

**QUANTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS WISTAR
TRATADOS COM DIMETIL SULFÓXIDO**
(*Histological quantification of spermatogenesis in dimethyl sulfoxide treated wistar rats*)

ALMEIDA, L.M.¹; WEISS, R.R.²; CASTRO, C.S.³; BÜCHELE, J.⁴

¹Departamento de Anatomia, Setor de Ciências Biológicas;

²Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR, C.P. 2959, CEP 80.035-050, Curitiba-PR-Brasil;

³Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG;

⁴Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR.

RESUMO – Avaliaram-se através de histologia testicular quantitativa os efeitos da ação do Dimetil Sulfóxido (DMSO) na espermatogênese de 28 ratos adultos albinos da raça Wistar. Os animais foram divididos em dois grupos - Controle e Experimental - e submetidos a dois tipos de tratamento: no primeiro tratamento, o Grupo Experimental (10 animais) recebeu aplicações tópicas de DMSO no jarrete, duas vezes ao dia, na dosagem de 1 g/kg⁻¹ de peso vivo, durante sete dias consecutivos; no segundo tratamento, o Grupo Experimental (7 animais) recebeu aplicações tópicas de DMSO no escroto duas vezes ao dia, na dosagem de 1 g/kg⁻¹ de peso vivo, durante 54 dias consecutivos; os Grupos Controles (8 e 3 animais) receberam aplicações de solução salina friccionada na pele do jarrete e do escroto duas vezes ao dia, por período equivalente ao dos tratamentos, respectivamente. Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular, diâmetro dos túbulos seminíferos, contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero e rendimento intrínseca da espermatogênese não apresentaram diferença significativa entre os grupos Controles e Experimentais. O processo espermatogênico não sofreu alteração após a aplicação do DMSO.

Palavras chaves: espermatogênese, cinética, quantificação, ciclo do epitélio seminífero, dimetil sulfóxido.

ABSTRACT – In order to provide a more accurate analysis on the effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on spermatogenesis in mammals, an experiment was carried out with albino Wistar rats. A total of 28 rats, 78 days old and average weight of 325 g were divided in one control group and two experimental groups - G1 and G2. Rats from G1 were treated with topic applications of DMSO in the hock twice a day at a dosage of 1.0 g/kg of live weight for 7 consecutive days. Rats from G2 received topic applications of DMSO at the scrotum twice a day at a dosage of 1.0 g/kg of live weight for 54 consecutive days. The control group was swabbed with saline on the hock and the scrotal skin twice a day for the same period as the treatment of G1 and G2 groups. Volumetric proportions of the testicular parenchyma, diameter of the somniferous tubules, counting of cell types in the somniferous epithelium and intrinsic spermatogenesis yield showed no significant differences (P<0.05) between the groups studied. According to the results of the present study, applications of DMSO and saline solution did not appear to affect anyone of the major spermatogenesis processes.

Key words: spermatogenesis, kinetics, quantification, seminiferous epithelium cycle, dimethyl sulfoxide.

Introdução

Dimetil sulfóxido (DMSO), de fórmula (H₃C)₂O, é um líquido incolor originalmente utilizado como solvente industrial (ALSUP, 1984; BRAYTON, 1986).

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

entre as quais a ação antiinflamatória é a mais utilizada em clínica. O mecanismo primário da ação do DMSO na inflamação aguda é provavelmente a eliminação de radicais hidroxila (De La TORRE, 1983; GOROG e KOVACS, 1975; ROSENBLUM, 1983).

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

Essas propriedades e eventuais efeitos tóxicos têm gerado muita controvérsia, e não

existe consenso quanto aos benefícios e desvantagens de seu uso na clínica veterinária.

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

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

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

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

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

Visando um melhor conhecimento dos efeitos do DMSO sobre a fertilidade de machos, decidiu-se realizar o presente estudo com o objetivo de avaliar a espermatogênese de ratos tratados com DMSO.

Material e Métodos

Utilizaram-se 28 ratos albinos da raça Wistar, com 75 dias de idade e peso vivo médio de 325 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram divididos em:

Tratamento I - Aplicação de 1 g/kg⁻¹ de peso vivo de DMSO gel friccionado na pele da

região do jarrete, duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos.

- Grupos Controles I e II - Aplicação de solução salina embebida em algodão e friccionada na pele da região do jarrete, duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos.

- Grupo Experimental I (GEI) (5 animais) e Grupo Controle I (GCI) (4 animais) foram sacrificados 23 dias após o início do tratamento (período equivalente à metade da duração completa da espermatogênese).

- Grupo Experimental II (GEII) (5 animais) e Grupo Controle II (GCII) (4 animais) foram sacrificados 50 dias após o início do tratamento (período equivalente ao final da duração completa da espermatogênese).

Tratamento II - Aplicação de 1 g/kg⁻¹ de peso vivo de DMSO gel friccionado na pele do escroto, duas vezes ao dia, durante 54 dias consecutivos.

- Grupo Controle III (GCIII) (3 animais) - Aplicação de solução salina embebida em algodão e friccionada na pele do escroto, duas vezes ao dia, durante 54 dias.

- Grupo Experimental III (GEIII) (7 animais) foi sacrificado 1 dia após o término do tratamento.

Todos os animais foram anestesiados com éter e sacrificados. Mediante incisão mediana ao longo do eixo longitudinal do escroto, colheram-se os testículos, que em seguida foram seccionados transversalmente e colocados em líquido de Bouin. Após essa prefixação, procedeu-se ao corte de fragmentos do parênquima de aproximadamente 2 mm de diâmetro. Após fixação por 3 horas no líquido de Bouin, os fragmentos foram colocados em recipiente contendo formol a 10% (aldeído fórmico), onde permaneceram por 24 horas.

Depois de desidratados pela passagem em álcool de concentrações crescentes e diafanizados em xilol, foram incluídos em parafina, segundo a técnica rotineira (MICHALANY, 1980). Procedeu-se então à microtomia, obtendo-se cortes com 4 µm de espessura, os quais foram corados por hematoxilina de Harris + eosina alcoólica.

A análise histológica quantitativa dos testículos compreendeu os seguintes itens:

- 1) diâmetro tubular médio, obtido pela medida do diâmetro de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, em cada testículo. As medidas foram feitas com microscópio Leitz® Dialuz 22, com ocular micrométrica 10X, acoplada a objetiva de 16X;
- 2) proporção volumétrica de túbulos

semíniferos, estimada pelo método estereométrico, segundo ELIAS *et al.* (1971), utilizando ocular integradora Zeiss® kpl, 8X, acoplada a objetiva de 45X. Foram computados, para a obtenção do volume percentual de túbulos seminíferos, 1.000 pontos por testículo, 2.000 por animal e 56.000 nos 28 animais;

3) população celular dos túbulos seminíferos, estimada pela contagem de núcleos de células espermatogênicas e de células de Sertoli em 10 secções transversais de túbulo contendo um mesmo estágio do ciclo do epitélio seminífero (CES), em cada testículo. Os seguintes tipos de células espermatogênicas foram contados: espermátides arredondadas nos estágios pós-divisionais (de 5 a 8); espermátócito I, na fase de paquíteno, no estágio 3 do CES; células de Sertoli, contadas com base na presença de seus nucléolos, no estágio 3 do CES. Os estágios do ciclo do epitélio seminífero foram estudados segundo o método da morfologia tubular, utilizando-se como critérios a morfologia nuclear das células espermáticas, a presença de divisões meióticas e a posição das espermátides no epitélio seminífero

(ORTAVANT *et al.*, 1984; ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950). Todos os números de células espermatogênicas, exceto os números de células de Sertoli, foram corrigidos em cada testículo, para o diâmetro nuclear e para a espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de ABERCROMBIE (1946). Os diâmetros nucleares foram medidos com microscópio Leitz® Dialuz 22, com ocular micrométrica 10X acoplada à objetiva de 40X.

Para a análise estatística dos dados, foram feitos cálculos da média aritmética e do desvio padrão para os parâmetros número de células espermatogênicas, diâmetro dos túbulos seminíferos e proporção volumétrica, com o software Sigmastat (Jandel Scientific, Co.). Para comparação dos grupos Experimentais e Controles utilizou-se o teste "t" de Student, e análise de variância para detectar diferenças entre tratamentos. O teste de Dunnet foi empregado para isolar os grupos que apresentavam diferenças significativas.

Resultados

Os resultados obtidos no presente trabalho estão sumariados nas TABELAS 1, 2 e 3.

TABELA 1 – DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 23 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I 1996 (N=9).

Parâmetro	Grupo Experimental I	Grupo Controle I
	(x±s)	(x±s)
Proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (%)	83,90±1,01	82,75±0,50
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	285,50±11,82	277,67±4,77
Número corrigido* de células espermatogênicas/ secção transversal de túbulo seminífero:		
- espermátócito primário em paquíteno (SPTI PQ)	21,37±0,92	22,02±1,55
- espermátide arredondada (SPD-ar)	67,46±2,69	69,82±2,42
- células de Sertoli	19,60±0,79	20,05±0,21
- razão** entre o número corrigido de SPTI PO e SPD-ar	1:3,1	1:3,1

*Correção segundo ABERCROMBIE (1946).

**Número de espermátides observadas dividido pelo número esperado.

Como se pode observar, no grupo de animais sacrificados 23 dias após o início do tratamento I não ocorreu variação estatisticamente significativa nos valores médios para a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos, para o diâmetro dos túbulos seminíferos e para o número de células espermatogênicas (espermátócito I em paquíteno no estágio 3 do CES, espermátide arredondada nos estágios pós-divisionais do CES e células de Sertoli no estágio 3 do CES), entre o Grupo Experimental e o Grupo Controle (TABELA 1).

No grupo de animais sacrificados 50 dias após o início do tratamento I não houve diferença estatisticamente significativa nos

valores médios observados na proporção volumétrica dos túbulos seminíferos e na população de espermátide arredondada entre o Grupo Experimental e o Grupo Controle. Todos os demais parâmetros, no entanto, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$): o diâmetro tubular médio apresentou valores menores para os animais tratados, em relação aos valores observados nos animais controles; a população de espermátócitos em paquíteno no estágio 3 do CES e o número de células de Sertoli do Grupo Experimental apresentaram valores ligeira porém significativamente maiores do que os obtidos para o Grupo Controle (TABELA 2).

TABELA 2 – DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 50 DIAS APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO I - 1996 (N=9).

Parâmetro	Grupo Experimental II	Grupo Controle II
	(x±s)	(x±s)
Proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (%)	82,78±1,59	83,42±1,52
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	277,81±4,23 ^b	286,64±1,78
Número corrigido* de células espermatogênicas/ secção transversal de túbulo seminífero:		
- espermatócito primário em paquíteno (SPTI PQ)	20,44±0,69 ^b	18,98±0,48 ^a
- espermatíde arredondada (SPD-ar)	70,26±1,93 ^b	69,30±0,05
- células de Sertoli	19,84±0,74 ^B	18,25±0,21 ^a
- razão** entre o número corrigido de SPTI PO e SPD-ar	1:3,4 ^B	1:3,6 ^B

* Correção segundo ABERCROMBIE (1946).

a b letras diferentes na mesma linha indicam significância (p<0,05).

No grupo de animais sacrificados 1 dia após o término do tratamento II as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas nos valores médios para a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos, para o diâmetro dos túbulos seminíferos e para o número de células espermatogênicas (espermatócito I em paquíteno no estágio 3 do CES; espermatíde arredondada, nos estágios pós divisionais do CES e células de Sertoli no estágio 3 do CES) entre o Grupo Experimental e o Grupo Controle (TABELA 3).

Discussão

Devido à ausência de estudos relacionando o uso do DMSO com a espermatogênese de

machos de qualquer espécie, o presente experimento tem caráter inédito e os dados obtidos somente podem ser comparados com valores médios observados nos animais do Grupo Controle.

Os valores médios encontrados para a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos dos animais do Grupo Controle, tanto do tratamento I como do tratamento II, encontram-se ligeiramente inferiores aos observados em outros roedores, como no *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990) e em ratos albinos Sprague-Dawley (ROOSEN-RUNGE, 1955). Comparados com os de outras espécies, verifica-se que tais valores ocupam posição intermediária entre os do gambá *Didelphis albiventris* (QUEIROZ, 1991) e os do coelho (AMANN, 1970).

TABELA 3 – DADOS DA HISTOLOGIA QUANTITATIVA DOS TESTÍCULOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM DMSO GEL E SACRIFICADOS 1 DIA APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO II -1996 (N=10).

Parâmetro	Grupo Experimental III	Grupo Controle III
	(x±s)	(x±s)
Proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (%)	83,27±0,54	83,03±0,80
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	281,57±2,53	282,75±6,40
Número corrigido* de células espermatogênicas/ secção transversal de túbulo seminífero:		
- espermatócito primário em paquíteno (SPTI PQ)	22,32±0,62	22,21±1,09
- espermatíde arredondada (SPD-ar)	71,70±2,26	71,02±1,90
- células de Sertoli	20,06±1,42	18,93±1,00
- razão** entre o número corrigido de SPTI PO e SPD-ar	1:3,2	1:3,2

*Correção segundo ABERCROMBIE (1946).

Essas diferenças refletem a maior ou a menor quantidade de tecido intertubular que caracteriza o testículo de uma determinada espécie. Os valores encontrados para o Grupo Experimental e para o Grupo Controle foram muito próximos, variando de 82,78% a 83,90% e de 82,75% a 83,42%, respectivamente.

Os valores médios gerais obtidos para o diâmetro dos túbulos seminíferos no Grupo Controle dos animais sacrificados 23 dias após o

início do tratamento I (GCI) e nos animais sacrificados 1 dia após o término do tratamento II (GCIII) revelaram-se comparáveis aos observados em gambá *Didelphis albiventris* (QUEIROZ, 1991) e superiores aos de roedores silvestres (PARREIRA e CARDOSO, 1993). Já o Grupo Controle dos animais sacrificados 50 dias após o início do tratamento I (GCI) obteve média geral superior à observada no Grupo Experimental, sugerindo retração tecidual

resultante do tipo de fixador utilizado, que foi o bovino.

Segundo SWIERSTRA (1968), os diversos tempos de fixação e inclusão utilizados no processamento histológico de fragmentos do parênquima testicular resultam em índices médios de retração volumétrica similares, havendo porém diferenças significativas entre animais.

A contagem de células espermatogênicas e de células de Sertoli em seções transversais de túbulos seminíferos permite a obtenção de índices que refletem o rendimento intrínseco da espermatogênese. No presente trabalho, nos animais sacrificados 23 dias após o início do tratamento I evidencia-se entre o número de espermátócitos primários em paquíteno e o número de espermátides arredondadas a razão de 1:3,1, tanto para o GC I como para o GE I, indicando igualdade no rendimento meiótico e perda de cerca de 25% em relação ao número esperado da divisão de todos os espermátócitos. Nos animais sacrificados 50 dias após o início do tratamento I, a contagem dos espermátócitos primários em paquíteno feita no estágio 3 apresentou diferença significativa entre o GC II e o GE II (TABELA 2). Com a metodologia utilizada no presente estudo, não foi possível analisar a evolução da população de células espermatogênicas desde espermatogônias até a formação de espermátócitos primários, quando se verifica a ocorrência, segundo ROOSEN-RUNGE E GIESEL (1950), de quatro picos de atividade mitótica - dois referentes à espermatogônia A e dois referentes à espermatogônia B. CLERMONT (1962) constatou que cerca de 10,6% das espermatogônias A sofriam degeneração, levando a uma redução do número esperado de espermátócitos primários esperados da divisão de cada espermatogônia-tronco.

O rendimento meiótico, ou seja, a razão entre o número de espermátócitos primários em paquíteno e o número de espermátides arredondadas, foi de 1:3,4 para o GE II e de 1:3,6 para o GC II, mostrando que 85% do número esperado de espermátides foi alcançado para o Grupo Experimental e 90% do número esperado de espermátides foi alcançado para o Grupo Controle, indicando, assim, que o processo espermatogênico no presente estudo foi pouco afetado por degenerações durante as duas divisões meióticas, apesar de apresentarem diferença significativa. Tal variação numérica dentro de uma mesma espécie foi observada no rato (CLERMONT, 1962; ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950), nos bovinos europeus

(BERNDTSON e DESJARDINS, 1974), no carneiro deslanado (QUEIROZ, 1985), no zebu (CARDOSO, 1981), no suíno (14) e no roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990). Nos animais sacrificados 1 dia após o término do tratamento II, constata-se no rendimento meiótico a razão de 1:3,2 tanto para os animais do GC III como para os animais do GE III. Isso indica, com base na razão teórica esperada (1:4,0), perda de cerca de 20% das espermátides arredondadas.

Degenerações celulares na espermatogênese normal de mamíferos adultos têm sido observadas por inúmeros autores, não só na fase de divisão meiótica como também durante a fase de proliferação espermatogonial (BERNDTSON, 1977; ROOSEN-RUNGE, 1973). Abordando o problema do rendimento da espermatogênese em mamíferos, COUROT *et al.* (1970) afirmaram que, teoricamente, cada espermátócito primário dá origem a quatro espermátides, mas isso praticamente nunca acontece devido à ocorrência de degenerações durante as divisões meióticas.

Em relação à população de células de Sertoli, é sabido que elas não se dividem e mantêm o seu número constante no epitélio seminífero em animais adultos (HOCHEREAU-De REVIERS *et al.*, 1987).

Os valores médios observados entre o GC I e o GE I dos animais sacrificados 23 dias após o início do tratamento I e nos animais sacrificados 1 dia após o término do tratamento II não apresentaram variação significativa. Nos animais sacrificados 50 dias após o início do tratamento I, os valores médios observados entre o GC II e o CE II apresentaram variação significativa. Os números médios dessas células encontrados no Grupo Controle são comparáveis aos observados em ratos albinos Sprague-Dawley (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950) e superiores aos encontrados em roedores silvestres *Bolomys lasiurus* (PARREIRA, 1990). Deve-se ressaltar que as discrepâncias encontradas entre o GC II e o CE II parecem resultar do fato de estarem os animais entrando na puberdade e não apresentarem a constância do número de células de Sertoli, característica geral de todos os mamíferos (ORTAVANT *et al.*, 1984). Segundo CLERMONT e MORGENTALER (1955), a população de células de Sertoli mantém-se estável em animais adultos, sendo essas células extremamente resistentes a injúrias drásticas capazes de afetar os demais tipos celulares do epitélio seminífero.

Conclusões

Os resultados da avaliação da influência do dimetil sulfoxido sobre a espermatogênese permitem a seguinte conclusão: no protocolo posológico empregado, o DMSO não interferiu na contagem dos elementos celulares do epitélio seminífero, no diâmetro dos túbulos seminíferos, nas proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular e no rendimento intrínseco da espermatogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anatomical Record**, v.94, p.238-248, 1946.
- ALSUP, E.M. Dimethyl sulfoxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, n.9, p.1011-1014, 1984.
- AMANN, R.P. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. **Fertility Sterility**, v.21, n.9, p.662-672, 1970.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**, v.44, n.5, p.818-833, 1977.
- BERNDTSON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**, v.140, p.167-178, 1974.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary**, v.76, p.61-90, 1986.
- CARDOSO, F.M. **Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebus (*Bos indicus*)**. Belo Horizonte, 1981. 208 p. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- CLERMONT, Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. **American Journal of Anatomy**, v.111, p.111-129, 1962.
- CLERMONT, Y.; HARVEY, S.C. Effects of hormones on spermatogenesis in the rat. **Endocrinology**, v.16, p.173-196, 1967.
- CLERMONT, Y.; MORGENTALER, H. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. **Endocrinology**, v.57, p.369-382, 1955.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-De REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. **The testis**. New York, Academic Press, 1970. v.1, p.339-432.
- DAVID, N.A. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. **Annual Review of Pharmacology**, v.12, p.353-374, 1972.
- De La TORRE, J.C. Role of dimethyl sulfoxide in prostaglandin-tromboxane and platelet systems after cerebral ischemia. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.411, p.293-308, 1983.
- ELIAS, H.; HENNIG, A.; SCHWARTZ, D.E. Stereology: applications to biomedical research. **Physiological Reviews**, v.51, p.158-200, 1971.
- FERRARI, M.V. **Características reprodutivas de ovinos (*Ovis aries*) submetidos a tratamentos com dimetil sulfoxido (DMSO)**. Curitiba, 1995. 62 p. Tese de Mestrado, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná.
- GOROG, P.; KOVACS, I.B. Antiarthritic and antithrombotic effects of topically applied dimethyl sulfoxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.243, p. 91-97, 1975.
- HOCHEREAU-De REVIERS, M.T.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34(Suppl.), p.101-114, 1987.
- KNOWLES, R.P. Clinical experiences with DMSO in small animal practice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.141, p.478-483, 1967.
- MICHALANY, J. Operações fundamentais da técnica histológica. In: MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo, E.P.U., 1980. p.22-31.
- ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-De REVIERS, M.T. Espermatogênese en los mamíferos domésticos. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduccion de los animales domésticos**. Zaragoza, Editorial Acribia, 3 ed. 1984, p.171-190.
- PARREIRA, G.G. **Morfologia e variação sazonal da atividade dos testículos e órgãos genitais acessórios de *Bolomys lasiurus* Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae)**. Belo Horizonte, 1990. 97 p. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PARREIRA, G.G.; CARDOSO, F.M. Seasonal variation of the spermatogenic activity in *Bolomys lasiurus* (Lund, 1841) (Rodentia, Cricetidae), from Southeastern Brazil. **Mammalia**, v.57, n.1, p.27-34, 1993.
- QUEIROZ, G.F. **Estudo morfológico e quantitativo da atividade testicular do gambá *Difelphis albiventris* (Marsupialia)**. Belo Horizonte, 1991. 83 p. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- QUEIROZ, G.F. **Estudo morfológico e quantitativo da espermatogênese de carneiros deslanados**. Belo Horizonte, 1985. 84p. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- ROOSEN-RUNGE, E.C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.339-348, 1973.
- ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL JR., L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **American Journal of Anatomy**, v.87, n.1, p.1-30, 1950.
- ROOSEN-RUNGE, E.C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **Anatomical Record**, v.123, n.4, p.384-398, 1955.

- ROSENBLUM, W. Dimethyl sulfoxide effects on platelet aggregation and vascular reactivity in pial microcirculation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.411, p.110-119, 1983.
- RUBIN, L.F. Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.243, p.98-103, 1975.
- RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHAHAKIM, A.P.; CLEGG, E.D. The classification and timing of spermatogenesis. In: RUSSEL, L.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, Cache River Press, 1990, p.41-58.
- SCHUCH, J.; ROSS, C.; MESCHTER, C. Concurrent mercuric blister and dimethyl sulfoxide (DMSO) application as a cause of mercury toxicity in two horses. **Equine Veterinary Journal**, v.20, p.68, 1988.
- SWIERSTRA, E.D. Cytology and duration of the cycle the seminiferous epitheliun of the boar: duration of spermatozoan transit through the epididymis. **Anatomical Record**, v.161, p.171-186, 1968.