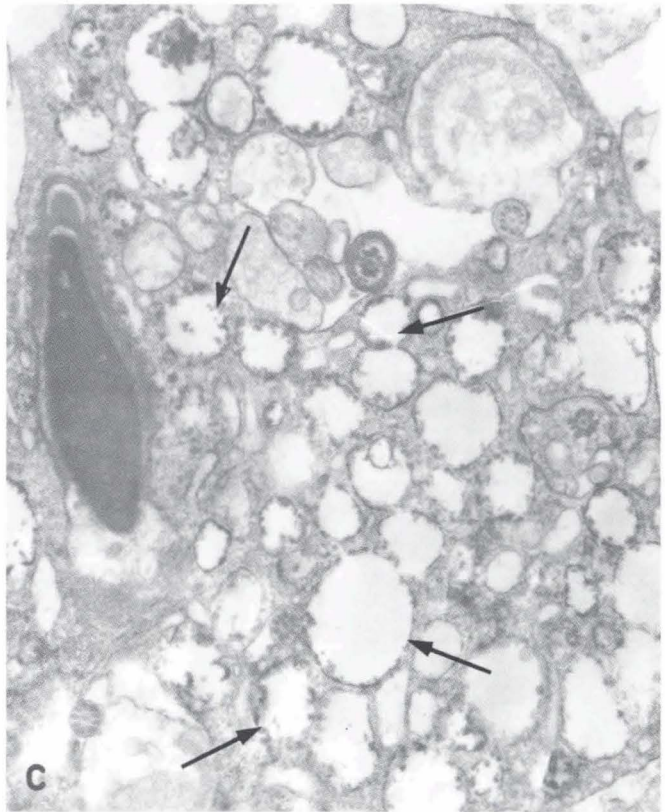
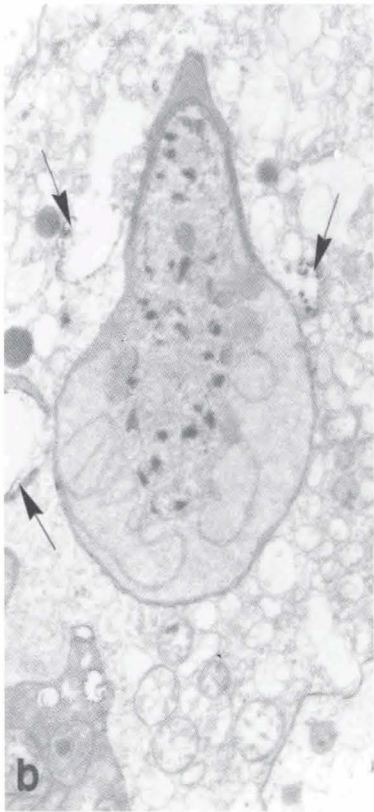
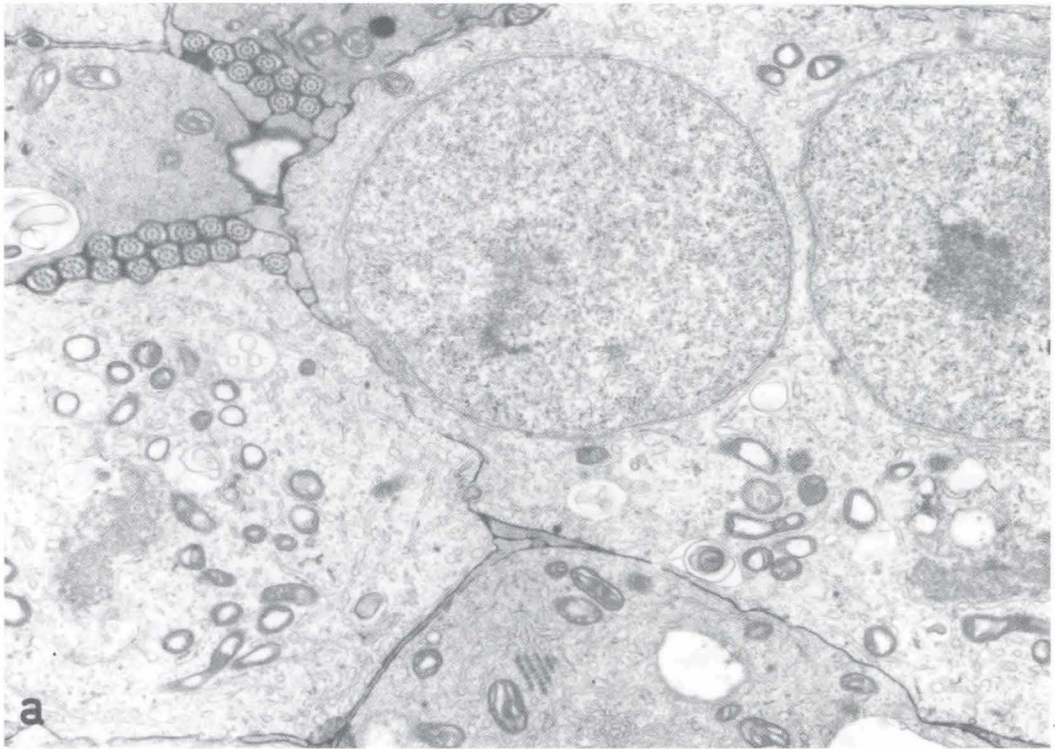
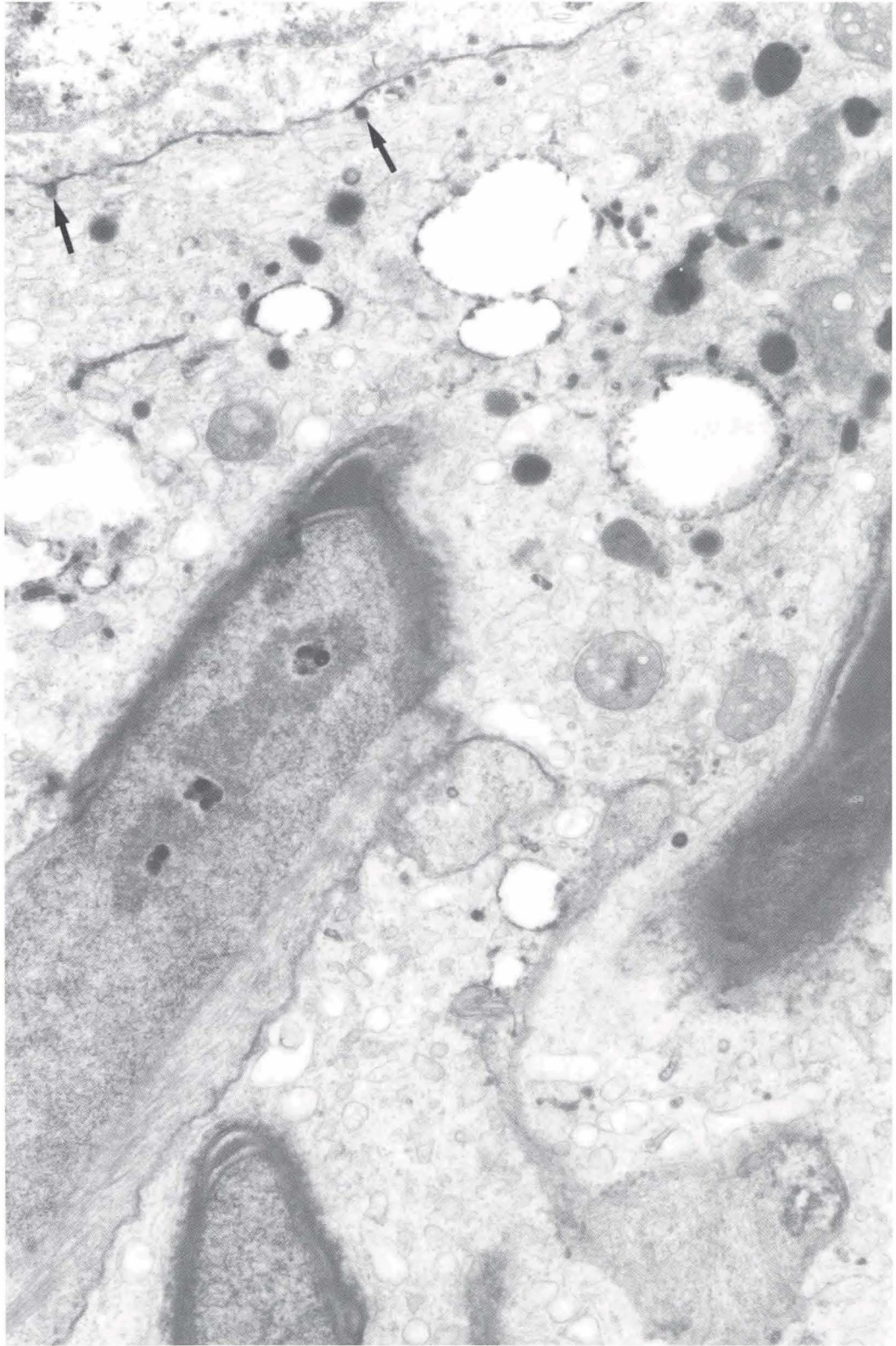


FIG. 17 — **TUBO SEMINÍPARO ISOLADO DE RATINHO INTOXICADO COM NITROFURAZONA E INCUBADO DURANTE 15' EM MEIO DE EAGLE CONTENDO PEROXIDASE. REACÇÃO COM DAB.**

Microfotografia electrónica.
18 700x

Porção apical de uma célula de Sertoli repleta de vacúolos e vesículas contendo peroxidase. Notar as vesículas (†) contendo o traçador associadas à membrana celular.



CAPITULO IV

REGENERAÇÃO DO EPITELIO SEMINIPARO DE RATINHOS PREVIAMENTE INTOXICADOS COM NITROFURAZONA

4.1. INTRODUÇÃO

As substâncias com acção antiespermatogénica hoje conhecidas podem agrupar-se em duas grandes categorias no que se refere à reversibilidade ou irreversibilidade da sua acção. Entre as substâncias cuja acção tem um carácter irreversível são referidas na literatura o cloreto de cádmio (Gupta e col. 1967), o dibromocloropropano (Saegusa 1986, 1989) e o tri-*o*-cresilfosfato (Somkuti e col. 1987).

O cloreto de cádmio quando administrado subcutaneamente a ratos e ratinhos produz lesões graves no testículo ao fim de poucas semanas, conduzindo a alterações irreversíveis do epitélio seminiparo, que se traduzem em infertilidade permanente (Gupta e col. 1967). Sabe-se hoje que as alterações testiculares provocadas pelo cloreto de cádmio resultam de lesões ao nível dos vasos sanguíneos.

O dibromocloropropano (DBCP) que é largamente utilizado como fumigante do solo, quando aplicado experimentalmente a ratos por via subcutânea numa única dose forte (300 mg/Kg), provoca alterações degenerativas nos tubos seminiparos que se traduzem na condensação anormal da cromatina das espermatídes, formação de células multinucleadas e descamação das células germinativas. Destas lesões resulta a atrofia do testículo (Saegusa 1986). Posteriormente, o mesmo autor (Saegusa, 1989) num trabalho em que utilizou doses baixas de DBCP (10, 30 e 100 mg/Kg), confirmou as alterações anteriormente descritas no epitélio seminiparo, assinalando também a degenerescência das células de Sertoli e o espessamento da lâmina basal dos tubos, admitindo que o DBCP possa conduzir a lesões irreversíveis do testículo.

O tri-*o*-cresilfosfato é uma substância neurotóxica que provoca alterações irreversíveis nos tubos seminiparos do rato. Assim, após intoxicação com a referida substância por via oral (150 mg/Kg por períodos de 3, 7, 10, 14 e 21 dias) e após interrupção da administração durante 98 dias, Somkuti e colaboradores (1987) observaram o completo desaparecimento das células germinativas, ficando o epitélio seminiparo reduzido às

células de Sertoli. Não observaram quaisquer sinais de regeneração da espermatogénese.

As substâncias cuja acção antiespermatogénica têm carácter reversível são numerosas. Entre elas podem referir-se insecticidas (Snow e Hays 1983), fungicidas (Hirano e col. 1984), anticancerígenos (Kadota e col. 1989), agentes hipotensores (Mesfin e col. 1989). e uma vasta gama de químicos utilizados na indústria (Linder e col. 1986, Lu e col. 1987, Levin e col. 1988, Arora e Vijayaraghavan 1989).

Na sua generalidade o efeito destas substâncias varia consoante a espécie, a dose e a via da administração utilizadas.

O cloreto de metilo, um gás industrial utilizado na produção de silicões e na indústria de plásticos provoca uma acentuada degenerescência e a completa desorganização do epitélio seminíparo de ratos intoxicados (Chapin e col. 1984). Neste trabalho, a reversibilidade da acção desta substância antiespermatogénica foi também estudada após um período de regeneração de 8 semanas. Não se observaram sinais de espermatogénese em cerca de 80% dos tubos seminíparos tendo estes autores concluído que o cloreto de metilo, nas doses utilizadas é letal para as espermatogónias.

Assinalaram porém, ter observado sinais de regeneração em alguns tubos.

Também Oishi (1985) descreveu uma reversibilidade limitada em ratos tratados com di(2-etilhexilo)ftalato, substância química utilizada no fabrico de plásticos. Contudo, Fukuoka e colaboradores (1989) descreveram alterações testiculares em ratos intoxicados com outros ésteres do ácido ftálico, tendo observado apenas células de Sertoli nos tubos seminiparos. Estes autores sugeriram que a acção destas substâncias era irreversível.

O 1,3-dinitrobenzeno, substância química utilizada no fabrico de tintas, provoca alterações degenerativas severas e atrofia testicular no rato (Linder e col. 1986). Embora estes autores tivessem observado a regeneração do epitélio após um período de 5 meses, constataram também a presença de tubos seminiparos atróficos.

Carter e colaboradores (1987) observaram e descreveram que 50% dos ratos intoxicados por via oral com o fungicida metil 2-benzimidazol carbamato (400 mg/Kg) durante 19 dias, apresentavam alterações irreversíveis do epitélio seminiparo, ficando após o período de regeneração, constituído apenas por células

de Sertoli rodeadas por uma membrana basal espessa. Na mesma experiência descreveram em alguns animais sinais de regeneração do epitélio. Também Oshio e colaboradores (1988) observaram alterações reversíveis no testículo de ratinhos intoxicados com 0,1 e 0,3 mg/Kg de Adriamicina. Contudo, quando utilizaram doses superiores (1,3 mg/Kg), essas alterações tornaram-se irreversíveis, observando-se então nitidas anomalias na morfologia dos espermatozóides e a sua imobilidade.

De igual modo Meng e colaboradores (1988), em estudos efectuados em homens tratados com Gossipol verificaram que, após a interrupção do tratamento se observava em 80% dos casos retorno à produção normal de espermatozóides. Porém, estes autores referiram ainda que as células germinativas se apresentavam morfo-funcionalmente alteradas, mas não especificaram quais as alterações.

A degenerescência testicular provocada no rato por um outro químico, 2,5-hexanodiona, um solvente industrial, é parcialmente irreversível, uma vez que após um período de regeneração de 17 semanas se observaram tubos seminiparos contendo apenas as espermatogônias e as células de Sertoli, por entre outros com aparência normal (Boekelheide 1988).

A persistência de espermatogônias aparentemente normais, observada nos tubos seminíparos de animais intoxicados experimentalmente com a Nitrofurazona (Pereira e col. 1988a, 1988b) sugere a possível reversibilidade dos seus efeitos no epitélio germinativo. Contudo, as alterações que observamos no presente trabalho, na estrutura do epitélio seminíparo dos animais intoxicados são de tal ordem, que decidimos testar experimentalmente se, após paragem da administração da droga, se observava regeneração do epitélio seminíparo. Deu-se particular atenção à ultraestrutura das espermátides e das células de Sertoli, nomeadamente à integridade dos complexos juncionais inter-sertolianos.

Com o objectivo de verificarmos a possível reconstituição da barreira hemato-testicular, efectuámos em tubos seminíparos de testículos de animais em "regeneração" uma série de experiências utilizando a peroxidase como marcador.

4.2. RESULTADOS

Conforme o protocolo já referido no capítulo de Material e Métodos, utilizámos, para a investigação do

problema da reversibilidade/irreversibilidade das lesões provocadas pela Nitrofurazona, animais que após intoxicação experimental foram mantidos 30 dias sem qualquer tratamento. Nestes animais o testículo tinha aspecto macroscópico normal e nas preparações histológicas não se constataram as alterações características dos animais intoxicados (Fig. 18d). Verificou-se porém uma nítida regeneração do epitélio germinativo e o reaparecimento do lume tubular (Figs. 18a - 18c), embora nalguns animais o lume dos tubos permanecesse ocupado por elementos celulares em degenerescência (Figs. 18b e 18c).

As células multinucleadas assim como a vacuolização característica (Fig. 18d) ou resultante dos processos de degenerescência das células do tubo seminíparo deixaram de ser observadas neste grupo de animais.

Nas observações realizadas ao microscópio electrónico de cortes finos de tubos seminíparos constatámos uma aparente normalidade dos componentes do epitélio seminíparo e um padrão normal da espermatogénese (Figs. 19a e 19b). Nas células de Sertoli não se observou vacuolização do citoplasma nem dilatações nos complexos juncionais (Fig. 19a). Nas espermátides jovens constatou-se a formação de um

sistema acrosômico aparentemente normal (Fig. 20a). As estruturas constituintes do flagelo, nomeadamente os complexos mitocondrial e axonémico apresentam aspecto normal (Fig. 20b).

Nos cortes finos dos tubos seminíparos utilizados para testar com a peroxidase a permeabilidade da barreira hemato-testicular observámos a presença das junções inter-sertolianas aparentemente integras, bloqueando a passagem do traçador para o compartimento adluminal (Figs. 20d e 20e).

Os resultados mostram que o traçador não penetra nas junções inter-sertolianas, mostrando aquele complexo completamente íntegro, o que contrasta significativamente com as imagens observadas em tubos seminíparos de animais intoxicados.

4.3. DISCUSSÃO

Conforme já tivemos ocasião de referir na introdução deste capítulo, um grande número de substâncias com efeitos antiespermatogénicos caracterizam-se pela reversibilidade da sua acção. Assim, a paragem da administração destas substâncias é

seguida pela regeneração do epitélio seminiparo que, após um período mais ou menos longo, acaba por recuperar a sua morfologia normal. O tempo necessário para essa recuperação parece depender, segundo Meistrich (1986) do número de células germinativas mortas.

Como referimos, as lesões observadas no epitélio seminiparo de ratinhos intoxicados experimentalmente com Nitrofurazona, nas doses que utilizámos, não afectam aparentemente as espermatogónias, elementos indispensáveis para uma possível recuperação da espermatogénese. Observações semelhantes foram efectuadas por Uematsu (1966) e Hagenas e colaboradores (1978) em ratos tratados com o mesmo fármaco. Por esse facto, estes autores sugerem ser a acção da Nitrofurazona reversível.

Os resultados das experiências que realizámos com o objectivo de verificar se as alterações provocadas pela Nitrofurazona eram reversíveis, permitem-nos também concluir que, após uma paragem de 30 dias já são nítidos os sinais morfológicos da regeneração do epitélio seminiparo assim como da recuperação do processo espermatogénico.

Também as observações que realizámos ao microscópio electrónico em animais no período da recuperação indicam

que a paragem da administração do nitrofurano durante o período de um mês é seguida pela regeneração do epitélio seminiparo, apresentando os elementos observados a sua ultraestrutura característica.

Os nossos resultados confirmam e completam estudos prévios, podendo-se portanto concluir, que as lesões testiculares provocadas pela Nitrofurazona a ratinhos nas doses e periodicidade que utilizámos são reversíveis, observando-se a regeneração do epitélio seminiparo após um período de trinta dias.

Como já referimos anteriormente, o fenómeno da recuperação da espermatogénese tem sido assinalado na literatura em relação a outros agentes antiespermatogénicos nomeadamente o Gossipol.

Conforme demonstrámos no Capítulo III, as alterações provocadas pela Nitrofurazona na espermatogénese do ratinho são acompanhadas da alteração da barreira hemato-testicular. É hoje admitido pela generalidade dos autores que o processo espermatogénico requer a integridade da referida barreira (Setchell e Waites 1975, Neaves 1977). A regeneração do epitélio seminiparo e do processo espermatogénico que observámos, leva-nos também a concluir que, após a paragem da administração da droga, houve reconstituição da barreira

hemato-testicular.

Assim, também efectuámos experiências in vitro para estudar o transporte da peroxidase e testar a integridade funcional da barreira hemato-testicular em tubos seminíparos de ratinhos em período de "regeneração". Embora tivéssemos realizado um número limitado de observações ao microscópio electrónico, observámos no epitélio destes animais, complexos juncionais inter-sertolianos com aspecto normal, capazes de bloquear a passagem do traçador para o compartimento adluminal do tubo.

ILUSTRAÇÕES

FIG. 18 — **TUBOS SEMINÍPAROS DE RATINHOS QUE APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA DURANTE 10 DIAS FORAM MANTIDOS SEM TRATAMENTO DURANTE UM PERÍODO DE 30 DIAS (PERÍODO DE REGENERAÇÃO) (a-c)**

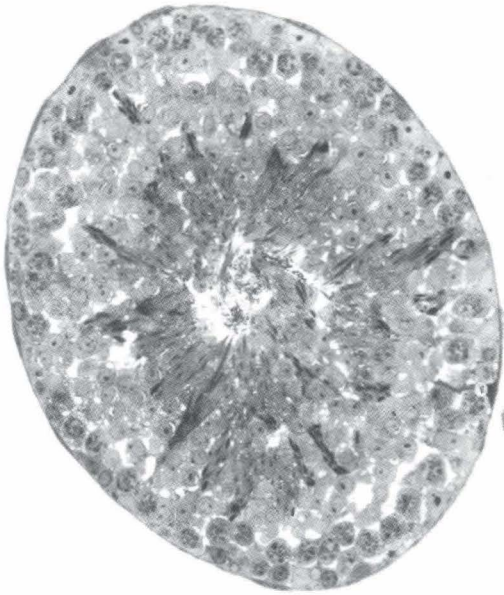
Cortes semifinos corados pelo Azul de Toluidina

Microfotografias ao microscópio óptico.

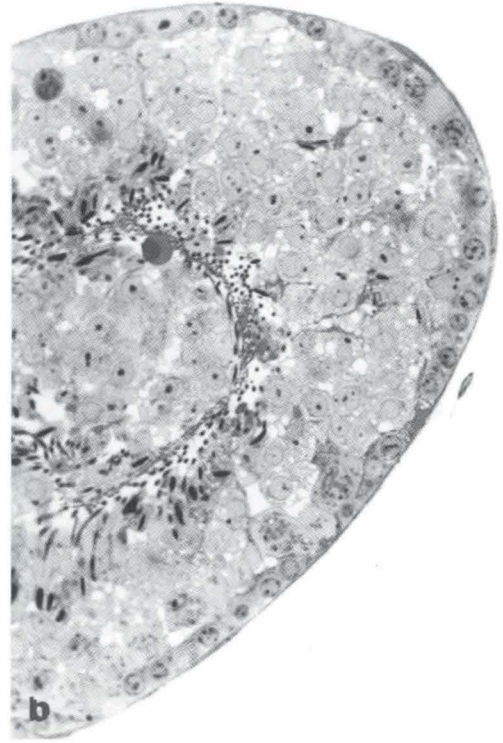
a. 400x; b. 580x; c. 580x

O epitélio seminíparo destes animais apresenta morfologia aparentemente normal, verificando-se a presença do lume tubular (a-c), contrariamente ao que se observa nos animais intoxicados com o fármaco (d). Contudo, o lume tubular pode apresentar elementos celulares em degenerescência e corpos residuais (†) (b, c).

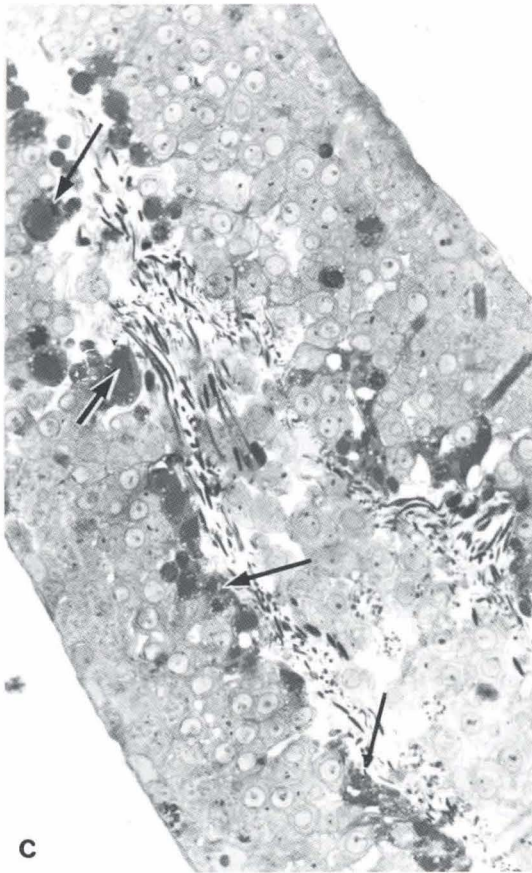
Para comparação, incluímos a microfotografia (d-600x) de um corte semifino do tubo seminíparo de ratinho com 70 dias de idade, colhido após o período de intoxicação em que são aparentes as alterações típicas do epitélio seminíparo.



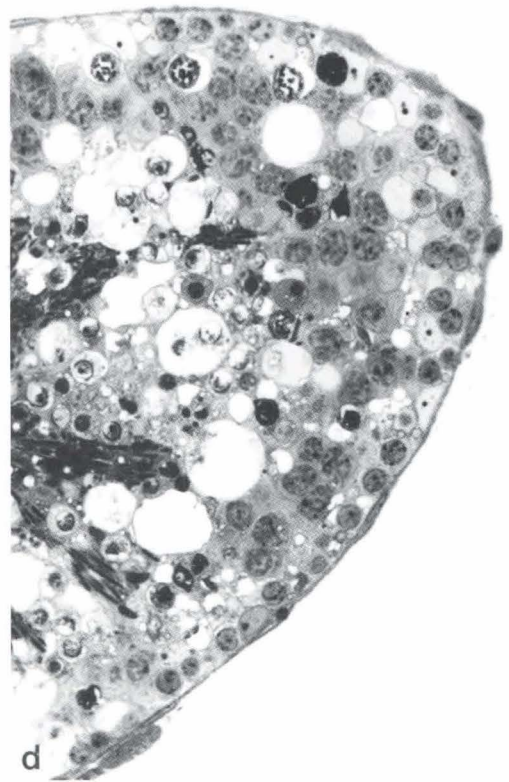
a



b



c



d

FIG. 19 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS QUE APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA DURANTE 10 DIAS FORAM MANTIDOS SEM TRATAMENTO DURANTE UM PERÍODO DE 30 DIAS (PERÍODO DE REGENERAÇÃO)** (Cont.)

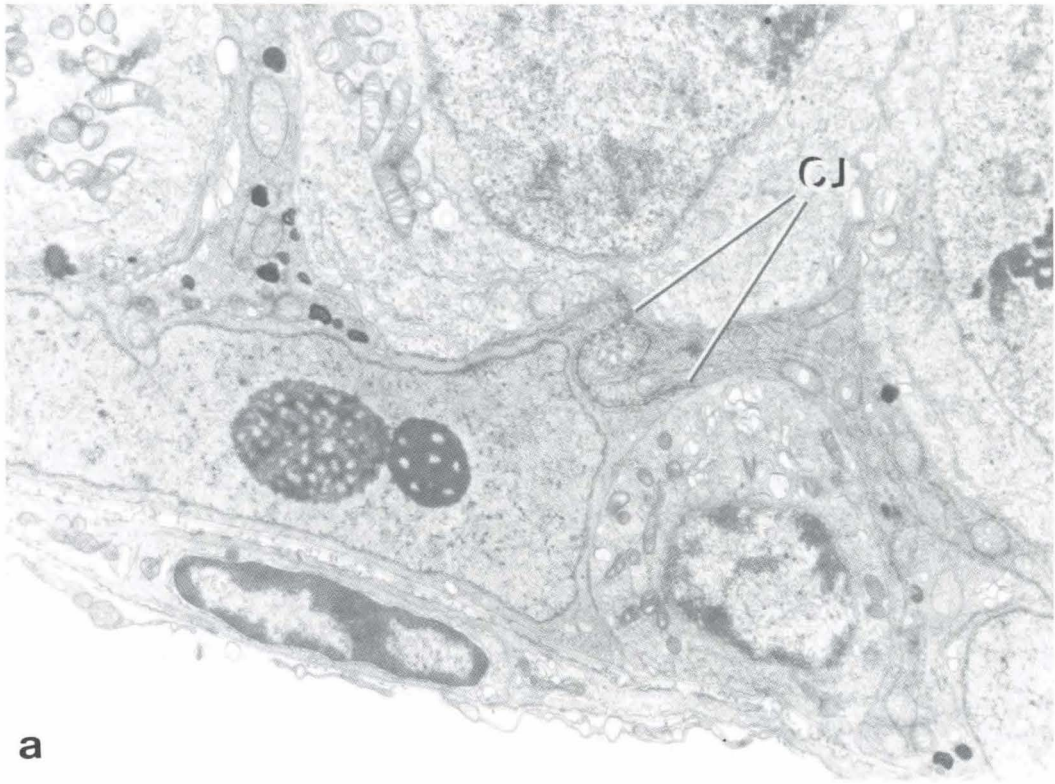
Microfotografias electrónicas.

a. 7 200x; b. 4 200x

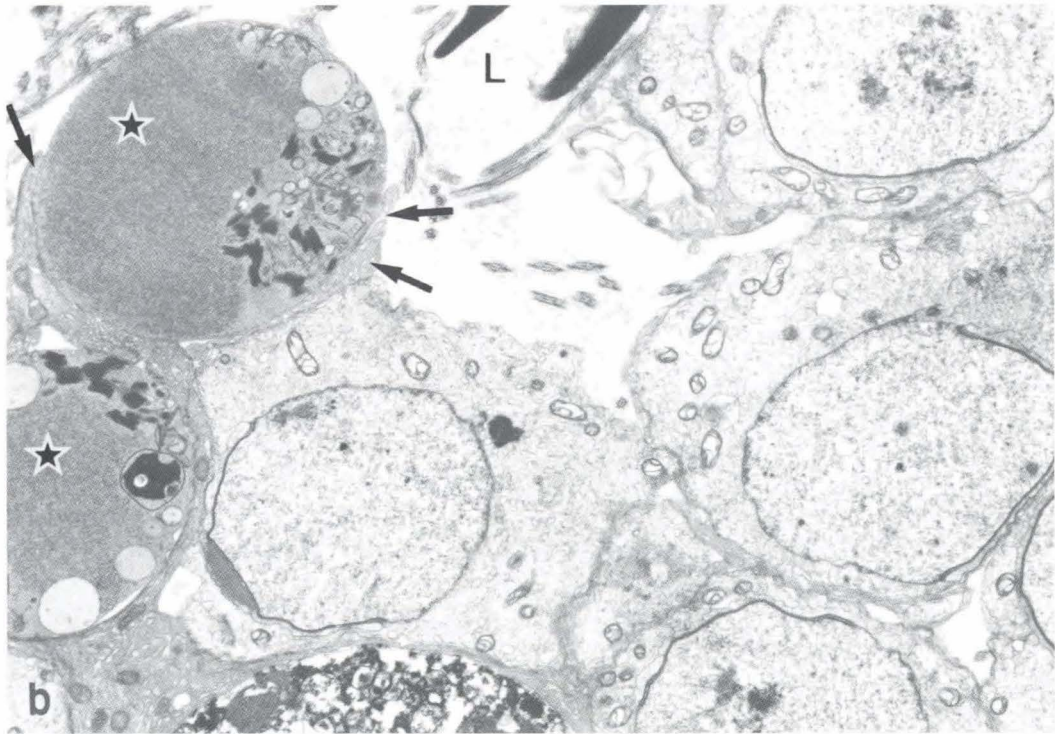
Porção basal (a) e luminal (b) do epitélio seminíparo.

A ultraestrutura dos vários elementos celulares representados nestas microfotografias está nitidamente bem conservada. O núcleo da célula de Sertoli apresenta cromatina finamente granular e um nucléolo proeminente, ambos com aspecto normal. Os complexos juncionais (CJ) têm ultraestrutura normal. Os corpos residuais (★) apresentam citoplasma electrodensa. Notar que são envolvidos por finos prolongamentos citoplasmáticos da célula de Sertoli (†).

L — lume do tubo seminíparo.



a



b

FIG. 20 — **TUBOS SEMINÍPAROS ISOLADOS DE RATINHOS QUE APÓS INTOXICAÇÃO COM NITROFURAZONA DURANTE 10 DIAS FORAM MANTIDOS SEM TRATAMENTO DURANTE UM PERÍODO DE 30 DIAS (PERÍODO DE REGENERAÇÃO).** (Cont.)

Microfotografias electrónicas.

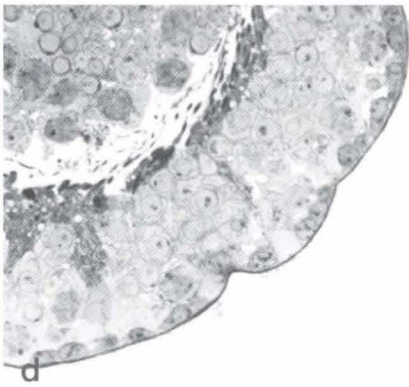
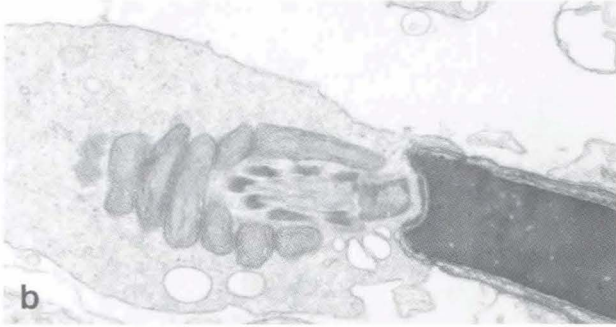
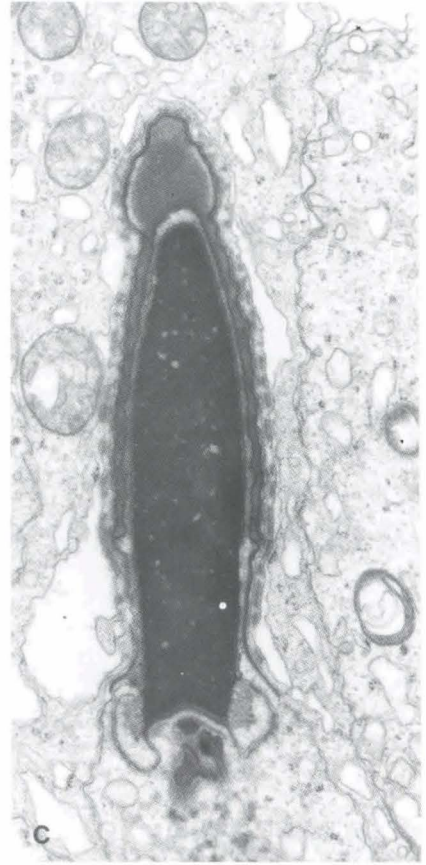
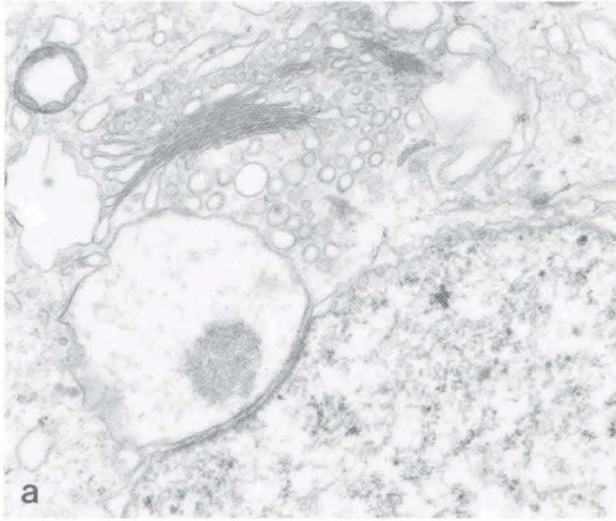
a. 20 000x; b. 20 000x; c. 12 000x;
e. 12 000x

Microfotografia ao microscópio óptico.

d. 480x

Após o período de regeneração algumas das estruturas habitualmente mais alteradas pela Nitrofurazona apresentam uma ultraestrutura normal (a-c).

A integridade da barreira hemato-testicular foi testada em experiências realizadas *in vitro* com tubos seminíparos destes animais, incubados em meio de Eagle contendo peroxidase durante 5-10', demonstrando-se a exclusão do traçador nos complexos juncionais (†) (d, e).



SUMARIO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objectivo estudar os efeitos da Nitrofurazona, um nitrofurano frequentemente utilizado em Medicina Veterinária como coccidiostático, na espermatogénese do ratinho.

Como primeiro objectivo pretendeu-se determinar a natureza das alterações do epitélio seminiparo de animais intoxicados com Nitrofurazona, de forma a contribuir para uma melhor compreensão da sua patogenia e por outro lado, obter informação sobre o mecanismos dessas alterações.

Ratinhos machos (Charles River) com oito semanas de idade foram injectados subcutaneamente com a suspensão de Nitrofurazona/parafina (40 mg/ml) em doses de 0,2 mg/g/peso vivo, com a periodicidade de 72 horas e durante 10 dias. Utilizaram-se como controlo animais apenas injectados com o veículo.

As alterações testiculares foram avaliadas através do exame anatómico do testículo e das observações ao microscópio óptico e microscópio electrónico de cortes semifinos e finos de tubos seminíferos.

Após intoxicação com Nitrofurazona observou-se vacuolização do epitélio, degenerescência celular, redução do lume tubular e presença de células multinucleadas. Ao microscópio electrónico, de entre as características mais notáveis, destacam-se: morfologia aberrante das células germinativas, alterações no processo de condensação nuclear, deficiência no desenvolvimento do sistema acrosómico e anomalias flagelares. Também se observaram alterações ultraestruturais acentuadas nas células de Sertoli, que se traduzem na vacuolização do seu citoplasma e alargamento das cisternas dos complexos juncionais.

De todas as células germinativas em diferenciação, as espermatogónias são aparentemente mais resistentes à intoxicação pela Nitrofurazona.

Foram efectuados estudos para identificar os possíveis mecanismos responsáveis pela alteração do epitélio seminíparo após intoxicação com Nitrofurazona.

Admitiu-se como hipótese que as alterações observadas nas células germinativas eram resultantes de uma lesão da barreira hemato-testicular.

De forma a investigar as alterações ultraestruturais da célula de Sertoli, nomeadamente dos

componentes da barreira hemato-testicular efectuaram-se estudos ultraestruturais. A integridade funcional da barreira hemato-testicular foi testada utilizando a peroxidase como traçador em tubos seminíparos isolados de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona. Estudaram-se as modificações da barreira hemato-testicular assim como a incorporação e transporte da peroxidase através das células de Sertoli.

A observação ao microscópio electrónico pôs em evidência, que nos animais intoxicados, a peroxidase é transportada em vesículas de endocitose através do citoplasma das células de Sertoli, para o compartimento adluminal. Foi também demonstrado que o traçador penetra no compartimento adluminal do tubo seminíparo através dos complexos juncionais das células de Sertoli adjacentes.

Destes resultados, concluiu-se que as alterações observadas no epitélio seminíparo de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona estão associadas a lesões da célula de Sertoli e da barreira hemato-testicular.

No âmbito deste estudo, foi também investigado se as alterações provocadas pela Nitrofurazona no tubo seminíparo do ratinho eram reversíveis. Com esse objectivo, utilizaram-se animais intoxicados com

Nitrofurazona de acordo com o protocolo experimental referido anteriormente e mantidos durante um período de 30 dias sem qualquer tratamento. Após o período de "regeneração" observaram-se em cortes semifinos nitidos sinais de reorganização do epitélio seminíparo. Estes resultados foram confirmados através das observações realizadas ao microscópio electrónico. Deu-se particular atenção à ultraestrutura das espermatídes, células de Sertoli e complexos juncionais inter-sertolianos.

A integridade funcional da barreira hemato-testicular foi também investigada nesses animais, utilizando-se a peroxidase como traçador. Os resultados obtidos demonstram que os complexos juncionais entre células de Sertoli adjacentes são morfologicamente normais e bloqueiam a entrada da peroxidase para o compartimento adluminal.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The purpose of the present work was to investigate the effects of Nitrofurazone, a coccidiostat nitrocompound used in Veterinary Medicine, on mouse spermatogenesis.

The first aim was to study the morphological changes of the seminiferous epithelium in Nitrofurazone-treated animals, in order to achieve a better understanding of their pathogenesis and to obtain clues to the mechanism of those alterations.

Male Charles River mice (8 weeks old) were subcutaneously injected with Nitrofurazone suspended in paraffin (40 mg/ml) at doses of 0.2 mg/g body weight, each 72h during 10 days. Vehicle-treated animals were used as controls.

Testicular damage has been evaluated by anatomical examination of the testis and by light and electron microscopic observation of seminiferous tubules thick and thin sections.

After intoxication with Nitrofurazone tissue vacuolation, cell degeneration, a reduction in the tubular lumen and multinucleated cell formation were

apparent. By electron microscopy the most striking features observed were: an aberrant morphology of the germ cells presenting an abnormal nuclear condensation, deficiencies in the acrosome system development and flagellar abnormalities.

Pronounced ultrastructural changes were also observed in the Sertoli cells namely cytoplasm vacuolation and enlargement of the junctional complexes cisternae.

By morphological criteria spermatogonia were apparently resistant to the Nitrofurazone treatment.

An attempt was made to identify possible underlying mechanisms responsible for seminiferous epithelium damage following Nitrofurazone treatment. It was admitted that the alterations observed in the germ cells could result from a primary lesion of the blood-testis barrier.

Electron microscopic and tracer methods were utilized to investigate the ultrastructural Sertoli cell alterations, namely their blood-testis barrier components. The blood-testis barrier functional integrity was checked using horseradish peroxidase as tracer in isolated seminiferous tubules of Nitrofurazone-treated mice. Attention was focused on the blood-

-testis barrier modifications and in uptake and pathway of peroxidase through Sertoli cells.

The electron microscopic observation shows that in treated animals peroxidase is transported through Sertoli cells cytoplasm by endocytic vesicles to the adluminal compartment. It was also shown that the tracer penetrates in the seminiferous tubules adluminal compartment, through the junctional complexes of adjacent Sertoli cells.

From those findings it was concluded that the changes observed in the seminiferous epithelium of Nitrofurazone-intoxicated mice are associated with lesions of the Sertoli cells and their blood-testis barrier components.

Another objective of our work was to investigate if the Nitrofurazone-induced alterations in the seminiferous epithelium were reversible. Intoxicated mice were allowed to recover during 30 days without any treatment. After this period of drug withdrawal it was observed in thick sections that seminiferous epithelium recovered their normal histological features. These results are substantiated by electron microscopic observations. Particular attention has been paid to the ultrastructure of spermatids, Sertoli cells and their

junctional complexes.

The functional integrity of the blood-testis barrier was also investigated in those animals using peroxidase as tracer. The observations have shown that junctional complexes are morphologically normal, and that the entry of peroxidase into the adluminal compartment is blocked.

BIBLIOGRAFIA

- ABREU, I. e DAVID-FERREIRA, J.F. - Fine structure of seminiferous tubules from prenatally irradiated rats. *Cell Tissue Res.*, 222:143-152, 1982.
- ALBERT, P.S.; SALERMO, R.G.; KAPOOR, S.N. e DAVIES, J.E. - The nitrofurans as sperm immobilizing agents; their tissue toxicity and their clinical application in vasectomy. *Fertil. Steril.*, 26:485-491, 1975.
- ALEXANDER, N.J. e TUNG, K.S.K. - Immunological and morphological effects of vasectomy in the rabbit. *Anat. Rec.*, 188:339-350, 1977.
- ALI, B.H. - Plasma and histological changes in Furazolidone treated chickens. *Res. Vet. Sci.*, 37:290-292, 1984.
- AMANN, R.P. - Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am. J. Anat.*, 110:69-78, 1962.
- AMAT, P.; PANIGUA, R. e MONTERO, J. - Seminiferous tubule degeneration in human cryptorchid testes. *J. Androl.*, 6:1-9, 1985.
- ANDERSON, R.A.; BERRYMAN, S.H.; PHILLIPS, J.F.; FEATHERGILL, K.A.; ZANEVELD, L.J.D. e RUSSELL, L.D. - Biochemical and structural evidence for ethanol-induced impairment of testicular development: apparent lack of Leydig cell involvement. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 100:62-85, 1989.
- ANOSA, V.O. e KANEKO, J.J. - Pathogenesis of Trypanosoma brucei infection in deer mice (Peromyscus maniculatus). Light and electron microscopic study of testicular lesions. *Vet. Pathol.*, 21:238-246, 1984.
- ARAGON, J.A. e LUSTIG, L. - Uptake of horseradish peroxidase by the testis and epididymis of mice. II. Electron microscopic study of the testis. *J. Reprod. Fert.*, 33:189-195, 1973.

- ARAGON, J.A., LUSTIG, L. e MANCINI, R.E. - Uptake of horseradish peroxidase by the testis and epididymis of mice. I. Light microscopic study. J. Reprod. Fert., 28:299-302, 1972.
- ARORA, U. e VIJAYARAGHAVAN, R.: Effect of subacute exposure to methyl isocyanate on testicular histomorphology in mice. Indian J. Exp. Biol., 27:347-349, 1989.
- AUDRING, H. ; KLUG, H.; BOLMANN, R.; SOKOLOWSKA-KOHLER, W. e ENGEL, S.: Ureaplasma urealyticum and male infertility: an animal model. II. Morphologic changes of testicular tissue at light microscopic level and electron microscopic findings. Andrologia, 21:66-75, 1989.
- BALLACHEY, B.E.; HOHENBOKEN, W.D. e EVENSON, D.P. - Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. Biol. Reprod., 36:915-925, 1987.
- BARTOOV, B.; FISHER, J.; ELTES, F., LANGSAM, J. e LUNENFELD, B. - A comparative morphological analysis of abnormal human spermatozoa. In: "Advances in diagnosis and treatment of infertility. (Eds. V. Insler e G. Bettendorf), Elsevier North Holland, pp. 355-373, 1981.
- BEDFORD, J.M.; MOORE, H.D.M. e FRANKLIN, L.E. - Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. Exp. Cell Res., 119:119-126, 1978.
- BERG, K.M. - The blood-testis barrier in sterile blue fox-silver fox hybrids compared with that in normal foxes of both species. Int. J. Androl., 7:167-175, 1984.
- BERGMANN, M. e DIERICHS, R. - Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. Anat. Embryol., 168:269-275, 1983.
- BERGMANN, M. ; SCHINDELMEISER, J. e GREVEN, H. - The blood-testis barrier in vertebrates having different testicular organization. Cell Tissue Res., 238:145-150, 1984.

- BERGMANN, M.; NASHAN, D. e NIESCHLAG, E. - Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. Cell Tissue Res., 256:183-190, 1989.
- BERNACCHI, A.S.; CASTRO, C.R.; TORANZO, E.G.D. e CASTRO, J.A. - Effects of Nifurtimox or Benznidazole administration on rat testes: ultrastructural observations and biochemical studies. Exp. Mol. Pathol., 45:245-256, 1986.
- BI, W.; WANG, Y.; HUANG, M. e MENG, D. - Effect of vinyl chloride on testis in rats. Ecotoxicol. Environ. Safety, 10:281-289, 1985.
- BLACKBURN, D.M.; GRAY, A.J.; LLOYD, S.C.; SHEARD, C.M. e FOSTER, P.M.D. - A comparison on the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 92:54-64, 1988.
- BLOOM, W. e FAWCETT, D.W. - A Textbook of Histology. (W.B. Saunders Co.) Philadelphia, pp 811, 831, 837, 1975.
- BOEKELHEIDE, K. - Rat testis during 2,5-Hexanedione intoxication and recovery. I. Dose response and the reversibility of germ cell loss. Toxicol. Appl. Pharmacol., 92:18-27, 1988.
- BOUFFARD, G. - Injection des couleurs de benzidine aux animaux normaux. Ann. Inst. Pasteur, 20:539-546, 1906. Citado por Willson e col., 1973.
- BRYAN, J.H.D. - Spermatogenesis revisited. I. On the presence of multinucleate spermatogenic cells in the seminiferous epithelium of the mouse. Z. Zellforsch., 112:333-349, 1971.
- BRYAN, J.H.D. e WOLOSEWICK, J.J. - Spermatogenesis revisited. II. Ultrastructural studies of spermiogenesis in multinucleate spermatids of the mouse. Z. Zellforsch., 138:155-169, 1973.
- BURKHART, J.G. e MALLING, H.V. - Differentiation of binuclear spermatozoa in mice. Gamete Res., 22:399-410, 1989.

- CARTER, S.D.; HESS, R.A. e LASKEY, J.W. - The fungicide methyl 2-benzimidazole carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats. Biol. Reprod., 37:709-717, 1987.
- CHAPIN, R.E.; MORGAN, K.T. e BUS, J.S. - The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administered 2,5-hexanedione. Exp. Mol. Pathol., 38:149-169, 1983.
- CHAPIN, R.E.; WHITE, R.D.; MORGAN, K.T. e BUS, J.S.: Studies of lesions induced in the testis and epididymis of F-344 rats by inhaled methyl chloride. Toxicol. Appl. Pharmacol., 76:328-343, 1984.
- CHEMES, H. - The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lisosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. Endocrinology, 119:1673-1681, 1986.
- CORRIER, D.E.; MOLLENHAUER, H.H.; CLART, D.E.; HARE, M.F. e ELISSALDE, M.H. - Testicular degeneration and necrosis induced by dietary cobalt. Vet. Pathol.; 22:610-616, 1985.
- COURTENS, J.L.; AMIR, D. e DURAND, J. - Abnormal spermiogenesis in bulls treated with ethylene dibromide: an ultrastructural and ultracytochemical study. J. Ultrastruct. Res., 71:103-115, 1980.
- CREASY, D.M.; BEECH, L.M.; GRAY, T.J.B. e BUTLER, W.H. - The ultrastructural effects of di-n-pentyl phthalate on the testis of the mature rat. Exp. Mol. Pathol., 46:357-371, 1987.
- CZAKER, R. e MAYR, B. - Multiple malformation of bovine spermatozoa with special reference to their lightmicroscopic fluorescing pattern and electronmicroscopic structure. Andrologia, 16:61-71, 1984.
- DAVIES, A.G. - Effects of hormones, drugs and chemicals on testicular function. Eden Press, Westmount, Vol. 1, 1980.
- DRIFE, J.O. - The effects of drugs on sperm. Drugs, 33:610-622, 1987.

- DYM, M. - The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier.
Anat. Rec., 175:639-656, 1973.
- DYM, M. e FAWCETT, D.W. - The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium.
Biol. Reprod., 3:308-326, 1970.
- DYM, M. e FAWCETT, D.W. - Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testes.
Biol. Reprod., 4:195-215, 1971.
- DYM, M. e CAVICCHIA, J.C. - Further observations on the blood-testis barrier in monkeys.
Biol. Reprod., 17:390-403, 1977.
- ESCALIER, D. - Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: a quantitative ultrastructural study of 6 cases.
Biol. Cell, 48:65-74, 1983.
- ESCALIER, D. e SERRES, C. - Aberrant distribution of the peri-axonemal structures in the human spermatozoon: possible role of the axoneme in the spatial organization of the flagellar components.
Biol. Cell, 53:239-250, 1985.
- FAWCETT, D.W. - Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: "Handbook of Physiology, Male Reproductive System" (Eds. R.O. Greep e E.B. Astwood), Vol. V, Sect 7, Williams e Wilkins, Baltimore, pp. 21-55, 1975.
- FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V. e HEIDER, P.M. Jr - Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier.
J. Reprod. Fertil., Suppl., 10:105-122, 1970.
- FEITO, R.J. - Ultrastructural study of abnormal spermiogenesis in four hystricognate rodents.
J. Reprod. Fert., 88:411-418, 1990.
- FLICKINGER, C. e FAWCETT, D.W. - The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium.
Anat. Rec., 158:207-221, 1967.

- FLICKINGER, C.J.; HERR, J.C.; HOWARDS, S.S.; SISAK, J.R.; GLEAVY, J.M.; FUSIA, T.J.; VAILLES, L.D. e HANDLEY, H.H. - Early testicular changes after vasectomy and vasovasostomy in Lewis rats. *Anat. Rec.*, 227:37-46, 1990.
- FONTES, E.C.S.M. - A utilização da 5-Nitro-2-Furadaldeído Semicarbazona em pecuária intensiva. Estudo toxicológico em modelo laboratorial (Mus musculus) e modelo industrial (Gallus gallus domesticus). Dissertação de doutoramento, Escola Superior de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 1988.
- FOSTER, P.M.D.; FOSTER, J.R.; COOK, M.W.; THOMAS, L.V. e GANGOLLI, S.D. - Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63:120-132, 1982.
- FUKUOKA, M.; TANIMOTO, T.; ZHOU, Y.; KAWASAKI, N.; TANAKA, A.; IKEMOTO, I. e MACHIDA, T. - Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part I. *J. Appl. Toxicol.*, 9:277-283, 1989.
- GOMES, W.R. - Chemical agents affecting testicular function and male fertility. In: "The Testis" (Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes e N.L. Van Demark), Vol. 3, Academic Press, New York, pp. 483-554, 1970.
- GOSDEN, R.G.; RICHARDSON, D.W.; BROWN, N. e DAVIDSON, D.W. - Structure and gametogenic potential of seminiferous tubules in ageing mice. *J. Reprod. Fertil.*, 64:127-133, 1982.
- GOUVEIA, M.A. - The testes in cadmium intoxication: morphological and vascular aspects. *Andrologia*, 20:225-231, 1988.
- GRAHAM, R.C. e KARNOVSKY, M.J. - The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14:291-302, 1966.
- GRAY, T.J.B. - Testicular toxicity in vitro: Sertoli-germ cell co-cultures as a model system. *Fd. Chem. Toxic.*, 24:601-605, 1986.

- GUPTA, R.K.; BARNES, G.W. e SKELTON, F.R. - Light-microscopic and immunopathologic observations on cadmium chloride-induced injury in mature rat testis. *Am. J. Pathol.*, 51:191-205, 1967.
- HAGENÄS, L.; PLÖEN, L. e RITZÉN, E.M. - The effect of Nitrofurazone of the endocrine, secretory and spermatogenic functions of the rat testis. *Andrologia*, 10:107-126, 1978.
- HAMASAKI, M. - Effect of estrogens on spermatogonial mitosis. *Adv. Contra. Deliv. Systems*, 5:7-29, 1989.
- HANAICHI, T.; SATO, T.; HOSHINO, N. e MIZURO, N. - A stable lead stain by modification of Sato's method. *Proc. XIth Int. Cong. on Electron Microscopy, Kyoto*, 2181-2182, 1986.
- HATIER, R. e GRIGNON, G. - Ultrastructural study of the Sertoli cell and limiting membrane in the seminiferous tubule of the adult cryptorchid rat. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, 52:305-318, 1986.
- HATIER, R.; GRIGNON, G. e TOUATI, F. - Ultrastructural study of seminiferous tubules in the rat after prenatal irradiation. *Anat. Embryol.*, 165:425-435, 1982.
- HEINDEL, J.J. e TREINEN, K.A. - Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic Pathol.*, 17:411-445, 1989.
- HIRANO, M.; MAITA, K. e SHIRASU, Y. - Effect of N-nitrosoethylenethiourea on germinal cells in male mice. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46:697-704, 1984.
- HOFFER, A.P. - Ultrastructural studies of spermatozoa and the epithelial lining of the epididymis and vas deferens in rats treated with Gossypol. *Archs. Androl.*, 8:233-246, 1982.
- HOFFER, A.P. - Effects of Gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study. *Biol. Reprod.*, 28:1007-1020, 1983.

- HOLSTEIN, A.F. - Morphologische studien an abnormen spermatiden und spermatozoen des menschen. Virchows Arch. (Pathol. Anat. and Histol.), 367:93-112, 1975.
- HOLSTEIN, A.F. e ECKNANN, C. - Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. Andrologia, 18:5-16, 1986.
- HRUDKA, F. e ELJACK, A.H. - The effect of ethylene dibromide on differentiation of the acrosome, nucleus and transient nuclear appendages in ram spermatids. J. Ultrastruct. Res., 67:135-151, 1979.
- HUANG, H.F.S.; YANG, C.S.; MEYENHOFER, M.; GOULD, S. e BOCCABELLA, A.V. - Disruption of sustentacular (Sertoli) cell tight junctions and regression of spermatogenesis in vitamin-A- deficient rats. Acta Anat., 133:10-15, 1988.
- JOHANSEN, T.E.B.; CLAUSEN, O.P.F. e NESLAND, J.M. - A comparative study of the effects of non-union of testis and epididymis and cryptorchidism on testicular development and spermatogenesis in the rat. Andrologia, 20:315-327, 1988.
- KADOTA, T.; CHIKAZAWA, H. e TAKAHASHI, N. - Toxicological study of etoposide (VP-16) in rats with special emphasis on testicular alteration. Toxicology Letters, 45:185-194, 1989.
- KAINZ, V.; FRICK, J.; KAINZ, P.; KALLA, N.R.; ROVAN, E. e ADAM, H. - The effect of Gossypol acetic acid on the different stages of the spermatogenic cycle in the rat. Int. J. Androl., 11:533-546, 1988.
- KORMANO, M. - Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the postnatal rat. Histochemie, 9:327-338, 1967.
- LAGO, A.D. e LUCKE, S. - A method of fixing rat testis for light and electron microscopy. Stain Technol., 48:289-295, 1973.

- LEVIN, A.A.; BOSAKOWSKI, T.; EARLE, L.L. e BUTTERWORTH, B.E. - The reversibility of nitrobenzene - induced testicular toxicity: continuous monitoring of sperm output from vasocystotomized rats. *Toxicology*, 53:219-230, 1988.
- LINDER, R.E.; HESS, R.A. e STRADER, L.F. - Testicular toxicity and infertility in male rats treated with 1,3- dinitrobenzene. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 19:477-489, 1986.
- LU, C.C.; CAGEN, S.Z.; DARMER, K.I. e PATTERSON, D.R.: Testicular effects induced by dermal or inhalation exposure to para-tertiary butyl benzoic acid (pt BBA) in Fischer 344 rats. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:233-243, 1987.
- MARTINOVA, Y.; KANTCHEVA, L. e TZVETKOV, D. - Testicular ultrastructure in infertile men. *Archs. Androl.*, 22:103-122, 1989.
- McCLURE, R.D.; BRAWER, J. e ROBAIRE, B. - Ultrastructure of immotile spermatozoa in an infertile male: a spectrum of structural defects. *Fert. Steril.*, 40:395-399, 1983.
- McNEIL, S.I. e BHATNAGAR, M.K. - Ultrastructure of the testis of Pekin ducks fed methyl mercury chloride: seminiferous epithelium. *Am. J. Vet. Res.*, 46:2019-2025, 1985.
- MEISTRICH, M.L. - Critical components of testicular function and sensivity to disruption. *Biol. Reprod.*, 34:17-28, 1986.
- MEISTRICH, M.L.; FINCH, M.; da CUNHA, M.F.; HACKER, U. e AU, W.W. - Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res.*, 42:122-131, 1982.
- MENG, G.D.; ZHU, J.-C.; CHEN, Z.-W.; WONG, L.-T.; ZHANG, G.-Y.; HU, Y.-Z.; DING, J.-H.; WANG, X.-H.; QIAN, S.-Z.; WANG, C.; CHIN, D.M.; PINOL, A. e WAITES, G.M.H. - Recovery of sperm production following the cessation of Gossypol treatment: a two-centre study in China. *Int. J. Androl.*, 11:1-11, 1988.

- MESFIN, G.M.; MORRIS, D.F.; SEAMAN, W.J. e MARKS, T.A. - Testicular lesions in rats treated with a sympatholytic hypotensive agent (Losulazine).
J. Am. Coll. Toxicol., 8:525-538, 1989.
- MIYAGI, T.; MIYAMOTO, M. e UEDA, Y. - Inhibition of spermatogenesis and atrophy of the testis caused by nitrofurane compounds.
Acta Pathol. Japon., 14:261-173, 1964.
- MORALES, A.; RICHTER, P. e TORAL, M.I. - Polarographic determination of Nitrofurazone and Furazolidone in pharmaceutical formulations and urine.
Analyst., 112:971-973, 1987.
- MORTON, D.; WEISBRODE, S.E.; WYDER, W.E.; MAURER, J.K. e CAPEN, C.C. - Spermatid giant cells, tubular hypospermatogenesis, spermatogonial swelling, cytoplasmic vacuoles, and tubular dilatation in the testes of normal rabbits.
Vet. Pathol., 23:176-183, 1986.
- NAGANO, T.; SUZUKI, F. e TOYAMA, Y. - Morphological characteristics of junctional complexes between the Sertoli cells in the seminiferous tubules.
Proc. Xith Int. Cong. on Electron Microscopy, Kyoto 1861 - 1864, 1986.
- NEAVES, W.B. - Permeability of Sertoli cell tight junctions to lanthanum after ligation of ductus deferens and ductuli efferentes.
J. Cell Biol., 59:559-572, 1973.
- NEAVES, W.B. - The blood-testis barrier. In: (Eds. A.D. Johnson e W.A. Gomes, . Academic Press. New York, Vol. IV, pp. 125-162, 1977.
- NELSON, W.O. e STEINBERGER, E. - Effects of nitrofurane compounds on the testis of the rat.
Fed. Proc., 12:103, 1953.
- NELSON, W.O. e BUNGE, R.G. - The effect of therapeutic dosages of Nitrofurantoin (Furadantin) upon spermatogenesis in man.
J. Urol., 77:275-281, 1957.
- NEUMAN, V.; ZENOULKA, M.; SINDALAROVA, K. e KLIMES, B. - Effect of Nitrofurazone on the sex organs of male rats and cocks.
Veterinarstvi (chec.), 15:271-275, 1965.

- NOWS, J.F.M.; VREE, T.B.; AERTS, M.M.L.; DEGEN, M. e DRIESSENS, F. - Some pharmacokinetic data about Furaltadone and Nitrofurazone administered orally to preruminant calves.
Vet. Quart., 9:208-214, 1987.
- OKO, R. e HRUDKA, F. - Segmental aplasia of the mitochondrial sheath and sequelae induced by Gossypol in rat spermatozoa.
Biol. Reprod., 26:183-195, 1982.
- OISHI, S. - Reversibility of testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl) phthalate in rats.
Environ. Res., 36:160-169, 1985.
- OSHIO, S.; OZAKI, S.; OHKAWA, J.; TAYIMA, T.; KANEKO, S. e MOHRI, H. - Damaging effects of Adriamycin on mouse spermatozoa.
Adv. Contra. Deliv. Syst., 3:215-224, 1988.
- PARI, G.A. - Über die werwendbarkeit vitäler karmineinspritzungen für die pathologische anatomie.
Frank. Z. Pathol., 4:1-29, 1910. Citado por Willson e col., 1973.
- PARVINEN, M. e MALI, P. - Cell interactions in seminiferous epithelium.
ISI ATLAS of Science: Immunology: 161-166, 1988.
- PAUL, H.E.; PAUL, M.F.; KOPKO, F.; BENDER, R.C. e EVERETT, G. - Carbohydrate metabolism studies on the testis of rats fed contain nitrofurans.
Endocrinology, 53:585-592, 1953.
- PEIRCE, E.J. e BREED, W.G. - Cytological organization of the seminiferous epithelium in the Australian rodents Pseudomys australis and Notomys alexis.
J. Reprod. Fert., 80:91-103, 1987.
- PELLETIER, R.M. e FRIEND, D.S. - Sertoli cell junctional complexes in Gossypol - treated neonatal and adult guinea pigs.
J. Androl., 7:127-139, 1986.
- PEREIRA, L.; PESSOA, J.F.C.; SILVA, A.J. e FONTES, E.M. - Degenerescência e necrose do tubo seminíparo induzidas pela Nitrofurazona. Resultados preliminares. XXII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica, Evora.
Ciênc. Biol., 131:103, 1988a.

- PEREIRA, L.; PESSOA, J.F.C.; SILVA, A.J. e FONTES, E.M.
 - Ultrastructural study of Nitrofurazone-induced seminiferous tubules injury in the mouse. VIII International Symposium on Morphological Sciences, Roma.
 Quaderni di Anatomia Pratica, 44:311, 1988b.
- PEREIRA, L.; PESSOA, J.F.C.; SILVA, A.J. e FONTES, E.M.
 - Ultrastructural study of spermiogenesis on Nitrofurazone-treated mice. 9th European Congress on Electron Microscopy EUREM 88, York.
 Inst. Phys. Conf. Ser., 93:245-246, 1988c.
- PEREIRA, L.; PESSOA, J.F.C.; SILVA, A.J. e FONTES, E.M.
 - Células multinucleadas em tubos seminíparos de ratinhos intoxicados com Nitrofurazona. Resultados preliminares. II Reunião Conjunta das Sociedades Portuguesa e Espanhola de Microscopia Electrónica, IBEREM 1988, Lisboa.
 IBEREM Abstracts, 1988d.
- PESSOA, J.F.C. - A barreira hemato-testicular. Contribuição para o estudo de macromoléculas. Dissertação de doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, 1976.
- PESSOA, J.F.S. e DAVID-FERREIRA, J.F. - Bidirectional transport of horseradish peroxidase by the rat Sertoli cells. An in vitro study.
 Biol. Cellulaire, 39:301-304, 1980.
- PESSOA, J.F.C.; PEREIRA, L.; SILVA, A.J. e FONTES, E.M.
 - Mice seminiferous tubules followed by Nitrofurazone treatment. Horseradish peroxidase transport through Sertoli cells junctions.
 Proc. the Fifth Zagazig World Conference on Obstetrics and Gynaecology "Fertility Problems", Cairo, 1989.
- PHILLIPS, J.C.; FOSTER, P.M. e GANGOLLI, S.D. - Chemically-induced injury to the male reproductive tract. In: "Endocrine Toxicology" (Eds. J.A. Thomas, K. Korach e J. McLachlan) Raven Press, New York. pp. 117-134, 1985.
- QUESADA, M.A.Z.; MARTINEZ, L.P.; RAMIREZ, R.M.P. e FIERRO, R.N. - Effect of Furazolidone on the semen of cocks.
 Vet. Bull., 57:777-778, 1987.

- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; PEREIRA, C.A.B. e BEÇAK, W. - Activity of ethylene oxide in the mouse sperm morphology test.
Arch. Toxicol., 60:331-333, 1987.
- ROSS, M.H. - The Sertoli cell and the blood-testicular barrier: an electron-microscopic study.
Forsch. Androl., 1:83-86, 1970.
- RUSSELL, L.D. - Sertoli-germ cell interrelations: a review.
Gamete Res., 3:179-202, 1980.
- RUSSELL, L.D. - Normal testicular structure and methods of evaluation under experimental and disruptive conditions. In: "Reproductive and Developmental toxicity of Metals" (Eds. T.W. Clarkson, G.F. Nordberg e P.R. Sager, Plenum Publishing Corporation. New York, pp. 227-252, 1983.
- RUSSELL, L.D. -Spermiation - the sperm release process: ultrastructural observations and unresolved problems. In:"Ultrastructure of Reproduction" (Eds. J. Van Blerkom e P.M. Motta) Martinus Nighoff, Boston, pp. 46-66, 1984.
- RUSSELL, L.D. e CLERMONT, Y. - Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats.
Anat. Rec., 187:347-366, 1977.
- RUSSELL, L.D. e PETERSON, R.N. - Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates.
Int. Rev. Cytol., 94:177-211, 1985.
- RUSSELL, L.D.; MALONE, J.P. e KARPAS, S.L. - Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation.
Tissue & Cell, 13:369-380, 1981.
- SAEGUSA, J. - Radiomimetic toxicity of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP).
Ind. Health, 24:1-14, 1986.
- SAEGUSA, J. - Cumulative effects of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) on kidney and testis.
Ind. Health, 27:49-58, 1989.

- SAKAI, Y. e YAMASHINA, S. - Mechanism for the removal of residual cytoplasm from spermatids during mouse spermiogenesis.
Anat. Rec., 223:43-48, 1989.
- SCHENCK, V. e SCHILL, W.B. - Cytology of the human seminiferous epithelium.
Acta Cytologica, 32:689-696, 1988.
- SETCHELL, B.P. - The functional significance of the blood-testis barrier. Review article.
J. Androl., 1:3-10, 1980.
- SETCHELL, B.P. e WAITES, G.M.H. - The blood-testis barrier. In: "Handbook of Physiology Male Reproductive System" (Eds. R.O. Greep e E.B. Astwood). Vol. V, Sect 7, Washington, pp. 143-172, 1975.
- SETCHELL, B.P.; VOGLMAYR, Y.K. e WAITES, G.M.H. - A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph.
J. Physiol., London, 200:73-85, 1969.
- SHEMI, D.; SOD-MORIAH, U.A.; ABRAHAM, M. e FRIEDLANDER, M.; POTASHNIK, G. e KAPLANSKI, J. - Ultrastructure of testicular cells in rats treated with dibromochloropropane (DBCP).
Andrologia, 21:229-236, 1989.
- SILVA, A.J. - 5-Nitrofuranos. Possiveis riscos do seu emprego em Medicina Veterinária. Estudo complementar apresentado para Provas de Doutorado, Lisboa, 1976.
- SINGH, A. e EZEASOR, D. - Ultrastructure of Sertoli cells in cryptorchid goats.
Archs. Androl., 23:61-70, 1989.
- SNOW, R.L. e HAYS, R.L. - Phasic distribution of seminiferous tubules in rats treated with Triphenyltin compounds.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 31:658-665, 1983.
- SOMKUTI, S.G.; LAPADULA, D.M.; CHAPIN, R.E.; LAMB, J.C. e ABOU-DONIA, M.B. - Time course of the tri-o-cresyl phosphate-induced testicular lesion in F-344 rats: enzymatic, hormonal and sperm parameter studies.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 89:64-72, 1987.

- STEINBERGER, E. e NELSON, W.O. - The effect of Furadroxil treatment and x-irradiation on the hyaluronidase concentration of rat testes.
Endocrinology, 60:105-117, 1957.
- SWAN, M.A. e CHRISTIDIS, L. - Impaired spermatogenesis in the finch hybrid L. castaneothorax by L. punctulata: transmission electron microscopy and genetic analysis.
Gamete Res., 17:157-171, 1987.
- TINDALL, D.J.; ROWLEY, D.R.; MURTHY, L.; LIPSHULTZ, L.I. e CHANG, C.H. - Structure and biochemistry of the Sertoli cell.
Int. Rev. Cytol., 94:127-149, 1985.
- UEMATSU, K. - Testicular changes of rats induced by Nitrofurazone: a light and electron microscopic study.
Med. J. Osaka Univ., 16:287-320, 1966.
- VEERAMACHANENI, D.N.R.; OTT, R.S.; HEATH, E.H.; MCENTEE, K.; BOLT, D.J. e HIXON, J.E. - Pathophysiology of small testes in beef bulls: relationship between scrotal circumference, histopathologic features of testes and epididymides, seminal characteristics, and endocrine profiles.
Am. J. Vet. Res., 47:1988-1999, 1986.
- VOGL, A.W. - Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells.
Int. Rev. Cytol., 119:1-56, 1989.
- WAUBEN-PENRIS, P.J.J.; VELDSCHOLTE, J.; ENDE, A.V.D. e DONK, H.A.V.D. - The release of iron by Sertoli cells in culture.
Biol. Reprod., 38:1105-1113, 1988.
- WIEBE, J.P. e BARR, K.J. - The control of male fertility by 1,2,3-trihydroxypropane (THP, glycerol): Rapid arrest of spermatogenesis without altering libido, accessory organs, gonadal steroidogenesis, and serum testosterone, LH and FSH.
Contraception, 29:291-302, 1984.
- WILLSON, J.T.; JONES, N.A.; KATSH, S. e SMITH, S.W. - Penetration of the testicular-tubular barrier by horseradish peroxidase induced by adjuvant.
Anat. Rec., 176:85-100, 1973.

WONG, T.W.; STRAUSS, F.H. e FOSTER, L.V. - Cytoplasmic granular change of Sertoli cells ins two cases of Sertoli-cell-only syndrome.
Arch. Pathol. Lab. Med., 112:200-205, 1988.

YANAGIMACHI, R. e NODA, Y.D. - Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization.
J. Ultrastruct. Res., 31:465-485, 1970.

YAZAMA, F.; NISHIDA, T.; KUROHMARU, M. e HAYASHI, Y. - The fine structure of the blood-testis barrier in the boar.
Jpn. J. Vet. Sci., 50:1259-1261, 1988.