

ROSANA ALMADA BASSANI

ESTUDO QUANTITATIVO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE RATOS SIALOA
DENECTOMIZADOS.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para ob
tenção do título de Mestre em
Biologia, na área de Fisiolo
gia.

CAMPINAS

-1983-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: ROSANA ALMADA BASSANI

Nº de Identificação: 795367

Endereço para Correspondência:

Curso: Fisiologia - Depto. de Fisiologia e Biofísica-I.B.-UNICAMP

Nome do Orientador: Ernesto José Dottaviano

Título da Dissertação ou Tese: Estudo quantitativo do epitélio seminífero de ratos sialoadenectomizados.

Data proposta para a Defesa: 25.05.83

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

25/05/83

Data



assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

De acordo:

Orientador: 

O que foi feito é dedicado a

o companheiro JOSÉ

a filha MARIANA

os pais MARIA e AJAX

os mestres AFFONSO, AQUILES e MARTHA

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas a quem desejo agradecer. Por falta de espaço físico, serão mencionadas apenas algumas (em ordem alfabética).

- Prof. AFFONSO LUIZ FERREIRA, pelo acompanhamento deste trabalho desde o seu planejamento, e pela inestimável orientação na análise histológica.
- Prof. ANTONIO CELSO RAMALHO, pelas idéias e opiniões, bem como pelo gentil empréstimo de seu material bibliográfico.
- Prof. AQUILES EUGÊNICO PIEDRABUENA, pela orientação estatística, e pelos ensinamentos tão importantes que me transmitiu.
- Prof. ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO, pela orientação e auxílios dispensados.
- Srta. IVETE DE JESUS ROQUE, pelo processamento histológico do material utilizado neste trabalho.
- Prof. JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI, pela sua participação em todas as fases deste trabalho.
- Profa. MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA, pela minha iniciação no pensamento científico.
- Prof. REINALDO AZOUBEL, pelo auxílio no estudo alométrico desenvolvido neste trabalho.
- Prof. RICARDO MAYER DE AQUINO, pelo auxílio no processamento de dados deste trabalho.

Sra. SONIA MARIA TAVARES COSTA, pela contribuição aos de
senhos que ilustram este trabalho.

Aos demais que colaboraram e cujos nomes não cons-
tam aqui, muito obrigada.

5.2. Espermátides redondas em ratos de 30 dias de idade	56
5.3. Espermátides alongadas em ratos de 42 dias de idade	56
6. Freqüências Relativas dos Estádios do Ciclo do Epitélio Seminífero	60
DISCUSSÃO	67
1. Pesos Corporal e Testicular	67
2. Histometria do Túbulo Seminífero	72
3. Epitélio Germinativo	76
RESUMO E CONCLUSÕES	83
(SUMMARY)	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

INTRODUÇÃO

As glândulas salivares têm sido, nesta metade do século, objeto de numerosos estudos, uma vez que se acumulam evidências de que, além de sua função exócrina, também desempenham funções endócrinas.

Em 1944, ITO e colaboradores isolaram e purificaram uma substância proteica, presente na glândula parótida de bovinos, biologicamente ativa, capaz de promover a calcificação de tecidos duros em ratos, e reduzir a concentração sérica de cálcio em coelhos. Este fator foi chamado "Parotin" (ITO, 1960). Em 1952, ITO & ANOUMA isolaram Parotin a partir de glândulas submandibulares: o S-Parotin.

Diversas substâncias de ação biológica sobre tipos específicos de tecidos têm sido descritas em glândulas submandibulares de roedores. Entre elas, podem ser citados: o "fator de crescimento epitelial" (*epithelial growth factor* - EGF), proteína capaz de acelerar a abertura das pálpebras e a erupção dos dentes de animais recém-nascidos (COHEN, 1962); o "fator de crescimento nervoso" (*nervous growth factor* - NGF), proteína que estimula o desenvolvimento de células do sistema nervoso simpático (ANGELETTI, LEVI-MONTALCINI & CALISSANO, 1968); uma substância de atividade semelhante à renina renal (MICHELAKIS *et alii*, 1974); uma calicreína, com atividade cininogênica e ação ocitócica sobre o útero de rata (BERALDO, SI-

QUEIRA & HENEINE, 1974); o "fator de crescimento mesodérmico" (*mesodermal growth factor* - MGF), capaz de estimular o crescimento celular da córnea (WEIMAR & HARAGUCHI, 1975); um fator de crescimento endotelial (HOFFMAN *et alii*, 1976); um fator hiperglicemiante, que possui ação biológica e características imunológicas semelhantes às do glucagon pancreático (LAWRENCE *et alii*, 1976; BHATHENA *et alii* 1977), além de outros possíveis fatores, ainda não isolados, tais como um fator que teria um papel na regulação dos órgãos linfáticos (MARTINEZ-HERNANDEZ, NAKANE & PIERCE, 1973), e um fator letal, que seria liberado de glândulas submandibulares transplantadas (HOSHINO & LIN, 1968).

Muitos autores têm sugerido a existência de relações funcionais entre as glândulas salivares e outras glândulas endócrinas. Tem sido descrito que a hipofisectomia leva a atrofia e a diminuição da atividade enzimática da glândula submandibular do camundongo (LACASSAGNE & CHAMORRO, 1940), do rato (SHAFER, CLARK & MUHLER, 1956) e do cobaia (ANOUMA *et alii*, 1970b).

Por outro lado, têm sido relatadas alterações em outras glândulas endócrinas, subsequentes à ablação das glândulas submandibulares. BARTHE *et alii* (1970) encontraram redução do peso da hipófise em ratos privados das glândulas submandibulares, sendo observada recuperação após a administração de Parotin. Também foram observadas, após extirpação destas glândulas em ratos, regressão da tireóide (NUNEZ, 1970), diminuição do peso das adrenais (LOUSSOUARN, 1972) e atrofia do timo (MARTINEZ-HER-

NANDEZ *et alii*, 1973).

As gônadas têm sido as glândulas endócrinas com as quais mais se tem procurado investigar possíveis relações com as glândulas salivares.

Há claras evidências de que os hormônios sexuais são capazes de influenciar a atividade secretória das glândulas salivares. LACASSAGNE (1940) descreveu dimorfismo sexual nas glândulas submandibulares do camundongo adulto: a glândula do macho caracteriza-se por uma predominância do componente tubular, apresentando túbulos secretores grandes, delimitados por células cilíndricas altas e repletas de grânulos secretórios acidófilos; já, na fêmea, os túbulos secretores são menores, e predominam as formações acinosas, que constituem a maior parte da glândula. Estas características, no entanto, não são distinguíveis antes da puberdade e, no animal adulto, estão sujeitas a alterações, dependendo das condições hormonais. Camundongos machos tratados com benzoato de estrona apresentam expansão da porção acinar e regressão do componente tubular das glândulas submandibulares, enquanto que fêmeas tratadas com testosterona desenvolvem hipertrofia dos túbulos secretores, em cujas células aumenta o número de grânulos acidófilos (LACASSAGNE, 1940).

No camundongo macho castrado, a atrofia dos túbulos secretores da glândula submandibular pode ser revertida pelo tratamento com testosterona (LACASSAGNE *et al*, 1940; DOINE & FAVA DE MORAES, 1979), o que resulta em aumento da extensão do retículo endoplasmático, do número

de ribossomas, e do número e tamanho dos grânulos de secreção das células tubulares, ou seja, no redesenvolvimento de estruturas ligadas diretamente às funções secretórias (CHRÉTIEN, 1972; 1977).

Além do dimorfismo sexual a nível histológico da glândula submandibular do camundongo, foram relatadas diferenças bioquímicas, dependentes dos hormônios sexuais, especialmente os andrógenos.

As glândulas submandibulares do camundongo macho adulto, comparadas às de machos impúberes e fêmeas, contêm níveis mais altos de NGF (BURDMAN & GOLDSTEIN, 1965; ANGELETTI *et alii*, 1968), EGF (ROBERTS, 1974) e renina (HIRATA & ORTH, 1979), além de serem mais ricas no suposto fator letal (HOSHINO & LIN, 1969). Estas observações concordam com os resultados de JUNQUEIRA *et alii* (1949), que relataram, no macho adulto, maior atividade das proteases produzidas na porção tubular da glândula submandibular. De fato, os túbulos granulares parecem ser onde se localizam diversas substâncias de produção dependente de andrógenos, tais como NGF (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1961), renina (BHOOLA, DOREY & JONES, 1973) e enzimas tóxicas presentes na saliva do camundongo (HIRAMATSU, HATAKEYAMA & MINAMI, 1980).

Também tem sido relatado, no camundongo macho castrado, uma redução dos níveis de NGF (ANGELETTI *et alii* 1968) e da atividade de renina (BHOOLA *et alii*, 1973).

Por outro lado, a administração de andrógenos tem se mostrado efetiva no aumento de concentração de

diversas substâncias presentes na glândula submandibular do camundongo. Foram descritas concentrações elevadas de NGF em glândulas submandibulares de machos pré-adolescentes (BURDMAN *et al*, 1965) e fêmeas (BURDMAN *et al*, 1965; BUEKER, WEIS & SCHENKEIN, 1965; ANGELETTI *et alii*, 1968; ISHII & SHOOTER, 1975) androgenizados. Também um aumento da concentração de EGF foi obtido em fêmeas tratadas com testosterona (ROBERTS, 1974; GRESIK *et alii*, 1981). Do mesmo modo, foi demonstrado aumento da atividade de renina em glândulas submandibulares de machos castrados e fêmeas após a administração de andrógeno (OLIVER & GROSS, 1967), e observado maior efeito letal do transplante de glândulas submandibulares de camundongos machos imaturos e fêmeas após tratamento prévio com testosterona (LIN & HOSHINO, 1969).

No que diz respeito ao rato, é discutida a existência de dimorfismo sexual na glândula submandibular. Alguns autores não observaram diferenças histológicas dependentes do sexo em glândulas submandibulares do rato adulto (SHAFER & MUHLER, 1953; FUKUDA, 1967). No entanto, outros autores têm relatado dimorfismo sexual nesta glândula, caracterizado, assim como no camundongo, pelo maior diâmetro (GRAD & LEBLOND, 1949; JACOBY & LEESON, 1959) e maior número (MUDD & WHITE, 1975) de túbulos granulares no macho adulto, comparado a fêmeas adultas ou jovens de ambos os sexos.

SHAFER *et al* (1953) encontraram redução do tamanho e número de túbulos secretores, bem como das granu-

lações neles presentes, após castração, em ratos machos. Testosterona, quando administrada a estes animais ou a ratos intactos, teve efeitos opostos aos da castração.

Pelo que se verifica na literatura, parece que, no rato, a influência dos andrógenos sobre a glândula submandibular não é tão evidente quanto no camundongo. BALDI & CHARREAU (1972) propõem que isto se deva à maior capacidade de degradação da testosterona em metabólitos de menor atividade biológica, na glândula submandibular do rato.

No entanto, há indicações de que, no rato, exista uma relação sinérgica entre testosterona e tiroxina para a manutenção das glândulas submandibulares, devido a necessidade da administração conjunta destes hormônios para a reversão das alterações causadas, na glândula submandibular, por orquiectomia e tireoidectomia (GRAD *et al.*, 1949) e hipofisectomia (SHAFER *et alii*, 1956; SREEBNY *et alii*, 1957).

A influência das glândulas salivares sobre a função reprodutiva masculina tem sido amplamente estudada, e os resultados relatados têm sido bastante contraditórios.

Verificando os efeitos da ablação das glândulas salivares, alguns pesquisadores encontraram sinais diretos ou indiretos de alteração da função testicular. PARMON, BABES & PETREA (1957) relataram inibição da espermatogênese após parotidectomia bilateral, em ratos, sendo este efeito também observado em coelhos (CASTRO CASTRO, 1973). Tem sido descrito, em ratos sialoadenectomizados, uma redução do peso testicular (BIXLER, MUHLER & SHAFER, 1955 a ; BIXLER, WEBSTER & MUHLER, 1957), assim como queda dos ní-

veis de frutose das vesículas seminais (THOMAS & HILL, 1967). Em cobaias, ANOUMA *et alii* (1970a) verificaram, após sialoadenectomia, diminuição do peso do sêmen, queda da frutose seminal e da motilidade, velocidade e viabilidade dos espermatozóides, podendo estas alterações serem revertidas pela administração de Parotin. Como resultado da extirpação das glândulas submandibulares no camundongo, tem sido observada atrofia de paragônadas (NARASIMHAN & GANLA, 1967). bem como regressão testicular e diminuição da atividade sexual (JOHNSON, KEKEH & YAPI, 1970), e alterações atróficas e degenerativas, de caráter progressivo a nível de epitélio germinativo (COLETTI *et alii*, 1978). No rato, a ablação das glândulas submandibulares causou atrofia testicular (KATAGIRI & HIGASHIJO, 1948) e diminuição do peso de prostata e vesículas seminais (BARTHE *et alii*, 1970).

Em contraposição aos resultados citados acima, outros autores não observaram efeitos deletérios sobre o sistema reprodutor masculino, decorrentes da remoção das glândulas salivares. Após sialoadenectomia, em ratos, MUHLER & SHAFER (1954) não observaram alteração do peso testicular. BIXLER, MUHLER & SHAFER (1955b) relataram, inclusive, aumento do peso dos testículos de ratos dessalivados. VIEIL LEMARINGE (1968; 1970), realizando extirpação das glândulas submandibulares em camundongos recém-nascidos, demonstrou que este procedimento levava à aceleração da espermatogênese, observando aumento do peso testicular e maior celularidade no epitélio seminífero, em especial das células germinativas mais maduras, tendo encontrado também sinais

de maior atividade das células de Leydig. *PARMON et alii* (1957) também relataram aumento aparente da atividade espermatogênica após a retirada das glândulas submandibulares, no rato.

Entre essas duas correntes existentes na literatura - uma, descrevendo alterações morfológicas e funcionais do testículo, e outra, ao contrário, evidenciando um efeito estimulante sobre o testículo, decorrente da ablação das glândulas salivares -, existem autores que relatam resultados intermediários, como, por exemplo, alterações leves e/ou transitórias da gônada masculina após sialoadenectomia.

RAMALHO (1979) não observou lesão testicular em ratos que tiveram removidas as glândulas submandibulares e sublinguais. Porém, em animais experimentais submetidos a uma dieta com menores teores de proteína, vitamina E, cobre, ferro e manganês, e contendo substâncias antimicrobianas, houve o desenvolvimento de alterações histológicas progressivas de testículo e epidídimo.

Após a retirada das glândulas submandibulares e sublinguais em ratos adultos, *THOMAS et al* (1967) relataram uma ligeira redução do número de elementos germinativos no testículo. O mesmo foi observado por *ABRAMS* (1964), no camundongo, acompanhado de aumento da degeneração dos elementos germinativos e um posterior aumento da celularidade, sugerindo a existência de um mecanismo compensatório, capaz de reverter as alterações iniciais.

PAULO (1980), realizando ablação das glândulas

submandibulares e sublinguais em ratos jovens, encontrou aumento do número de células germinativas em degeneração, quatro dias após o tratamento. No entanto, estas alterações foram transitórias, pois já não existiam seis semanas após a sialoadenectomia. Além disso, o mesmo autor não observou alteração da taxa de desenvolvimento das células germinativas, nos animais experimentais.

Como pode ser observado, há grande controvérsia quanto à influência das glândulas salivares sobre a reprodução masculina, não havendo unanimidade entre os autores quanto à proposta da existência de uma regulação, por parte das glândulas salivares, especialmente as submandibulares, sobre o testículo.

Com exceção de VIEILLEMARINGE (1968) e PAULO (1980), que reportam alguns dados quantitativos do epitélio seminífero, a avaliação histológica do testículo de animais sialoadenectomizados, de um modo geral, é de natureza qualitativa. Em face dos resultados controversos quanto aos efeitos da remoção das glândulas salivares sobre o testículo, considerou-se importante desenvolver um estudo quantitativo do epitélio germinativo em animais sialoadenectomizados, uma vez que este tipo de abordagem apresenta vantagens sobre a análise qualitativa, tais como, maior objetividade e condições para o estabelecimento de comparação mais precisa do processo espermatogênético de animais controle e experimentais.

Em função disso, considerou-se importante realizar o presente trabalho, com o objetivo de estudar quan-

titativamente a espermatogênese de ratos sialoadenectomizados, enfatizando o acompanhamento da evolução do epitélio germinativo desde a pré-puberdade até a idade adulta, e caracterizando a instalação de possíveis alterações.

MATERIAL E MÉTODOS

1. GRUPOS E TRATAMENTOS

Foram utilizados, no presente trabalho, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, originários do biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP.

Com a idade de 17 dias, todos os animais foram separados das mães e submetidos ao tratamento experimental, descrito abaixo, sempre no período entre 10:00 e 12:00 horas. A partir de então, foram mantidos em gaiolas, em grupos de 3 a 5 animais, recebendo água e ração balanceada sob forma de "pellets"* *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, de acordo com o tratamento experimental a ser efetuado:

a) Grupo "SIALO"

Os animais deste grupo foram sialoadenectomizados aos 17 dias de idade, por extirpação bilateral das glândulas salivares submandibulares e sublinguais maiores (CHEYNE, 1939).

Sob anestesia com éter etílico, os animais foram fixados em decúbito dorsal, em placa cirúrgica. Em seguida, realizou-se tricotomia e antissepsia local. A nível cervical, logo acima do manúbrio do ester

* Coelhil M - Socil Prô-Pecuária S/A.

no, foi feita uma pequena incisão mediana, sendo afastados a pele e o tecido subcutâneo. A cápsula glandular foi removida e procedeu-se à ligação do pedículo, constituído pelo feixe neurovascular e ductos excretórios; em seguida, as glândulas submandibulares e sublinguais maiores foram removidas, e a incisão foi suturada com fio de algodão.

b) Grupo "CONTROLE"

Os animais pertencentes a este grupo foram submetidos, aos 17 dias, a uma simulação da cirurgia realizada no grupo SIALO.

Neste caso, após a incisão e afastamento da pele e tecido subcutâneo, deixou-se decorrer um período igual ao necessário para a extirpação das glândulas, após o qual, foi realizada a sutura da incisão. O tecido glandular não foi tocado, para evitar que estímulos mecânicos pudessem interferir com sua atividade secretora.

Após o tratamento experimental, os animais de ambos os grupos foram submetidos às mesmas condições ambientais e ao mesmo tipo de alimentação.

Animais SIALO e CONTROLE foram sacrificados aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade, sendo estudados 5 animais de cada grupo, a cada idade.

2. COLETA, PESAGEM E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS

Na idade prevista para o sacrifício, entre 10:00 e 12:00 horas, os animais foram pesados, anestesiados com éter etílico e laparotomizados. Em seguida, tiveram seus testículos dissecados, sendo, então, sacrificados por excesso de inalação do anestésico. Escolheu-se este procedimento com a finalidade de minimizar a degeneração *post-mortem* dos tecidos testiculares.

Os testículos direito e esquerdo, foram pesados separadamente em balança de precisão*, e o testículo esquerdo foi imediatamente submetido à fixação histológica em ALFAC (etanol 80%, 85% aldeído fórmico 10% e ácido acético glacial 5%) por 24 a 30 horas.

Uma vez fixados, os testículos sofreram processamento histológico de rotina e inclusão em parafina. Os cortes, de 7 µm de espessura, foram corados pela reação do PAS (ácido periódico - reativo de Schiff) - hemalúmen.

3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TESTÍCULO

3.1. Considerações Gerais sobre a Espermatogênese

A espermatogênese compreende a sequência de eventos, através da qual, as espermatogônias evoluem até espermatozoides, que são as células germinativas maduras,

* Sartorius, mod. 2400

tendo lugar no interior dos túbulos seminíferos (BLOOM & FAWCETT, 1975).

No macho recém nascido, os túbulos seminíferos são maciços e contêm apenas células de sustentação e espermatogônias, localizadas junto à parede tubular. Com a maturação, os túbulos adquirem luz e desenvolvem tipos mais evoluídos de células germinais.

Existem vários tipos de espermatogônias, identificadas segundo sua forma, tamanho e disposição da cromatina (vide revisão de GUERRA, ALMADA & PETERS, 1981).

A espermatogônia do tipo A sofre uma série de mitoses, originando outras do mesmo tipo. Destas, algumas desempenharão a função de células-mãe para futuros ciclos de renovação, e outras, por mitose, gerarão espermatogônias cada vez mais diferenciadas: espermatogônias A mais evoluídas, espermatogônias intermediárias e espermatogônias do tipo B. Destas últimas, se originam os espermatócitos primários que, no rato, surgem aproximadamente aos 13 dias de idade (HUCKINS, 1965).

Estes, por sua vez, sofrem divisão meiótica e dão origem a espermatócitos secundários que, rapidamente, completam a segunda divisão de maturação, formando espermátides. Estas células surgem, no rato, em torno de 26 dias de idade (HUCKINS, 1965).

As espermátides são células haplóides que não sofrerão novas divisões, mas sim um conjunto de modificações estruturais e bioquímicas, (espermiogênese), originando células altamente especializadas, os espermatozoides.

Aos 50 dias de idade, são encontrados espermatozoides maduros no testículo do rato (HUCKINS, 1965), o que marca o fim do período pré-puberal. Aos 3 meses de vida, o rato é considerado sexualmente maduro, pois já atingiu valores estáveis de produção de espermatozoides.

No epitélio seminífero, as células germinativas localizam-se em diferentes níveis do epitélio, de acordo com sua fase de desenvolvimento: as células-tronco (espermatogônias) situam-se em contato com a membrana basal do túbulo, enquanto que as células mais diferenciadas encontram-se mais próximas da região luminal.

Em mamíferos, o desenvolvimento de cada geração de células germinativas - espermatogônia, espermatócito e espermátide - está integrado ao das outras gerações presentes na mesma área do epitélio seminífero, de modo que as células se dispõem em associações de composição fixa e bem definida.

Dado que ocorre o desenvolvimento paralelo das células germinativas associadas, os elementos de uma dada associação serão substituídos por outros, em sua evolução. Em consequência, as associações sucedem-se umas às outras, até que se repita a composição da associação celular observada de início, numa dada área do túbulo.

Esta sucessão ordenada de associações confere uma natureza cíclica ao processo espermatogenético, sendo as associações celulares interpretadas como estádios de um ciclo do epitélio seminífero. LEBLOND & CLERMONT (1952) definem o ciclo do epitélio seminífero como "a série de

modificações que ocorrem numa dada área do epitélio seminífero entre dois aparecimentos sucessivos da mesma associação celular".

No rato foram identificados 14 estádios do ciclo (referidos como I a XIV), cuja caracterização foi baseada na sequência de modificações morfológicas das espermatídes durante a espermiogênese (LEBLOND & CLERMONT, 1952).

Para maior compreensão, a Figura 1 contém uma representação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, no rato.

3.2. Análise Histométrica do Túbulo Seminífero

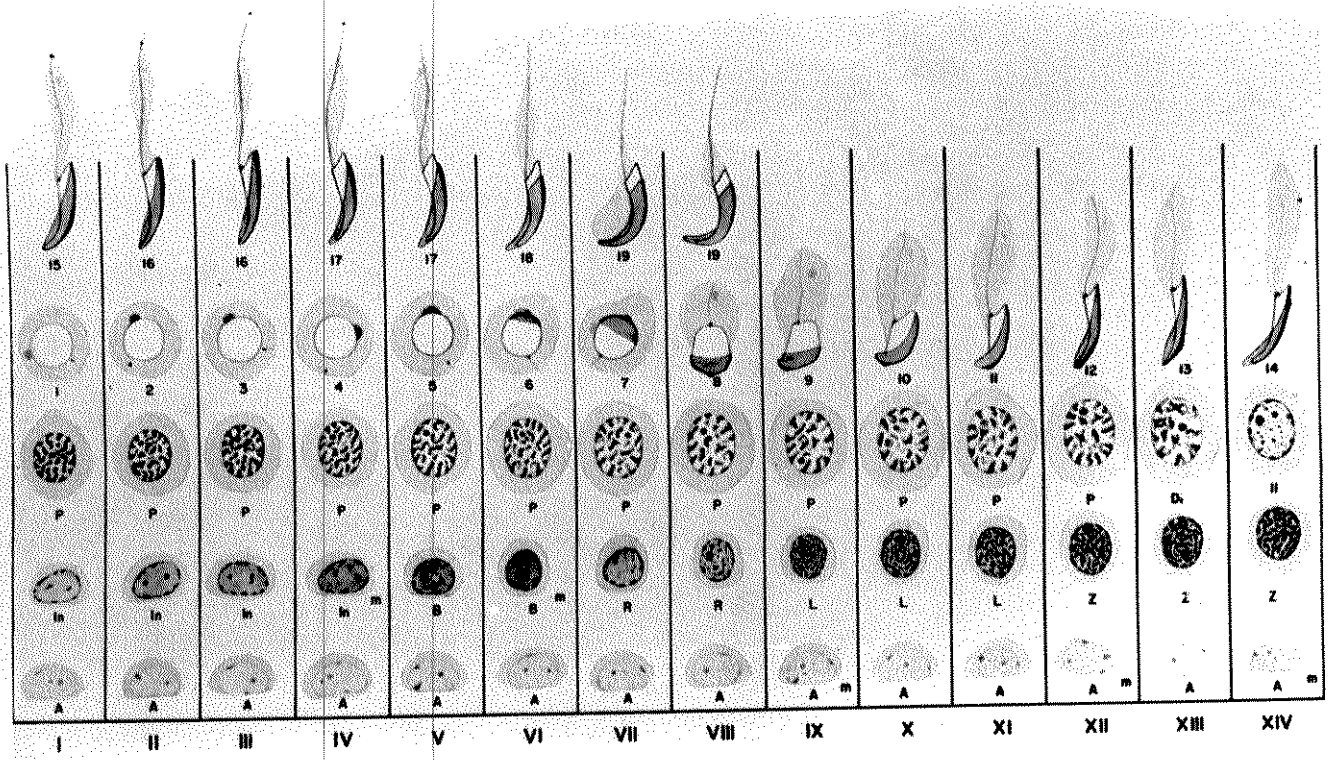
As áreas de secção transversal dos túbulos seminíferos foram calculadas a partir dos diâmetros ortogonais tubulares.

Secções histológicas de testículo foram projetadas, por meio de um microprojektor de lâminas*, a uma distância fixa, sobre uma folha de papel. Nesta, foram desenhados os contornos tubulares e luminais de túbulos seminíferos de secção rigorosamente transversal. A partir dos desenhos, foram medidos os diâmetros ortogonais (vertical e horizontal) tanto do túbulo, quanto da luz tubular (ver Figura 2)

* Bausch & Lomb, mod. 385B

FIGURA 1

Desenvolvimento das células germinativas no rato. Da esquerda para a direita, na primeira linha, estão as espermatogônias do tipo A (A). Mitoses são indicadas pela letra m (A^m). Após a última mitose de A (coluna XIV), formam-se espermatogônias do tipo intermediário (In), permanecendo algumas células do tipo A para renovação. As espermatogônias intermediárias se dividem (In^m), originando espermatogônias do tipo B (B), que se dividem (B^m), formando espermatócitos primários em repouso (R). Estes passam pelas fases da prófase meiótica: leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P) e diacinese (Di). Então, a primeira divisão de maturação produz espermatócitos secundários (II). Estes sofrem a segunda divisão de maturação e originam espermátides jovens (I). Os passos da espermiogênese estão numerados de 1 a 19. Após o passo 19, as espermátides são liberadas do epitélio seminífero para se tornarem espermatozóides. Neste diagrama, cada coluna (I a XIV) representa a composição de uma associação celular. As associações são identificadas pelos 14 primeiros passos da espermiogênese. Estas associações celulares sucedem-se umas às outras, numa dada área do epitélio seminífero, caracterizando os XIV estádios do ciclo do epitélio seminífero. (STEINBERGER, E. & STEINBERGER, A. Testis: Basic and clinical aspects. In: *Reproductive Physiology*. BALIN, H. & GLASSER, S. (ed). Amsterdam, Excerpta Médica, 1972. p. 149).



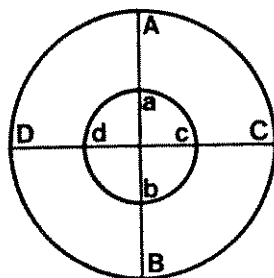


FIGURA 2 - Esquema representativo dos diâmetros medidos em secções transversais de túbulos seminíferos, onde \overline{AB} e \overline{CD} correspondem aos diâmetros ortogonais tubulares e \overline{ab} e \overline{cd} correspondem aos diâmetros ortogonais luminais.

Os diâmetros, medidos em milímetros, foram convertidos para micrômetros, levando-se em consideração o aumento obtido na projeção dos cortes (140 vezes).

A seguir, as áreas tubular total (\underline{At}) e luminal (\underline{Al}) foram calculadas segundo a fórmula:

$$A = \frac{\pi}{4} \cdot D_1 \cdot D_2$$

, onde \underline{A} representa a área transversa tubular (\underline{At}), ou luminal (\underline{Al}), e D_1 e D_2 representam os diâmetros ortogonais do túbulo seminífero, ou da luz tubular.

Partindo-se dos valores \underline{At} e \underline{Al} calculou-se a área transversa do túbulo seminífero efetivamente ocupada por epitélio germinal (\underline{Ae}):

$$Ae = At - Al$$

Os valores de At, Al e Ae foram determinados em 100 túbulos para cada animal CONTROLE e SIALO, a cada uma das seis idades estudadas.

3.3. Análise Quantitativa da Espermatogênese

a) Contagem das Células Germinativas

Com o propósito de avaliar a evolução da espermatogênese em animais pré-púberes, foi realizada a contagem das células germinativas mais avançadas presentes no epitélio seminífero de ratos dos grupos CONTROLE e SIALO de 21, 30 e 42 dias de idade.

Nestas idades, a espermatogênese ainda não está completa, e o epitélio seminífero não apresenta todos os tipos celulares encontrados no animal adulto.

Aos 21 dias, o epitélio seminífero compõe-se de espermatogônias (que, para efeito de simplificação, serão aqui referidas como "gônias") e espermatócitos primários (que serão chamados "citos I"), dos quais, os mais evoluídos encontram-se nas fases de paquíteno avançado e diplóteno da prófase meiótica.

Em ratos de 30 dias, já podem ser observadas figuras de divisão meiótica, espermatócitos secundários (aqui referidos como "citos II") e espermátides ("tides") jovens de núcleo arredondado.

Já aos 42 dias, o epitélio seminífero apresenta, além dos tipos celulares presentes aos 30 dias, tides

alongadas que se encontram em etapas mais avançadas de diferenciação, embora ainda não sejam observados espermatozoides maduros na luz tubular.

Deste modo, foi determinado o número de células germinativas mais avançadas, por secção transversal de túbulo seminífero, em cada idade, de acordo com o seguinte esquema:

- . citos I em paquíteno avançado e diplóteno em testículos de ratos de 21 dias de idade;
- . tides redondas em testículos de ratos de 30 dias de idade;
- . tides alongadas presentes nos estágios X a XIV e nos estágios I a VII do ciclo do epitélio seminífero em testículos de ratos de 42 dias de idade.

Contou-se, para cada animal, as células existentes em todos os túbulos seminíferos de secção transversal presentes em três secções histológicas de testículo.

b) Determinação das Frequências Relativas dos Estádios do Ciclo do Epitélio Seminífero

LEBLOND & CLERMONT (1952), estudando o processo de diferenciação das tides, à reação do PAS, descreveram 19 estágios para a espermiogênese do rato, baseados na sequência de alterações morfológicas do sistema acrosômico das tides em desenvolvimento. Os autores observaram que, quando uma geração de tides, formada no estágio 1, atinge o estágio 14, surge uma nova geração de tides a

baixo da primeira, de modo que se repete a mesma associação celular presente quando a primeira geração estava no estágio 1. Assim, segundo a definição dos autores, completa-se um ciclo do epitélio seminífero.

Deste modo, os autores caracterizaram XIV estádios do ciclo, identificáveis pelos 14 primeiros estágios da espermiogênese.

Com base na classificação de LEBLOND & CLERMONT (1952) para os XIV estádios do ciclo, LISON (1955) estabeleceu uma tabela dicotômica para a identificação desses estágios, tendo como referência a morfologia geral do epitélio seminífero e sua topografia no túbulo.

No epitélio seminífero do rato adulto, podem ser identificadas 4 gerações sucessivas de células:

- . Geração A - formada por gônias;
- . Geração B - formada por citos I;
- . Geração C - formada por citos I em paquíteno ou zigóteno, ou citos II, ou tides jovens, de núcleos arredondados;
- . Geração D - formada por tides mais evoluídas, de núcleos alongados.

A partir da natureza das células e da disposição espacial relativa dessas gerações, foi composta a tabela de LISON (1955), apresentada a seguir:

1. Geração C: citos I em paquíteno avançado ou zigóteno

1.1. Ger. D: tides arredondadas, tendo em superposição espermatozóides em

vias de expulsão para a luzest. VIII

- 1.2. Ger. D: tides de contorno irregular ,
mais ou menos quadrangulares;
interior do núcleo extremamente
te claroest. IX
- 1.3. Ger. D: tides ovóides, em forma de
grão de trigo.....est. X
- 1.4. Ger. D: tides alongadas, com uma ex-
tremidade em ponta e ligeira-
mente encurvadasest. XI
- 1.5. Ger. D: tides muito alongadas; a ex-
tremidade dirigida para a pa-
rede tubular é muito afilada;
de trajeto ondulado e sem
curvatura sistemáticaest. XII
- 1.6. Ger. D: tides um pouco mais longas ,
semelhantes a espermatozóides
e mais coráveis que no está-
gio precedenteest. XIII
2. Geração C: figuras da primeira divisão de
maturação, citos II ou figuras
da segunda divisão de maturação ..est. XIV
3. Geração C: tides arredondadas
- 3.1. Gônias raras, exclusivamente do tipo
poeirenta (tipo A)
- 3.1.1. espermatozóides jovens agrupa-
dos em feixes frouxos, situa-
dos em maioria, no terço supe-
rior do epitélioest. I

- 3.1.2. espermatozóides jovens agrupados em feixes apertados, situados, em maioria, no terço inferior do epitélio.....est. II-III
- 3.2. Gônias do tipo crostosa (tipo B) abundantes, com raras e eventuais gônias poeirentas (tipo A)
- 3.2.1. espermatozóides jovens agrupados em feixes apertados no terço inferior do epitélioest. IV-V
- 3.2.2. espermatozóides jovens no terço médio do epitélio, em feixes frouxos ou não agrupados...est. VI
- 3.2.3. espermatozóides jovens no terço superior do epitélio, formando uma camada contínuaest. VII

Utilizando a tabela acima, as frequências relativas dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foram determinadas, em ratos púberes e adultos (60, 85 e 120 dias de idade), pela identificação dos estádios presentes em 500 secções tubulares transversais por animal, em ambos os grupos.

Para efeito de simplificação da análise dos resultados, os XIV estádios foram reunidos em 5 grupos, cujos percentuais representam a soma dos percentuais dos estádios que os compõem. Esta divisão foi arbitrária, levando-se em consideração alguns eventos julgados relevantes neste estudo, que ocorrem nos agrupamentos de estádios a

seguir:

- . Estádios I a III: onde ocorre a primeira fase de maturação das tides recém-formadas;
- . Estádios IV a VI: onde ocorre a segunda fase de maturação das tides mais jovens;
- . Estádios VII e VIII: onde ocorrem as últimas etapas de maturação da geração de tides mais evoluídas e liberação dos espermatozóides na luz tubular;
- . Estádios IX a XIII: onde ocorre o processo de alongamento do núcleo das tides remanescentes;
- . Estádio XIV : onde ocorrem as divisões meióticas de maturação.

4. PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

4.1. Pesos Corporal e Testicular

Os dados referentes ao peso corporal dos animais foram avaliados estatisticamente pela análise de variância, sendo empregado o teste de Tukey nos casos de F significativo.

Utilizou-se o mesmo procedimento para a análise dos pesos testiculares, considerando-se, para cada animal, a média dos pesos de seus testículos direito e esquerdo.

Também foi investigada a relação entre os crescimentos corporal e testicular, desde a pré-puberdade

até a idade adulta. Para tanto, estudou-se a relação alométrica de crescimento ponderal testicular nas diversas idades, procurando-se estabelecer comparação entre os padrões de crescimento dos grupos CONTROLE e SIALO.

Segundo o trabalho de HUXLEY (1924)

(1) $y = bx^k$, onde y representa as dimensões ou peso de um órgão, e x , os de outro órgão ou do organismo como um todo.

Aplicando-se logaritmo, tem-se

$$\log y = \log b + k \cdot \log x$$

Fazendo $Y = \log y$ $X = \log x$ $a = \log b$

tem-se $Y = a + k X$, forma linear da equação (1), que expressa a relação entre dois sistemas de crescimento multiplicativo.

Na equação alométrica, o termo k - coeficiente de alometria - é o que apresenta maior significado biológico, pois é o que determina a relação de crescimento entre os dois sistemas. Se $k = 1$, existe crescimento isométrico entre o órgão e o corpo. Se $k < 1$, o órgão cresce relativamente menos que o corpo. Se $k > 1$, o órgão tem um crescimento maior, com relação ao corpo (AZOUBEL, 1975).

Neste trabalho, o coeficiente de alometria (k) foi calculado segundo a técnica de análise de regressão a duas variáveis sujeitas a erro, empregado em alometria por CRUZ (1962).

Os valores amostrais de menor variação (X , no caso, logaritmo do peso corporal) foram agrupados em classes, com intervalo de 0,01, e ordenados de modo crescente. Em seguida, juntamente com os valores de Y (no caso, logaritmo do peso testicular), foram divididos em três grupos de igual tamanho.

O coeficiente de alometria (k) foi estimado pela fórmula:

$$(2) \quad k = \frac{\bar{Y}_3 - \bar{Y}_1}{\bar{X}_3 - \bar{X}_1} \quad \text{onde } \bar{X}_i \text{ e } \bar{Y}_i \text{ representam as médias do } i^{\text{mo}} \text{ grupo.}$$

A comparação dos valores de k dos grupos SIA-LO e CCNTROLE foi realizada verificando a eventual superposição entre os limites do intervalo de confiança para k , que são as duas soluções para K na seguinte equação:

$$(3) \quad (\bar{X}_3 - \bar{X}_1)^2 \cdot (k - K)^2 \cdot \frac{Ne}{2} = t^2 (s^2_y - 2k s^2_{xy} + k^2 s^2_x)$$

onde

$$s^2_x = [\Sigma_1 (X - \bar{X}_1)^2 + \Sigma_2 (X - \bar{X}_2)^2 + \Sigma_3 (X - \bar{X}_3)^2] / N - 2$$

$$s^2_{xy} = [\Sigma_1 (Y - \bar{Y}_1)^2 + \Sigma_2 (Y - \bar{Y}_2)^2 + \Sigma_3 (Y - \bar{Y}_3)^2] / N - 2$$

$$[\Sigma_1 (X - \bar{X}_1)(Y - \bar{Y}_1) + \Sigma_2 (X - \bar{X}_2)(Y - \bar{Y}_2) + \Sigma_3 (X - \bar{X}_3)(Y - \bar{Y}_3)] / N - 2$$

Ne = número de casos dos grupos extremos (ou seja, grupos 3 e 1)

t = valor da variável de Student, com N - 2 graus de liberdade e o grau de significância desejado

N = número de casos do conjunto dos três grupos.

Para verificar a existência de uma relação linear entre os logaritmos dos pesos corporal e testicular, realizou-se um teste de linearidade, baseado na variável:

$$(4) \quad t = \frac{(\bar{Y}_1 + \bar{Y}_3 - 2\bar{Y}_2) - k(\bar{X}_1 + \bar{X}_3 - 2\bar{X}_2)}{\sqrt{[s^2_y - 2k s^2_{xy} - k^2(s^2_x)] \cdot \frac{2N}{Ne(N-2Ne)}}}$$

que tem, aproximadamente, a distribuição de Student, com $N - 3$ graus de liberdade.

Na representação gráfica, a inclinação da reta é dada pelas médias dos grupos extremos, e passa pela média geral.

4.2. Histometria do Túbulo Seminífero

Foram consideradas, para cada animal, as médias das áreas tubular total (\underline{At}), luminal (\underline{Al}) e epitelial (\underline{Ae}) estimadas nos 100 túbulos seminíferos medidos. A seguir, os dados relativos a essas áreas foram avaliados pela análise de variância. Em casos de F significativo, testou-se os contrastes entre médias pelo teste de Tukey.

4.3. Contagem de Células Germinativas

Em função da grande variabilidade do número de células presentes em túbulos seminíferos de um mesmo testículo, utilizou-se, para comparação, os valores das medianas, por serem menos influenciados do que os das médias, pelos valores extremos da amostra.

As medianas de diferentes tipos celulares de

animais dos grupos CONTROLE e SIALO foram comparadas por meio do teste de U de Mann-Whitney (HOLLANDER & WOLFE, 1973), que se aplica com eficiência a populações não normais.

Também foram comparadas, entre SIALO e CONTROLE, as amostras das populações de túbulos seminíferos, com relação ao número de células germinativas neles contidas. Para isso, os valores das amostras foram agrupados em classes, onde a amplitude do intervalo de classe dependeu do tipo de célula analisado, sendo de 4 para citos I em animais de 21 dias, de 7 para tides redondas em animais de 30 dias, de 12 para tides alongadas presentes nos estádios X-XIV e de 6 para tides alongadas presentes nos estádios I-VII do ciclo do epitélio seminífero em animais de 42 dias.

A seguir, através das frequências cumulativas para cada tipo celular, as amostras obtidas das populações de túbulos seminíferos de animais CONTROLE e SIALO foram comparadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (HOLLANDER, *et al.*, 1973).

4.4. Frequências Relativas dos Estádios do Ciclo do Epitélio Seminífero

Com base nos resultados obtidos da verificação de 500 túbulos, foram determinados os percentuais dos 5 grupos de estádios (I a III; IV a VI; VII e VIII; IX a XIII; e XIV) do ciclo do epitélio seminífero, para cada

animal. Os valores percentuais foram normalizados pela fórmula $\text{arc sen } \sqrt{\hat{p}}$, sendo, então, avaliados estatisticamente pela análise de variância.

RESULTADOS

1. PESO CORPORAL

Na Tabela I, encontram-se os pesos corporais nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade. Na Figura 3, estão representadas as médias dos pesos corporais dos grupos, nas idades estudadas.

No Quadro 1, encontram-se os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para os pesos corporais nos grupos CONTROLE e SIALO, que indicam:

- a) que os grupos CONTROLE e SIALO foram diferentes ($p < 0,001$);
- b) regressão linear significativa ($p < 0,001$), embora as curvas de crescimento de ambos os grupos não tenham sido paralelas ($p < 0,001$). O maior valor de F registrado foi para este tipo de regressão;
- c) regressões de 3º e 5º graus significativas ($p < 0,001$) havendo, neste caso, paralelismo entre as curvas de crescimento dos grupos;
- d) que, quando realizada a comparação dos contrastes, em cada idade, pelo teste de Tukey, o grupo SIALO apresentou menor peso, diferindo significativamente do CONTROLE aos 85 e 120 dias de idade ($p < 0,01$).

2. PESO TESTICULAR

Na Tabela I, encontram-se os pesos testicula

TABELA I - Pesos corporais e testiculares de animais dos grupos CONTROLE (C) e SIALO (S) aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

IDADE	PESO CORPORAL (g)		PESO TESTICULAR (g) *	
	C	S	C	S
21 dias	33	26	0,0802	0,0679
	30	23	0,0871	0,0566
	33	24	0,0795	0,0579
	32	21	0,0774	0,0503
	35	22	0,0910	0,0499
30 dias	65	63	0,2718	0,2493
	59	58	0,1979	0,1951
	58	51	0,1674	0,1499
	72	51	0,3325	0,2237
	61	51	0,2178	0,2282
42 dias	84	95	0,4868	0,5376
	111	98	0,6629	0,5095
	85	113	0,3816	0,6925
	87	90	0,4357	0,5925
	104	93	0,6516	0,5162
60 dias	208	159	1,3379	1,0074
	156	189	1,0795	1,2054
	184	183	1,1925	1,1386
	177	161	1,3181	1,1091
	155	151	0,9134	1,1257
85 dias	236	200	1,3905	1,5130
	227	187	1,2765	1,1864
	245	200	1,4540	1,5884
	234	174	1,2316	1,3027
	198	193	1,2036	1,2780
120 dias	271	237	1,4430	1,4278
	278	244	1,6211	1,5049
	276	239	1,4801	1,4536
	291	201	1,3969	1,4738
	266	222	1,2810	1,3241

* média dos pesos dos testículos direito e esquerdo.

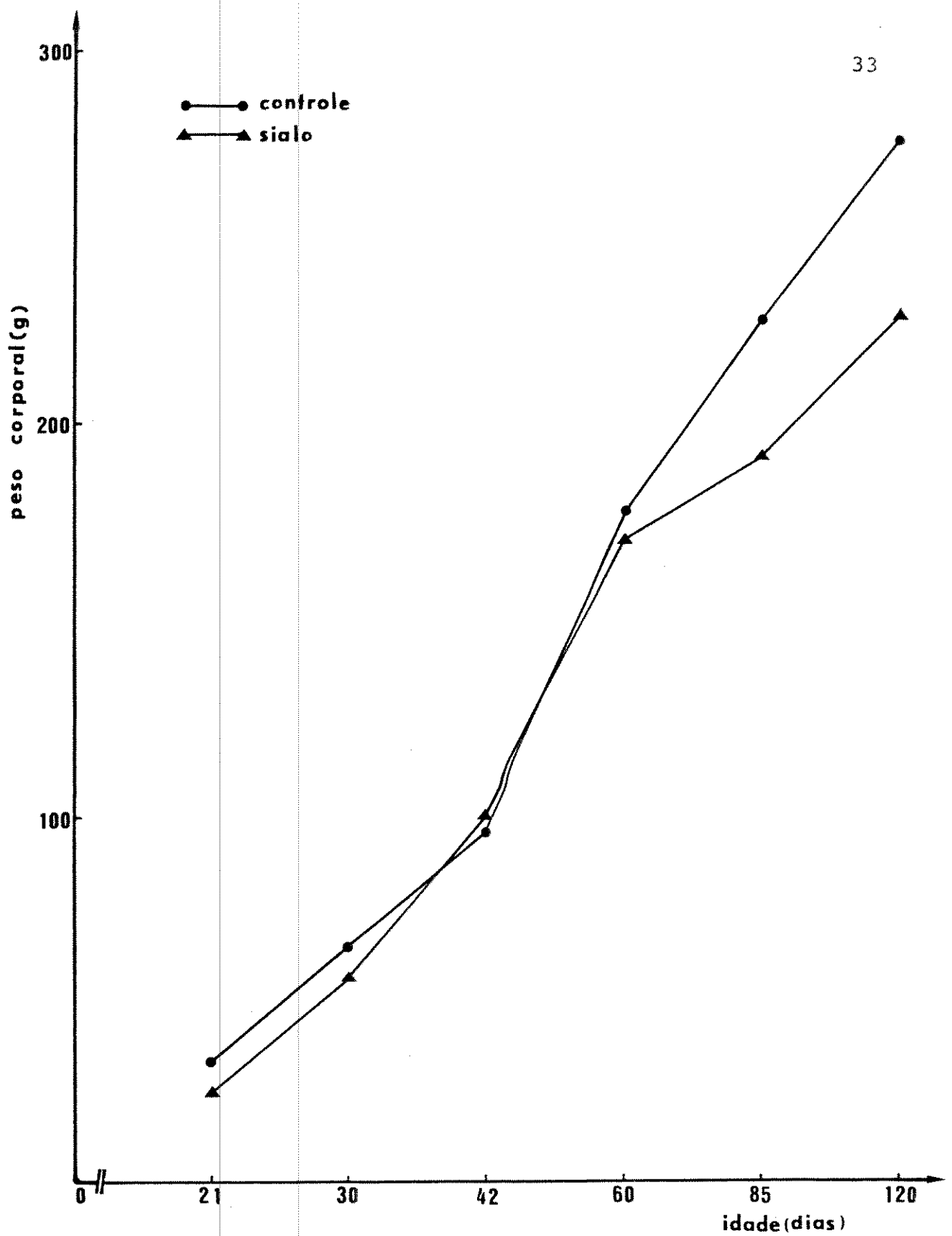


FIGURA 3 - Médias dos pesos corporais dos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

QUADRO 1

a) Análise de variação dos pesos corporais dos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
Tratamentos	1	29,9148 ***
Regressão linear	1	2468,9096 ***
Paralelismo	1	19,0481 ***
Regressão 2º grau	1	2,7634 NS
Paralelismo	1	9,5892 **
Regressão 3º grau	1	19,5732 ***
Paralelismo	1	0,2664 NS
Regressão 4º grau	1	0,3316 NS
Paralelismo	1	2,8866 NS
Regressão 5º grau	1	13,9097 ***
Paralelismo	1	0,0007 NS
Dias	11	
Resíduo	48	
TOTAL	59	

b) Teste de Tukey para comparação dos contrastes (CONTROLE x SIALO).

21d	30d	42d	60d	85d	120d
NS	NS	NS	NS	**	**

NS. não significativo

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

res (peso médio dos testículos direito e esquerdo) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade. Na Figura 4, estão representadas as médias dos pesos testiculares nos grupos, a cada idade.

No Quadro 2, encontra-se o resultado da análise de variância para os pesos testiculares dos grupos CONTROLE e SIALO, que indica:

- a) que os grupos CONTROLE e SIALO não apresentaram diferenças significativas entre si;
- b) regressão linear significativa ($p < 0,001$), com paralelismo entre as curvas de crescimento. O maior valor de F registrado foi para este tipo de regressão;
- c) regressão de 2º ($p < 0,05$), 3º ($p < 0,001$) e 5º ($p < 0,01$) graus significativas, havendo paralelismo entre as curvas de crescimento de ambos os grupos.

3. CRESCIMENTO ALOMÉTRICO DO TESTÍCULO

No Quadro 3, encontram-se os valores de k (coeficiente de alometria), os limites do intervalo de confiança para k e os valores de t para o teste de linearidade, referentes aos grupos CONTROLE e SIALO.

As retas de regressão calculadas para os grupos CONTROLE e SIALO estão apresentadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

De início, foram tomados os dados de cada grupo, no conjunto de todas as idades, e calculada a relação alométrica de crescimento. Porém, os valores de t (6,7354

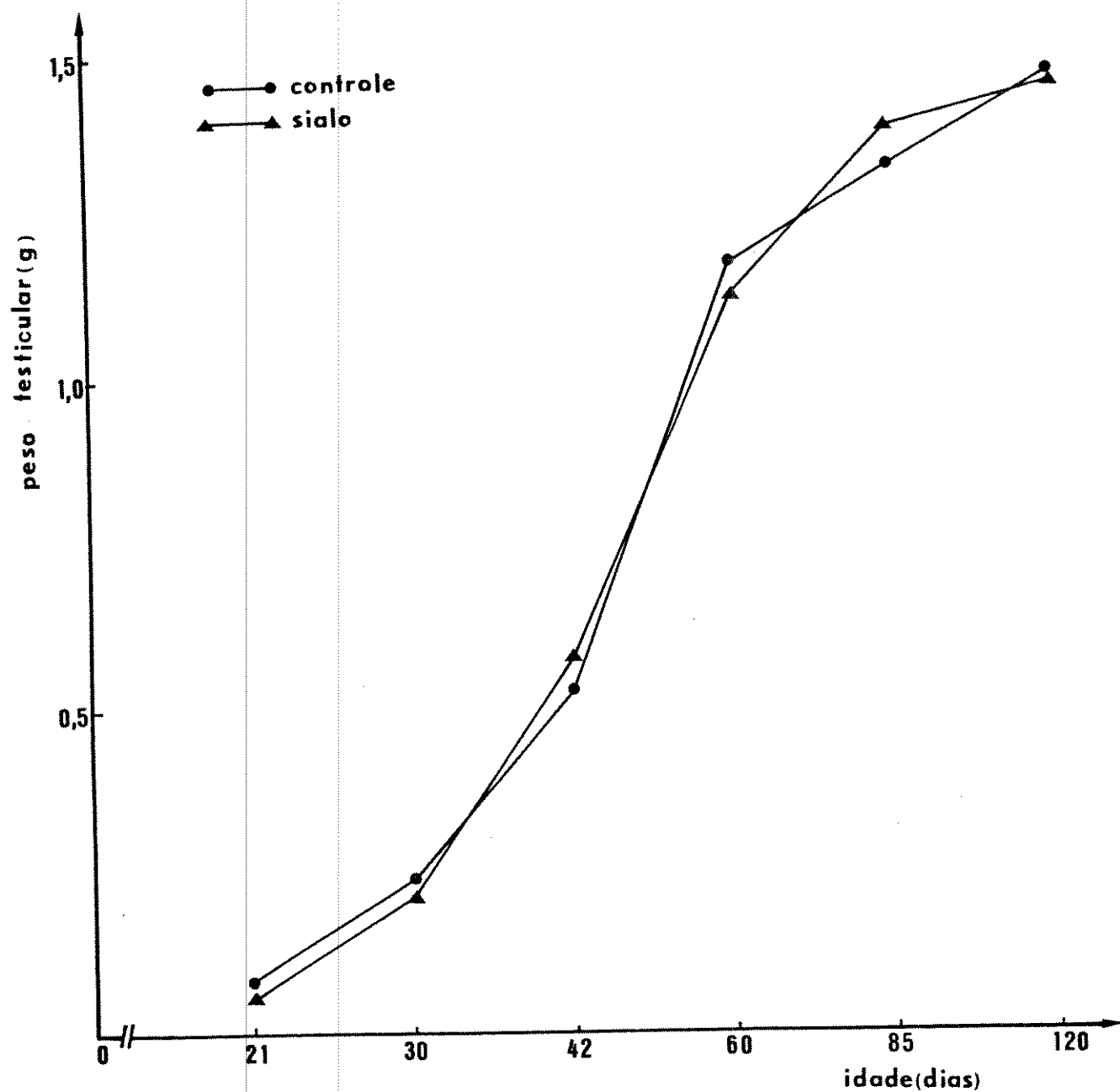


FIGURA 4 - Médias dos pesos testiculares dos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

QUADRO 2

Análise de variância dos pesos testiculares dos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
Tratamentos	1	$0,9961 \cdot 10^{-3}$	NS
Regressão linear	1	1609,1128	***
Paralelismo	1	0,2507	NS
Regressão 2º grau	1	6,8341	*
Paralelismo	1	$0,9749 \cdot 10^{-1}$	NS
Regressão 3º grau	1	60,6172	***
Paralelismo	1	$0,3106 \cdot 10^{-1}$	NS
Regressão 4º grau	1	1,2671	NS
Paralelismo	1	0,1859	NS
Regressão 5º grau	1	11,5333	**
Paralelismo	1	1,8872	NS
Dias	11		
Resíduo	48		
TOTAL	59		

NS - não significativo

*- $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

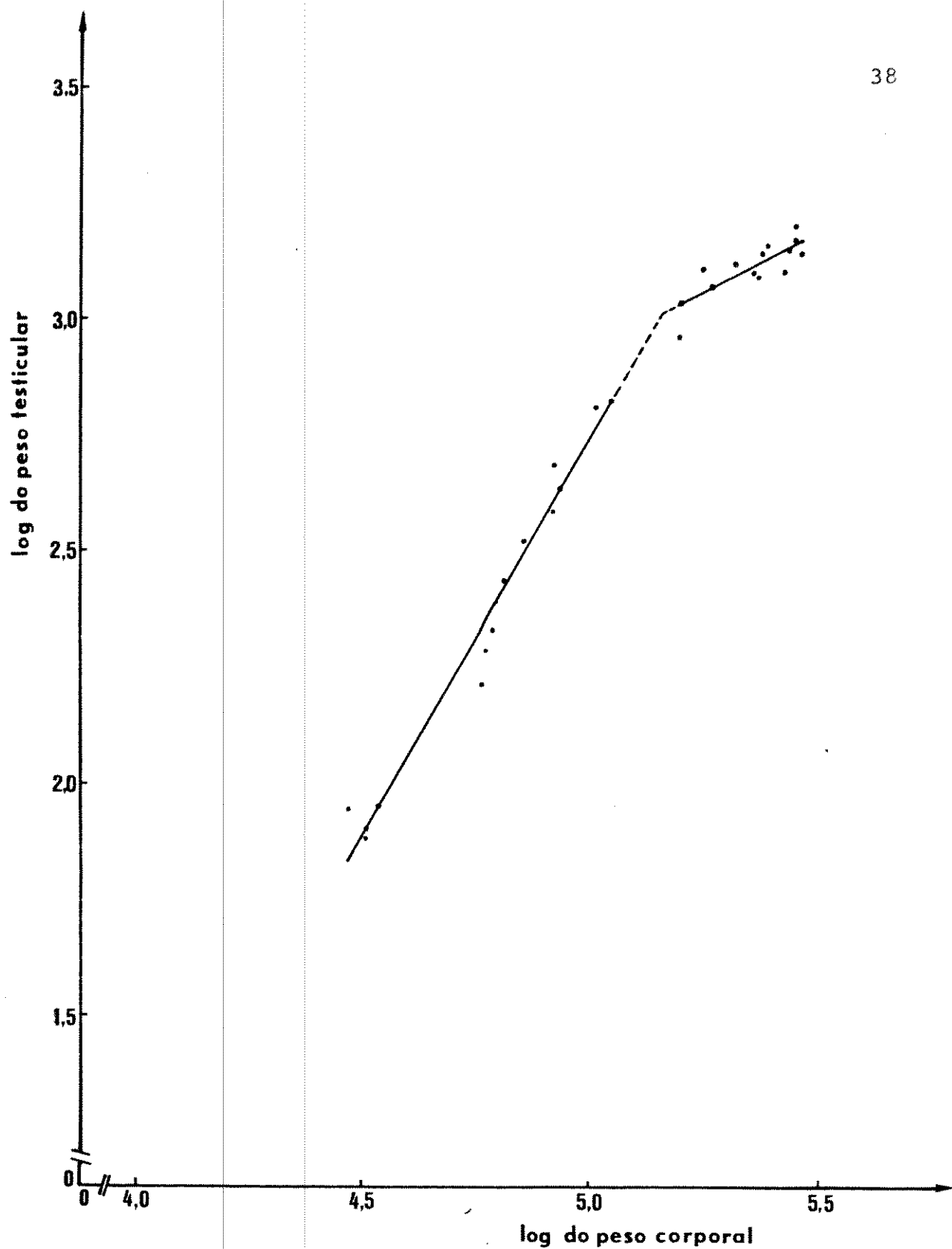


FIGURA 5 - Crescimento alométrico do testículo. Retas de regressão correspondentes às duas fases observadas de crescimento testicular no grupo CONTROLÉ, entre 21 e 120 dias de idade. Os pontos representam os dados experimentais.

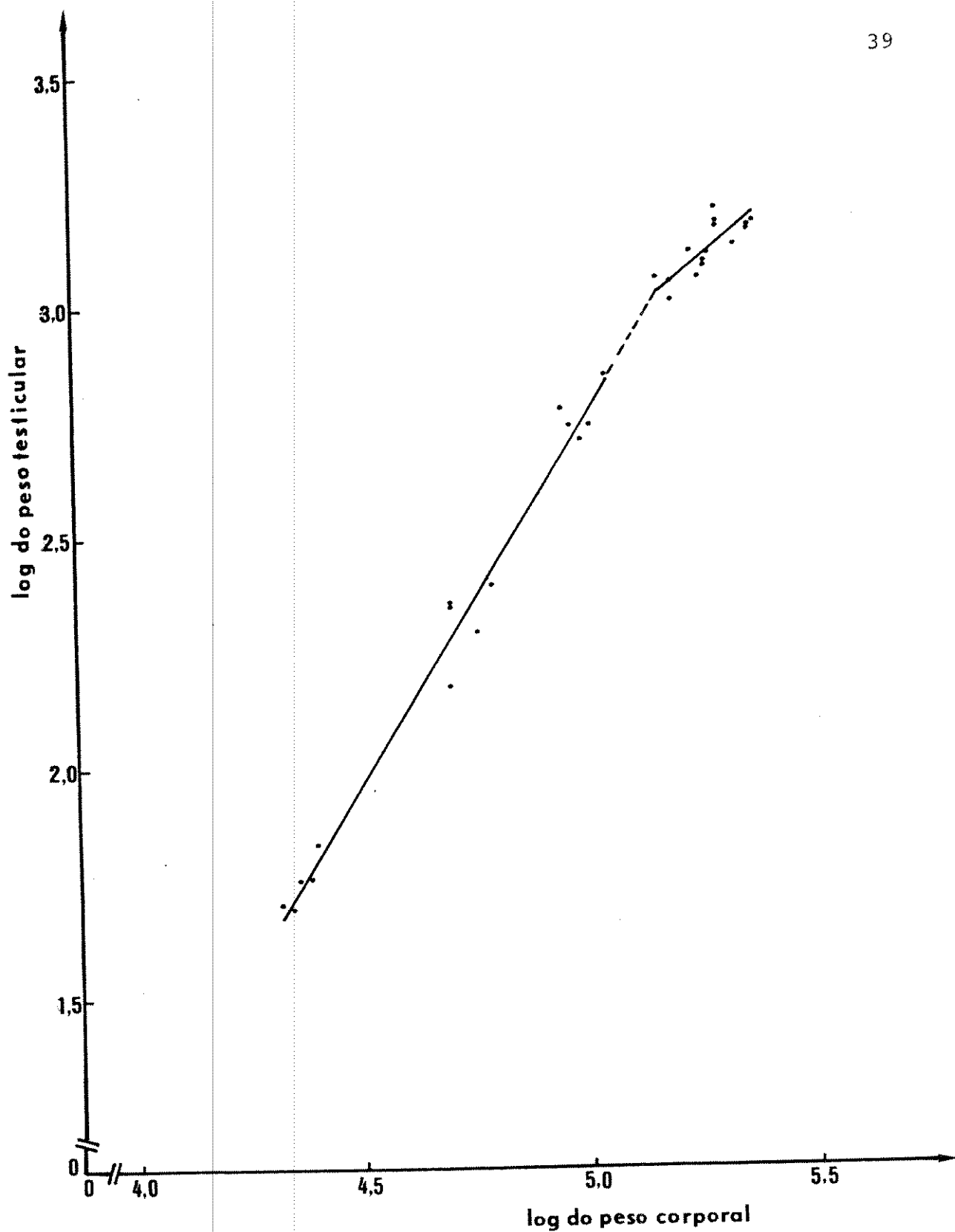


FIGURA 6 - Crescimento alométrico do testículo. Retas de regressão correspondentes às duas fases observadas de crescimento testicular no grupo SIALO, entre 21 e 120 dias de idade. Os pontos representam os dados experimentais.

QUADRO 3

Crescimento alométrico do testículo. Valores de k (coeficiente de alometria), limites do intervalo de confiança para k e teste de linearidade para os grupos CONTROLE e SIALO, e seus sub-grupos.

Amostra	K	Limites do intervalo de confiança p/K (p < 0,05)	Teste de linearidade (t)
Controle (total)	1,3418	1,2748 - 1,4068	6,7354 ***
Controle (21-42 dias)	1,7249	1,5796 - 1,8643	2,0343 NS
Controle (60-120 dias)	0,5000	0,2498 - 0,7235	0,6333 NS
Sialo (total)	1,4391	1,3763 - 1,5029	3,5280 **
Sialo (21-42 dias)	1,5949	1,4774 - 1,7201	0,8141 NS
Sialo (60-120 dias)	0,7971	0,4403 - 1,2282	0,4897 NS

NS - não significativo

** - p < 0,01

***- p < 0,001

para o grupo CONTROLE e 3,5280 para o SIALO) rejeitaram a hipótese da existência de uma relação simples de alometria entre os pesos testicular e corporal, segundo a qual, não haveria variação de k durante o período de vida estudado.

Em vista deste resultado, cada grupo foi dividido em dois subgrupos: um, que compreendia animais pré-púberes (de 21, 30 e 42 dias), e outro, composto por animais púberes e adultos (de 60, 85 e 120 dias). Calculou-se, então, o coeficiente de alometria, os limites do intervalo de confiança para k e o valor de t para o teste de linearidade, em cada subgrupo.

Pela análise dos resultados, pode-se observar que as taxas de crescimento do testículo podem ser consideradas diferentes nas duas etapas de desenvolvimento estudadas, tanto no grupo CONTROLE quanto no SIALO. Entre 21 e 42 dias de idade, o valor de k foi de 1,7249 para o grupo CONTROLE e de 1,5949 para o SIALO. Após os animais atingirem um peso corporal estimado em aproximadamente 145 g, os valores de k diminuíram para 0,5000 no grupo CONTROLE e para 0,7971 no grupo SIALO.

Quando verificada a superposição dos intervalos de confiança para k , observou-se que ela ocorreu entre os grupos CONTROLE e SIALO, em ambas as etapas de desenvolvimento, indicando, portanto, que não houve diferença entre os grupos.

4. HISTOMETRIA DO TÚBULO SEMINÍFERO

4.1. Área Tubular Transversal (At)

Na Tabela II, podem ser observadas as médias, para cada animal, de At aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade. Na Figura 7, estão representadas as médias de cada grupo, em cada idade estudada.

No Quadro 4, encontram-se os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para At, nos grupos CONTROLE e SIALO, que indicam:

- a) diferença significativa entre idades ($p < 0,001$), especialmente no período compreendido entre 30 e 60 dias;
- b) valor significativo de F na interação tratamentos x idades ($p < 0,01$);
- c) que, no conjunto, não houve diferença significativa entre tratamentos. No entanto, comparando-se os contrastes, observou-se diferença significativa às idades de 85 dias ($p < 0,01$) - maiores valores de At no grupo CONTROLE - e de 120 dias ($p < 0,05$) - maiores valores de At no grupo SIALO.

4.2. Área Luminal Tubular (Al)

Na Tabela II, encontram-se as médias, para cada animal, de Al aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade. Na Figura 8, estão representadas as médias de cada grupo, em cada idade estudada.

No Quadro 5, encontram-se os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para Al, nos gru-

TABELA II - Valores médios* da área total (At), área lumin-
nal (Al) e área ocupada por epitélio (Ae) em
secção transversal de túbulo seminífero nos
grupos CONTROLE (C) e SIALO (S) aos 21, 30, 42,
60, 85 e 120 dias de idade.

IDADE	At (μm^2)		Al (μm^2)		Ae (μm^2)	
	C	S	C	S	C	S
21 dias	7082	5435	608	430	6485	5005
	8385	5259	754	507	7630	4752
	7816	6369	656	489	7160	5900
	7842	5313	765	345	7077	4968
	7381	5517	722	513	6659	5005
30 dias	17025	17142	1593	1570	15432	15572
	15094	15619	1568	1100	13526	14519
	11854	11997	934	1214	10919	10783
	19403	16094	1877	1448	17526	14646
	15193	15958	1645	1536	13548	14419
42 dias	32575	26998	3289	3128	29286	23870
	38655	27384	5459	2199	33196	25185
	26474	31319	2597	2293	23877	29026
	30797	26947	2622	2464	28175	34483
	33655	29632	4125	3825	29530	25807
60 dias	51289	42628	6520	5779	44769	36848
	51181	53638	7328	7017	43853	46621
	48753	41748	5643	5592	43110	36156
	54524	46961	6517	6492	48007	40470
	44836	46143	4501	6357	40335	39786
85 dias	54899	50091	7799	5781	47101	44310
	58028	45424	9907	5794	48121	39630
	60076	54009	10160	6865	49915	47143
	60077	46354	7186	6540	52892	39814
	49797	46613	6066	5935	43730	40679
120 dias	60616	59954	8218	12184	52398	47769
	49696	63241	6497	9270	43139	53972
	56648	58624	8798	9878	47850	48746
	54016	63660	7753	12171	46263	51488
	63527	62446	9129	12855	54399	49590

* Médias dos valores estimados em 100 túbulos.

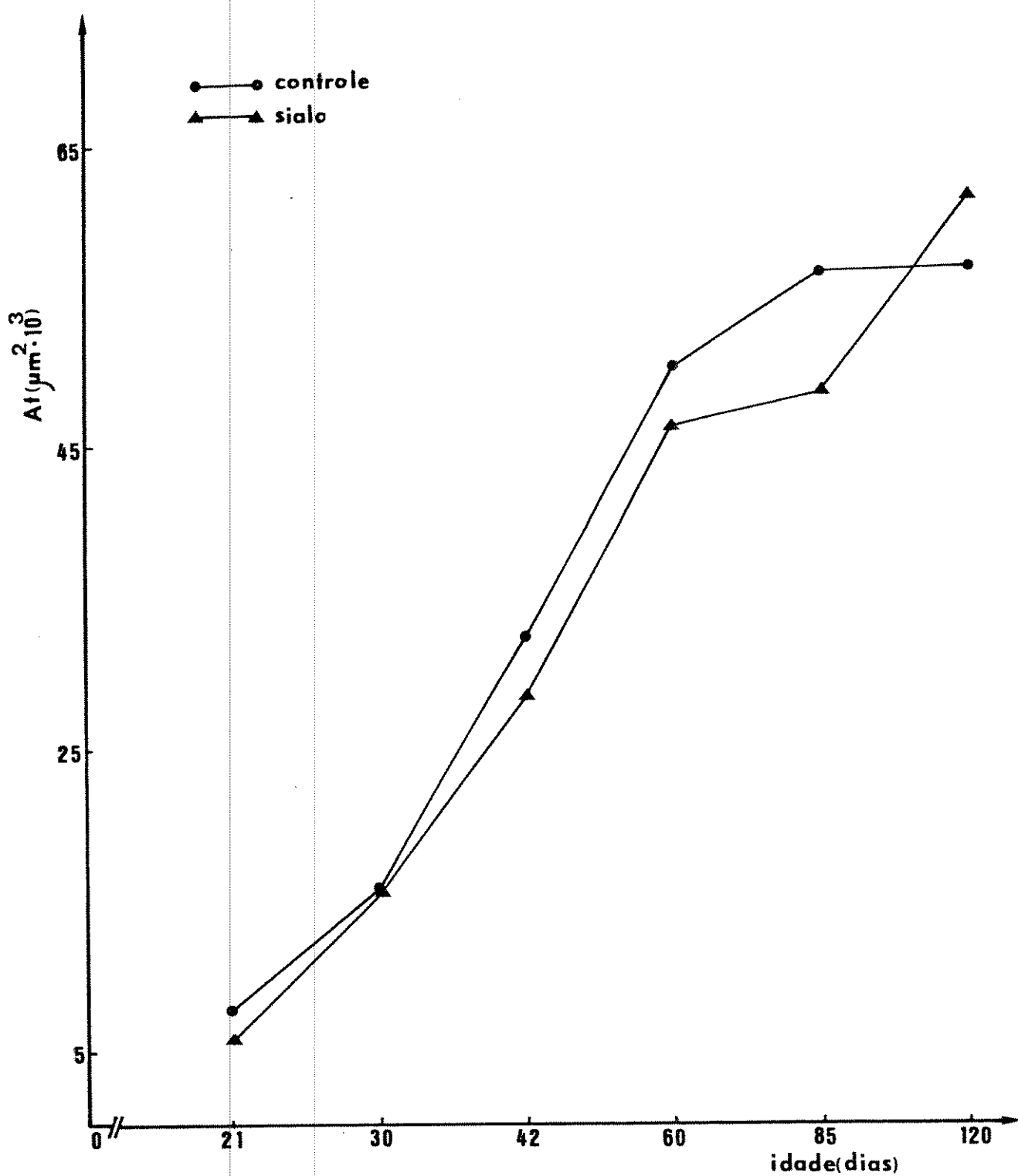


FIGURA 7 - Médias da área tubular transversal (A_t) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

QUADRO 4

a) Análise de variância da área tubular transversal (A_t) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
Tratamentos	1	1,7216 NS
Idades	5	99,4899 ***
Tratamentos x idades	5	4,0218 **
Tratamentos, idades	11	
Resíduo	48	
TOTAL	59	

b) Teste de Tukey para comparação dos contrastes (CONTROLE x SIALO)

21d	30d	42d	60d	85d	120d
NS	NS	NS	NS	**	*

c) Teste de Tukey para comparação do conjunto , entre idades.

	30d	42d	60d	85d	120d
21d	NS	**	**	**	**
30d		*	**	**	**
42d			*	**	**
60d				NS	NS
85d					NS

NS - não significativo

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

*** - $p < 0,001$

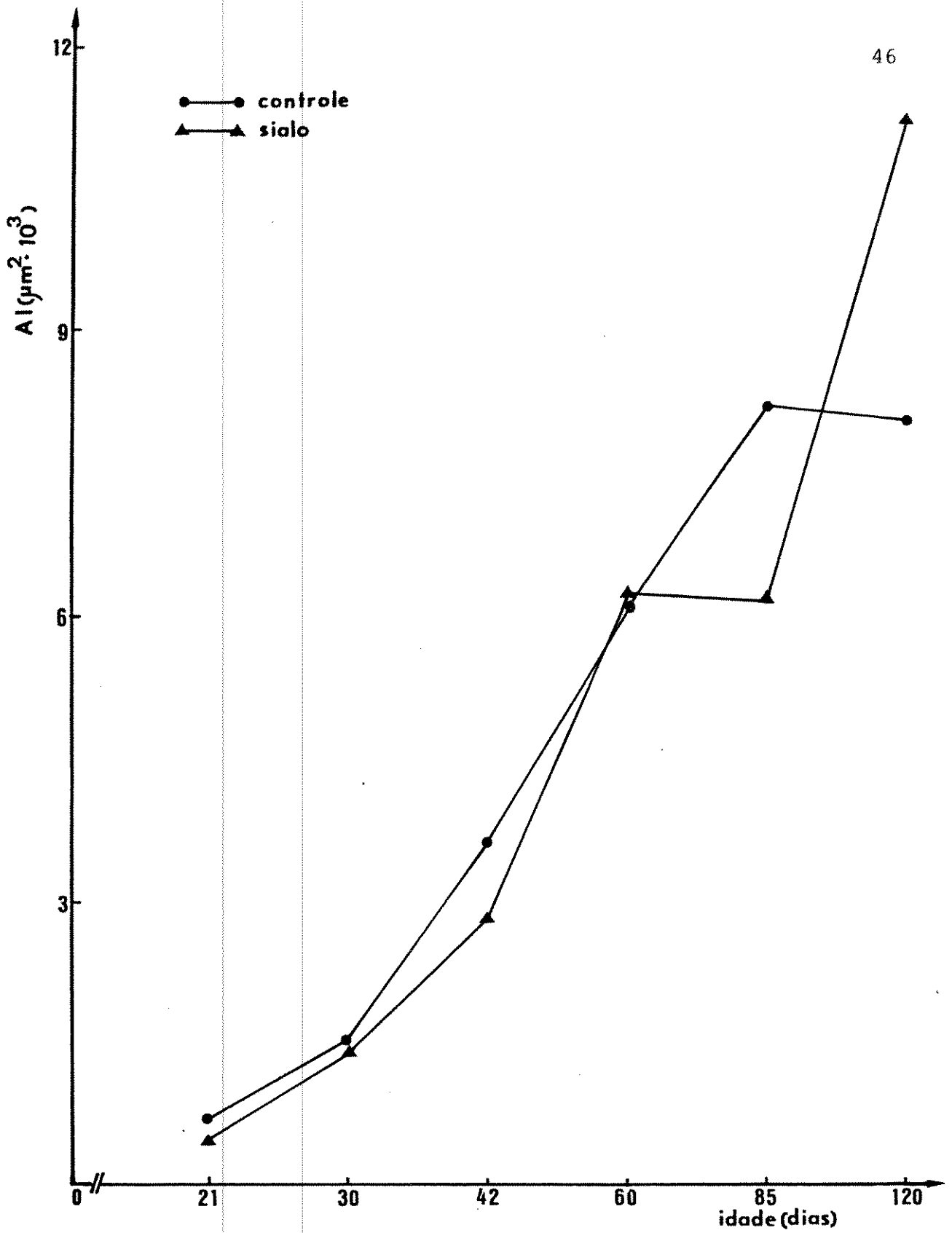


FIGURA 8 - Médias da área luminal tubular (\underline{Al}) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

QUADRO 5

a) Análise de variância da área luminal tubular (A_L) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
Tratamentos	1	$0,2120 \times 10^{-2}$	NS
Idades	5	16,6222	**
Tratamentos x idades	5	8,6381	***
Tratamentos, idades	11		
Resíduo	48		
TOTAL	59		

b) Teste de Tukey para comparação dos contrastes (CONTROLE x SIALO).

	21d	30d	42d	60d	85d	120d
	NS	NS	NS	NS	**	**

c) Teste de Tukey para comparação do conjunto , entre idades.

	30d	42d	60d	85d	120d
21d	NS	NS	*	*	**
30d		NS	NS	*	**
42d			NS	NS	*
60d				NS	NS
85d					NS

NS - não significativo

*- $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

*** - $p < 0,001$

pos CONTROLE e SIALO, que indicam:

- a) diferença significativa entre idade ($p < 0,01$), especialmente quando comparadas as idades de 21 e 30 dias com as de 85 e 120 dias;
- b) valor significativo de F na interação tratamentos x idades ($p < 0,001$);
- c) que, no conjunto, não houve diferença significativa entre tratamentos. Entretanto, comparando-se os contrastes, observou-se diferença significativa às idades de 85 dias ($p < 0,01$) - maiores valores de $A\ell$ no grupo CONTROLE - e 120 dias ($p < 0,01$) - maiores valores de $A\ell$ no grupo SIALO.

4.3. Área Epitelial Tubular (Ae)

Na Tabela II, encontram-se as médias, para cada animal, de Ae aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade. Na Figura 9, estão representadas as médias de cada grupo, em cada idade estudada.

No Quadro 6, encontram-se os resultados da análise de variância e do teste de Tukey para Ae , nos grupos CONTROLE e SIALO, que indicam:

- a) diferença significativa entre idades ($p < 0,001$). Pelo teste de Tukey, observou-se diferença significativa em todos os casos, exceto na comparação entre 60 e 85 dias;
- b) valor não significativo de F na interação tratamento x idades;
- c) diferença significativa entre tratamentos, no conjunto

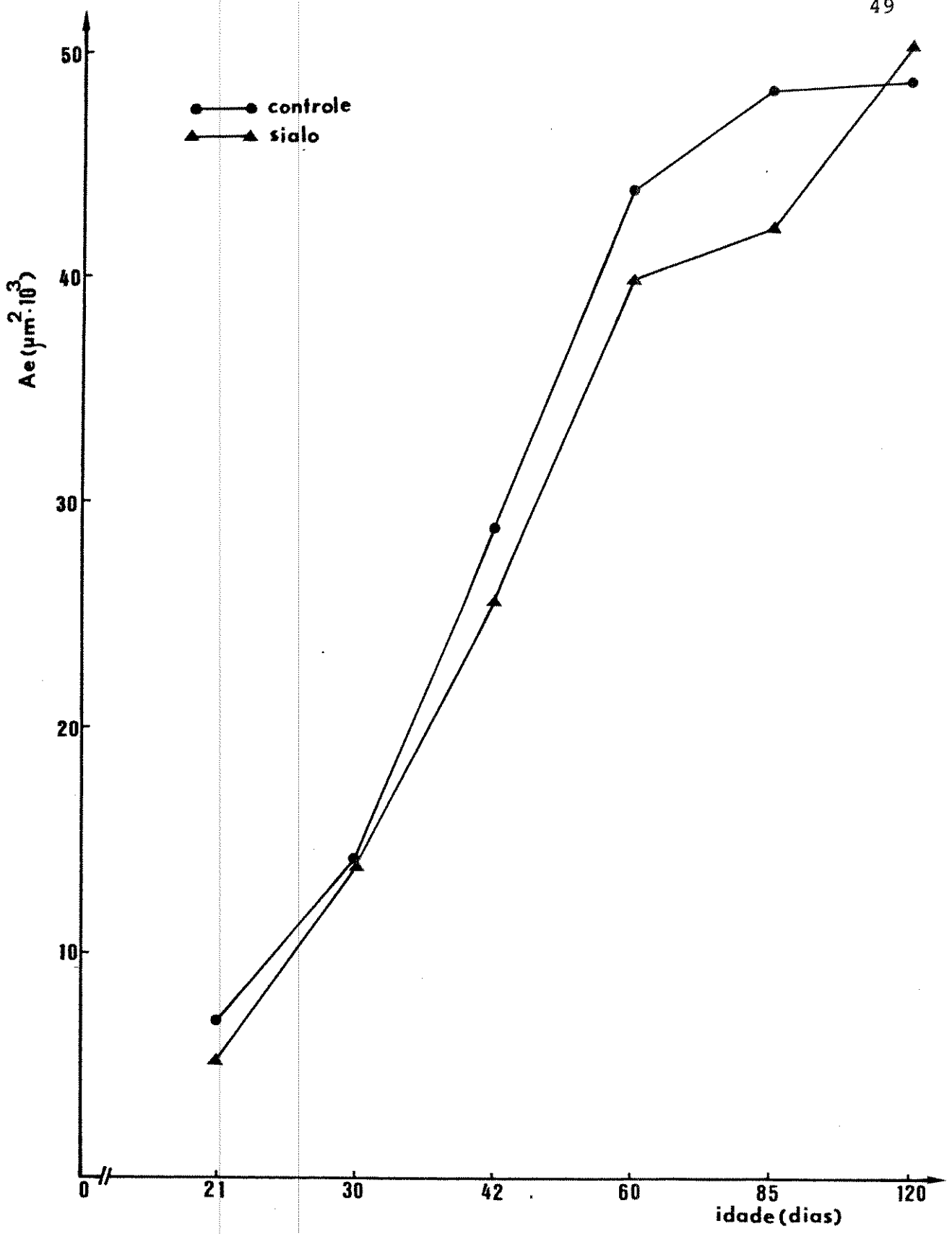


FIGURA 9 - Médias da área epitelial tubular (A_e) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

QUADRO 6

a) Análise de variância da área epitelial tubular (Ae) nos grupos CONTROLE e SIALO aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
Tratamentos	1	9,6012 **
Idade	5	385,2925 ***
Tratamentos x idades	5	2,2162 NS
Tratamentos, idades	11	
Resíduo	48	
TOTAL	59	

b) Teste de Tukey para comparação dos contrastes (CONTROLE x SIALO).

21d	30d	42d	60d	85d	120d
NS	NS	NS	*	**	NS

c) Teste de Tukey para comparação de conjunto, entre idades.

	30d	42d	60d	85d	120d
21d	**	**	**	**	**
30d		**	**	**	**
42d			**	**	**
60d				NS	**
85d					*

NS - não significativo

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

*** - $p < 0,001$

($p < 0,01$). Por comparação dos contrastes, observou-se que o grupo CONTROLE apresentou maiores valores de \underline{Ae} , diferindo significativamente do SIALO aos 60 ($p < 0,05$) e 85 ($p < 0,01$) dias.

5. CONTAGEM DE CÉLULAS GERMINATIVAS

5.1. Espermátócitos Primários em Ratos de 21 Dias de Idade

Na Tabela III, encontram-se as medianas do número de citos I em paquíteno avançado e diplóteno por túbulo seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO, à idade de 21 dias, e na Tabela IV, encontram-se as frequências de distribuição dos números de células por túbulo.

Na Figura 10(a), encontra-se um histograma de frequência, em porcentagens do total, correspondente aos dados da Tabela IV.

Por comparação dos valores das medianas de ambos os grupos pelo teste de \underline{U} , verificou-se que o grupo SIALO diferiu significativamente do CONTROLE ($p < 0,01$), apresentando menores valores.

Pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, observou-se que as amostras populacionais de túbulos seminíferos de ambos os grupos apresentavam diferentes distribuições ($p < 0,001$).

Além disso, observou-se que os túbulos seminíferos de animais do grupo SIALO continham maior número de citos I em degeneração do que o observado em animais

TABELA III

Medianas do número de células germinativas por túbulo seminífero nos grupos CONTROLE (C) e SIALO(S) aos 21, 30 e 42 dias de idade.

IDADE	TIPO CELULAR COMPUTADO	GRUPOS	
		C	S
21 dias	citos I em paquíteno avançado e diplóteno	11	6
		15	7
		12	7
		11	7
		14	5
		n= 939	n= 613
30 dias	tides redondas	19	21,5
		16	20
		12	11
		33	19,5
		18	27
		n=1343	n= 746
42 dias	tides alongadas presentes nos estágios X-XIV do ciclo do epitélio seminífero	34	22
		85	28
		11	52
		17,5	18
		65	25
		n= 349	n= 354
42 dias	tides alongadas presentes nos estágios I-VII do ciclo do epitélio seminífero	5	3
		12,5	3
		3	7
		4	5
		15	4
		n= 359	n= 388

TABELA IV - Distribuição das frequências dos números de células germinativas por túbulo seminífero nos grupos CONTROLE (C) e SIALO (S) aos 21, 30 e 42 dias de idade.

a) número de citos I em paquítono avançado e diplôtono, por túbulo seminífero em animais de 21 dias.

GRUPO	NÚMERO DE CÉLULAS/TÓBULO									
	1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36	37-40
C	83	187	232	194	135	74	26	6	1	1
S	197	258	113	37	8	0	0	0	0	0

b) número de tides redondas, por túbulo seminífero em animais de 30 dias.

GRUPO	NÚMERO DE CÉLULAS/TÓBULO										
	1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-56	57-63	64-70	71-77
C	281	256	185	218	152	99	67	38	25	14	8
S	178	103	130	142	104	54	24	10	0	1	0

c) número de tides alongadas nos estágios X-XIV, por túbulo, em animais de 42 dias.

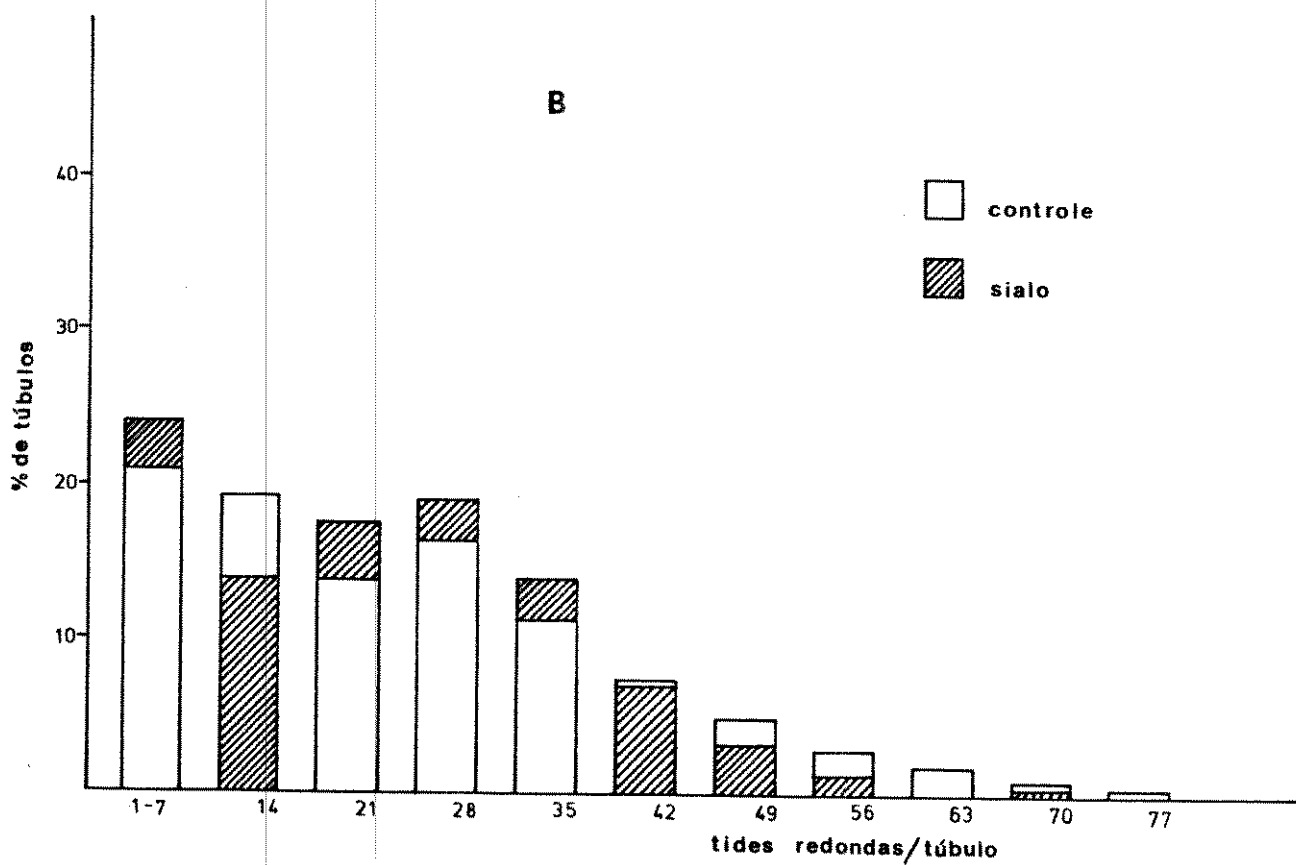
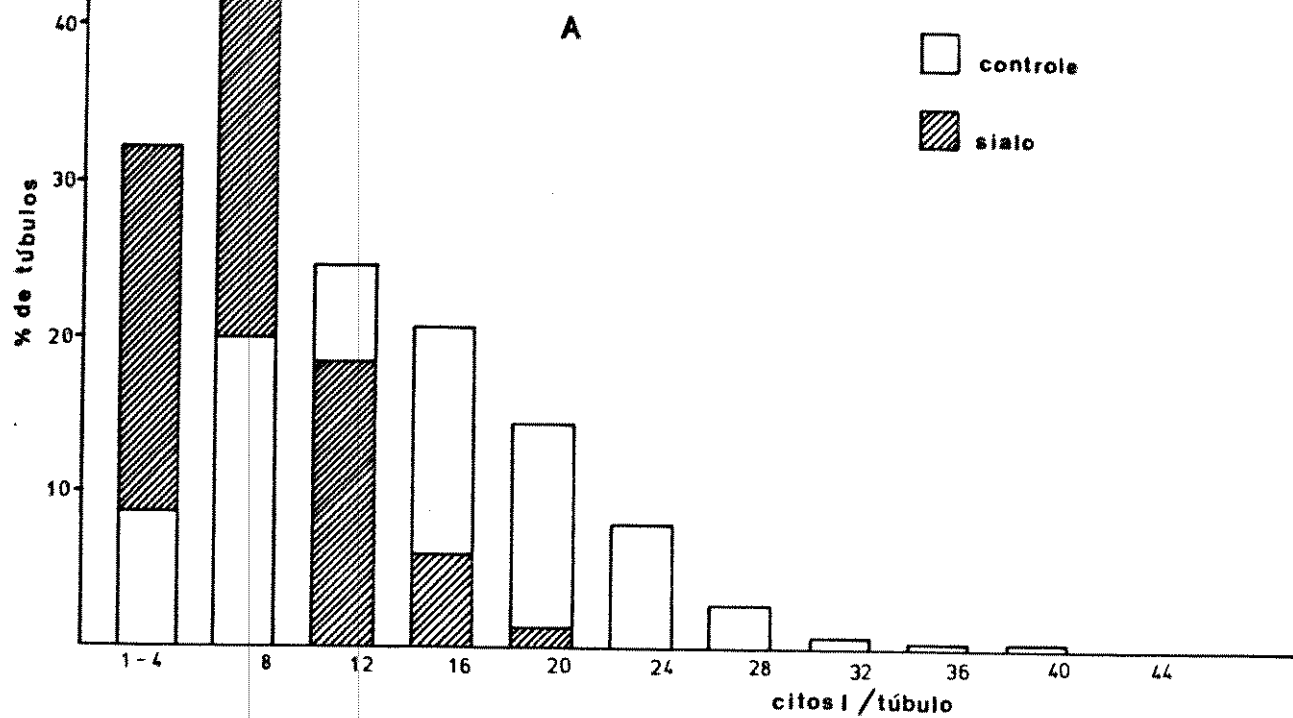
GRUPO	NÚMERO DE CÉLULAS/TÓBULO										
	1-12	13-24	25-36	37-48	49-60	61-72	73-84	85-96	97-108	109-120	121-132
C	65	54	30	29	28	42	39	28	26	7	1
S	58	121	93	49	20	10	3	0	0	0	0

d) número de tides alongadas nos estágios I-VII, por túbulo, em animais de 42 dias.

GRUPO	NÚMERO DE CÉLULAS/TÓBULO										
	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	37-42	43-48	49-54	55-60	61-66
C	148	84	43	17	17	15	14	11	5	4	1
S	266	85	19	11	6	0	1	0	0	0	0

FIGURA 10 - Histogramas de frequência do número de células germinativas por túbulo seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO. As frequências estão representadas como porcentagens do total de túbulos.

- a) número de citos I em paquíteno avançado e diplóteno por túbulo seminífero em animais de 21 dias de idade;
- b) número de tides redondas por túbulo seminífero em animais de 30 dias de idade.



do grupo CONTROLE, enquanto que a degeneração de gônias era semelhante nos dois grupos.

5.2. Espermátides Redondas em Ratos de 30 Dias de Idade

Na Tabela III, encontram-se as medianas do número de tides redondas por túbulo seminífero, nos grupos CONTROLE e SIALO, à idade de 30 dias, e, na Tabela IV, encontram-se as frequências de distribuição dos números de células por túbulo.

Na Figura 10(b), encontra-se um histograma de frequência, em percentagens do total, correspondente aos dados da Tabela IV.

Por comparação dos valores das medianas de ambos os grupos pelo teste de U, não foi verificada diferença significativa entre eles.

Pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, observou-se que as amostras populacionais de túbulos seminíferos dos dois grupos apresentavam diferentes distribuições ($p < 0,05$).

Pelo exame das secções histológicas, não se observou aumento de degeneração celular, em nenhuma geração, no epitélio seminífero de ratos do grupo SIALO.

5.3. Espermátides Alongadas em Ratos de 42 Dias de Idade

Na Tabela III, encontram-se as medianas do

número de tides alongadas por túbulo seminífero, nos grupos CONTROLE e SIALO, à idade de 42 dias, e, na Tabela IV, encontram-se as frequências de distribuição dos números de células por túbulo.

A Figura 11(a,b) mostra histogramas de frequência, em porcentagens do total, correspondentes aos dados da Tabela IV.

As tides alongadas contadas em secções tubulares que apresentavam os estádios X-XIV do ciclo do epitélio seminífero foram comparadas entre os grupos separadamente das contadas em secções que apresentavam os estádios I-VII. Isto porque as amostras das populações tubulares mostraram-se diferentes nesses dois conjuntos de estádios.

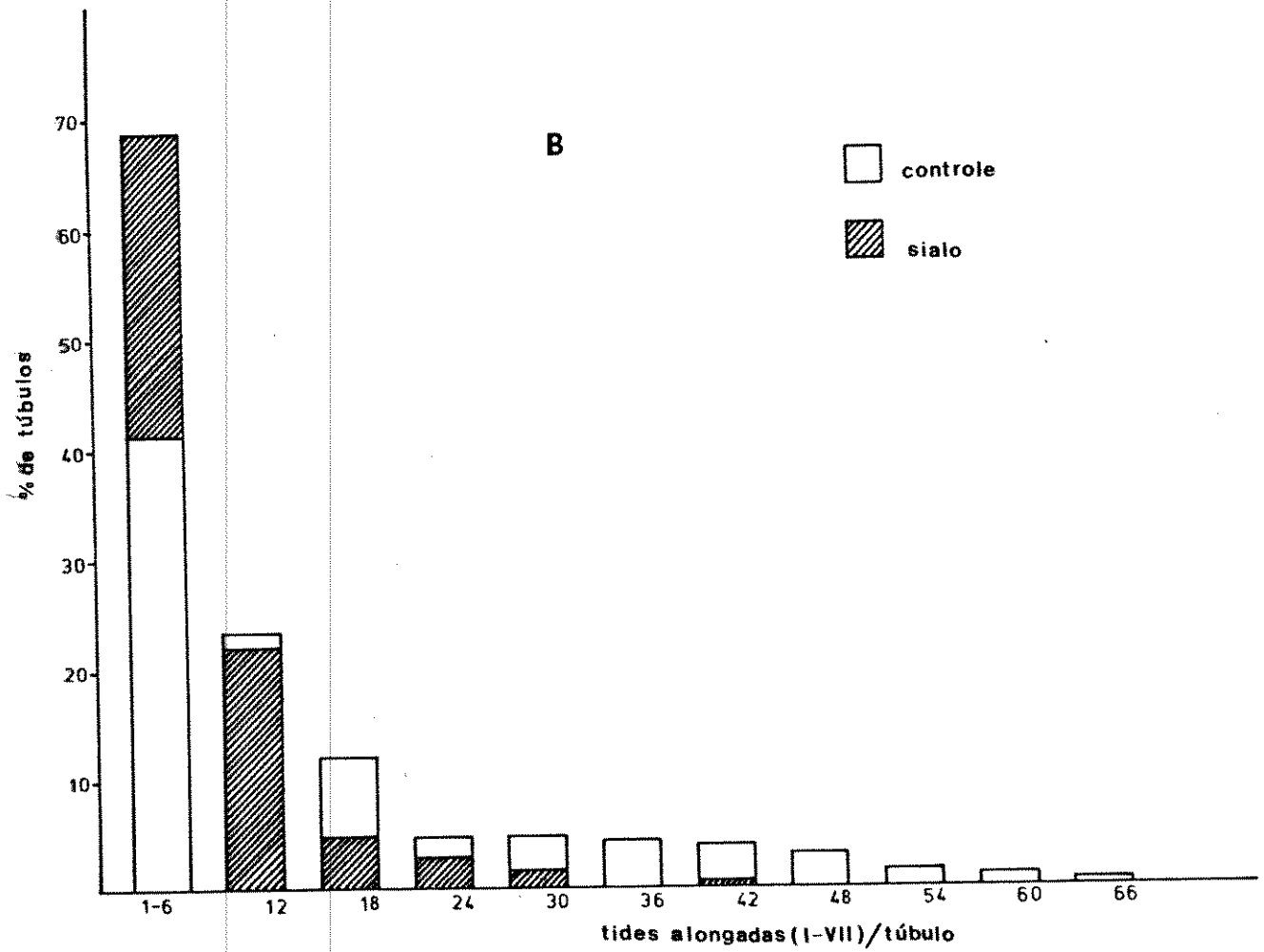
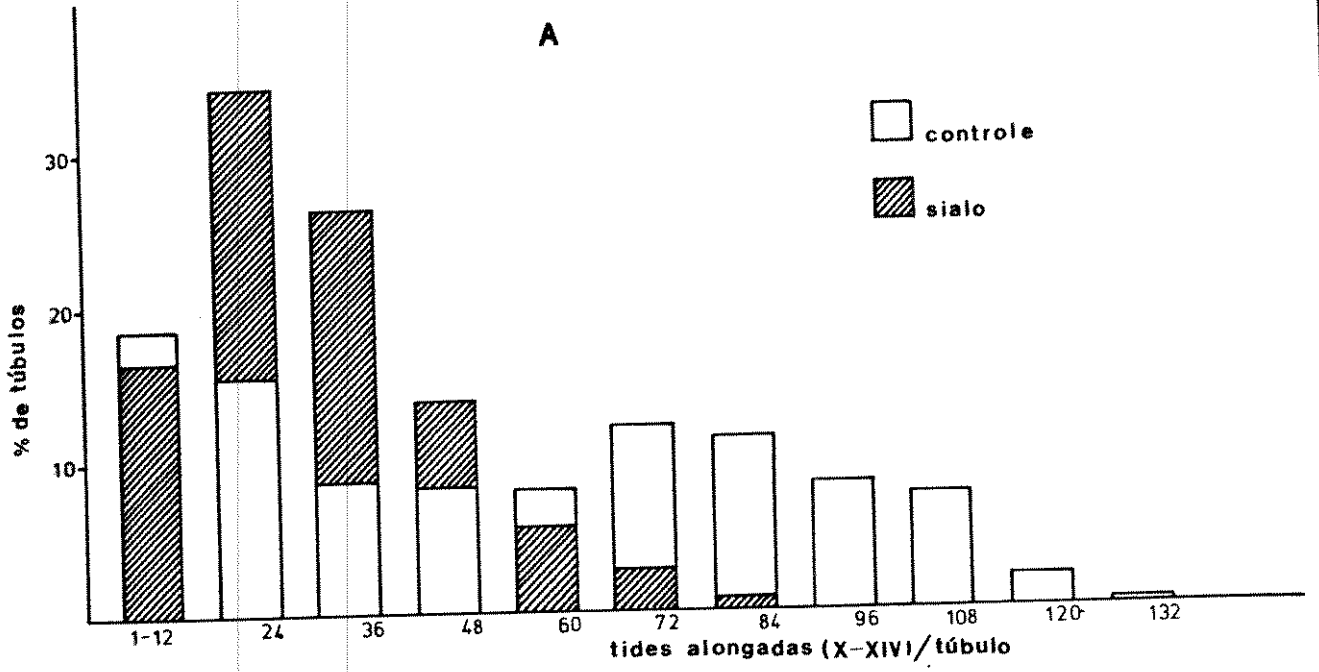
Por comparação dos valores das medianas dos dois grupos pelo teste de \underline{U} , não se verificou diferença significativa entre os grupos, quer as tides se encontrassem nos estádios X-XIV, quer nos estádios I-VII do ciclo.

Pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, observou-se que as amostras populacionais de túbulos seminíferos dos dois grupos apresentavam diferentes distribuições ($p < 0,001$), independente do estágio do ciclo em que fossem observadas.

Nesta idade, verificou-se um aumento da degeneração de tides em túbulos seminíferos de animais do grupo SIALO.

FIGURA 11 - Histogramas de frequência do número de células germinativas por túbulo seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO. As frequências estão representadas como porcentagens do total de túbulos.

- a) número de tides alongadas presentes nos estágios X-XIV, por túbulo seminífero em ani mais de 42 dias de idade;
- b) número de tides alongadas presentes nos estágios I-VII, por túbulo seminífero em ani mais de 42 dias de idade.



6. FREQUÊNCIAS RELATIVAS DOS ESTÁDIOS DO CICLO EPITÉLIO SEMINÍFERO.

Na Tabela V, encontram-se frequências relativas dos estádios do ciclo epitélio seminífero de testículos de animais dos grupos CONTROLE e SIALO, aos 60, 85 e 120 dias de idade.

Nos Quadros 7, 8, 9, 10 e 11, encontram-se os resultados da análise de variância para os diversos estádios do ciclo, que indicam não haver diferença significativa quer entre tratamentos, quer entre idades, em todos os grupos de estádios estudados.

O exame histológico qualitativo dos testículos não mostrou diferenças marcantes entre os dois grupos, a partir do período puberal.

TABELA V - Frequências relativas (%) dos estádios do ciclo do epitélio seminífero nos grupos CONTROLE (C) e SIALO (S) aos 60, 85 e 120 dias de idade.

IDADE	ESTÁDIOS DO CICLO									
	I - III *		IV - VI*		VII-VIII *		IX - XIII *		XIV *	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
60 dias	21,0	24,8	17,0	18,6	28,8	24,4	27,0	27,8	6,2	4,4
	19,2	21,0	14,2	12,6	32,2	31,6	31,0	30,0	3,4	4,6
	23,8	25,2	17,6	10,4	27,8	24,8	26,6	34,6	4,2	5,0
	20,6	22,8	18,6	14,4	29,8	28,2	26,2	29,8	4,8	4,8
	24,0	18,2	16,0	16,4	27,0	28,4	27,6	35,2	5,4	1,8
85 dias	25,2	21,0	18,2	15,4	25,4	27,0	27,0	31,8	4,2	4,8
	20,0	22,8	14,6	13,0	34,4	31,0	27,0	29,8	4,0	3,4
	19,4	21,0	11,4	15,8	35,0	30,2	29,8	27,0	4,4	6,0
	24,0	20,0	16,6	12,0	32,4	32,6	22,6	30,4	4,4	5,0
	20,6	22,6	11,6	18,8	36,0	28,4	23,8	26,6	8,0	3,6
120 dias	22,0	16,8	15,0	11,8	25,0	34,0	29,2	29,4	8,8	8,0
	20,6	21,6	15,2	15,0	29,8	34,6	27,2	25,2	7,2	3,6
	21,2	24,4	11,8	12,8	31,4	30,0	30,8	25,8	4,8	7,0
	22,4	19,8	11,0	15,8	30,8	31,6	31,2	28,2	4,6	4,6
	22,6	25,0	16,2	14,0	26,6	29,2	29,6	26,8	5,0	5,0

* Percentuais obtidos da análise de 500 túbulos.

QUADRO 7

Análise de variância das frequências relativas dos estádios I-III do ciclo do epitélio seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO aos 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
Tratamentos	1	0,0000	NS
Idades	2	0,0965	NS
Tratamentos x idades	2	0,1423	NS
Tratamentos, idades	5		
Resíduo	24		
TOTAL	29		

NS - não significativo.

QUADRO 8

Análise de variância das frequências relativas dos estádios IV-VI do ciclo do epitélio seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO, aos 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
Tratamentos	1	0,3288	NS
Idades	2	1,1262	NS
Tratamentos x idades	2	0,8573	NS
Tratamentos, idades	5		
Resíduo	24		
TOTAL	29		

NS - não significativo.

QUADRO 9

Análise de variaância das frequências relativas dos estádios VII-VIII do ciclo do epitélio seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO aos 60, 85 e 120 dias de idade

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
Tratamentos	1	0,1581	NS
Idades	2	2,7048	NS
Tratamentos x idades	2	2,9808	NS
Tratamentos, idades	5		
Resíduo	24		
TOTAL	29		

NS - não significativo

QUADRO 10

Análise de variância das frequências relativas dos estádios IX-XIII do ciclo do epitélio seminífero nos grupos CONTROLE x SIALO aos 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
Tratamentos	1	0,3533 NS
Idades	2	0,1822 NS
Tratamentos x idades	2	0,4151 NS
Tratamentos, idades	5	
Resíduo	24	
TOTAL	29	

NS - não significativo

QUADRO 11

Análise de variância das frequências relativas do estágio XIV do ciclo do epitélio seminífero nos grupos CONTROLE e SIALO aos 60, 85 e 120 dias de idade.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
Tratamentos	1	0,9960	NS
Idades	2	2,3084	NS
Tratamentos x idades	2	0,0535	NS
Tratamentos, idades	5		
Resíduo	24		
TOTAL	29		

NS - não significativo

DISCUSSÃO

1. PESOS CORPORAL E TESTICULAR

No que diz respeito ao crescimento ponderal dos animais sialoadenectomizados, a análise dos resultados indica que os grupos CONTROLE e SIALO apresentaram diferentes padrões de crescimento, o que se caracterizou por menor ganho de peso corporal nos animais sialoadenectomizados a partir da idade adulta (85 e 120 dias de idade). No período estudado que antecedeu a idade adulta (de 21 a 60 dias de idade), o crescimento corporal do grupo SIALO não foi estatisticamente diferente do observado no grupo CONTROLE.

Há evidências de que a remoção das glândulas submandibulares e sublinguais seja fatal em ratos de idade inferior a 10 dias, devido à incapacidade de sucção de leite materno (PLAGGE, 1938; EPSTEIN *et alii*, 1970). No entanto, quando este tratamento é realizado após o 15º dia de vida, obtém-se sobrevivência máxima (EPSTEIN, *et alii*, 1970), devido, segundo estes autores, ao fato de que a glândula parótida, nesta idade, já seja capaz de substituir funcionalmente, na produção de saliva, as glândulas extirpadas.

A maior parte dos autores relata deficiência de crescimento ponderal em ratos jovens após ablação das glândulas submandibulares e/ou sublinguais. NA-

RASIMHAN & GANLA (1968) mencionam atraso no crescimento de ratos, nos quais as glândulas submandibulares foram removidas aos 9-10 dias de vida. O mesmo foi observado por PLAGGE (1938) quando a cirurgia era realizada até os 20 dias de idade. Após esta idade, a sialoadenectomia foi incapaz de alterar o desenvolvimento dos animais. No entanto, BARTHE *et alii*, (1970) descreveram, em ratos sialoadenectomizados com peso de 60-70 g (provavelmente com idade em torno de 30 dias), curvas de crescimento inferiores às de animais CONTROLE. Já em ratos adultos submetidos à remoção das glândulas submandibulares e sublinguais aos 3 meses, THOMAS *et al* (1967) não observaram diferença no ganho de peso corporal, com relação a ratos "sham-operados".

Quando a ablação das glândulas submandibulares e sublinguais é realizada numa idade semelhante à qual os animais foram operados, neste trabalho - que foi de 17 dias - tem se encontrado redução no ganho de peso corporal, especialmente no início do período pós-operatório, havendo (PAULO, 1980), ou não (LOUSSOUARN, 1972; RAMALHO, 1979), uma posterior recuperação de peso.

Neste trabalho, analisou-se estatisticamente o conjunto de grupos e idades. Por este procedimento, encontrou-se que, até a puberdade, ou seja, até 43 dias de período pós-operatório, os pesos corporais dos grupos SIALO e CONTROLE não diferiram. Porém, se as médias de cada grupo, em cada idade, forem comparadas isolada-

mente, através de teste de t de Student, se verifica, 4 dias após a cirurgia, redução do peso corporal no grupo SIALO, com um grau de significância de $p < 0,001$ ($t = 7,9446$), não havendo mais diferenças entre os pesos corporais dos grupos aos 25 dias do período pós-operatório ($t = 0,5247$). Por este último procedimento, portanto, foram observados resultados semelhantes aos dos autores supracitados, quanto ao menor peso corporal nos animais experimentais logo após a sialoadenectomia.

Contudo, não se pretendeu, neste trabalho, comparar separadamente, a cada idade, as médias de cada grupo, mas sim analisar o crescimento global dos grupos durante o período estudado. Neste tipo de abordagem, em que é considerada a variância do conjunto de grupos e idades, as modificações ilustradas na comparação isolada das médias não se mostraram significativas.

Constatou-se, neste trabalho, que, após a idade adulta (85 e 120 dias), os ratos do grupo SIALO tiveram menor crescimento ponderal do que os do grupo CONTROLE. Este resultado foi semelhante aos obtidos por outros autores, que observaram menor peso corporal em animais sialoadenectomizados a partir de 70 dias de pós-operatório; porém, segundo estes autores, esta diferença existia desde o início do período posterior à cirurgia (RAMALHO, 1979; AREAS *et alii*, 1983), o que não ocorreu no presente experimento.

Quanto ao peso testicular, os grupos SIALO e CONTROLE não apresentaram diferenças entre si durante to

do o período estudado. Este resultado também foi obtido por outros autores (MUHLER *et al*, 1954; THOMAS *et al*, 1967; BARTHE *et alii*, 1970; LOUSSOUARN, 1972; RAMALHO *et alii*, 1983), que não encontraram alterações do peso testicular em ratos após a remoção das glândulas submandibulares e/ou sublinguais.

No estudo do crescimento alômetrico do testículo, observou-se que, durante o período investigado, em ambos os grupos, apenas uma reta era insuficiente para representar o desenvolvimento do testículo. Ao contrário, constatou-se a existência de duas etapas no desenvolvimento testicular: uma, pré-puberal, compreendendo as idades de 21, 30 e 42 dias, caracterizada por um crescimento testicular proporcionalmente maior que o corporal ($k > 1$); outra, a partir da puberdade, incluindo as idades de 60, 85 e 120 dias, em que, em média, o testículo cresceu menos, com relação ao corpo ($k < 1$). Em ambas as etapas, as relações entre o log do peso testicular e o log do peso corporal foram representadas adequadamente por retas.

Os valores de k (taxa de crescimento testicular, com relação ao corporal) encontrados nos grupos CONTROLE e SIALO, na etapa pré-puberal, concordam com os valores obtidos por CRUZ (1962), para testículos de ratos com mais de 20 dias de idade.

ADDIS & GRAY (1950), estudando a relação ponderal entre o testículo e o corpo, no rato, também observaram que os pontos não se ajustavam bem com uma única reta, sendo necessário representar seus pontos com 3 re-

tas. Neste estudo, os autores descreveram dois pontos de inflexão: o primeiro, ocorrendo a um peso corporal de 69,5 g (ou 4,842 em escala logarítmica, com o peso expresso em mg); e um segundo, entre 129 e 180 g (ou 5,11 e 5,255, respectivamente, em escala logarítmica), dependendo do intervalo de classe utilizado para os pesos corporais. No presente trabalho, o primeiro ponto de inflexão citado pelos autores não foi observado, provavelmente por insuficiência de pontos na faixa de 35 a 55 g de peso corporal. No entanto, o segundo ponto de inflexão, o puberal, foi detectado neste estudo, ocorrendo em torno de 145 g (ou 5,16, em escala logarítmica), resultado semelhante ao relatado por ADDIS *et al* (1950).

Este ponto de inflexão, ou ponto crítico puberal, coincidiu com o aparecimento de espermatozoides maduros na luz tubular, o que se dá em torno de 50 dias de idade, no rato (HUCKINS, 1965). A fase anterior a este ponto crítico, onde o coeficiente de alometria (k) é maior que 1, refletiria o período de intensa multiplicação celular no testículo, principalmente no epitélio seminífero, até a produção dos primeiros espermatozoides. A segunda fase, pós-puberal, caracterizaria uma atividade celular "estabilizada" do epitélio seminífero, voltada à manutenção da taxa de produção de espermatozoides, quando o peso testicular tenderia a se estabilizar, sem grandes ganhos relativos de massa. Daí k assumir valores menores que a unidade.

A comparação dos valores dos limites dos intervalos de confiança de k entre os grupos SIALO e CONTROLE revelou que, em ambas as etapas, não houve diferença entre os dois grupos.

2. HISTOMETRIA DO TÚBULO SEMINÍFERO

A medida das dimensões do túbulo seminífero tem sido utilizada na avaliação da função testicular, uma vez que alterações no tamanho tubular, resultariam em mudanças de volume celular intratubular. Em geral, o parâmetro mais utilizado para verificação das dimensões tubulares, à microscopia óptica, tem sido o diâmetro do túbulo seminífero. No entanto, o diâmetro tubular não seria o melhor parâmetro, pois o tamanho de um corpo não uniforme não pode ser aferido, estabelecendo-se apenas uma dimensão. Mesmo quando se examinam seções rigorosamente transversais de túbulos seminíferos, raramente elas são perfeitamente transversais. Já a área tubular média, derivada de seções, bidimensionais, permitem informações mais confiáveis quanto às dimensões do túbulo seminífero (WEISSBACH & IBACH, 1976). Neste trabalho, além da área transversa total, foi também determinada a área média da luz tubular, o que permitiu o cálculo da área transversal efetivamente ocupada pelo epitélio seminífero. Ressalta-se que os valores da área epitelial acompanharam bem as mudanças nos valores da área transversal total, o que indica que este último parâmetro mostrou-se

válido na avaliação do túbulo seminífero.

A análise dos resultados destas medidas mostra que, com a idade, ocorreu um crescimento acentuado, tanto na área transversal total do túbulo (At), quanto das áreas luminal (Al) e epitelial (Ae), havendo estabilização dos valores após a idade de 85 dias, no grupo CONTROLE. Um padrão semelhante de crescimento tubular transversal, expresso por At, foi descrito por DE JONG & SHARPE (1977) e KRUEGER, HODGEN & SHERINS (1974), tendo sido avaliado, por estes últimos autores, pelo diâmetro tubular.

Os valores de Al registrados neste trabalho mostraram-se inferiores aos citados por KRUEGER *et alii*, (1974), aos 21, 30 e 42 dias de idade (para permitir a comparação, calculou-se a área equivalente a partir dos diâmetros tubulares médios fornecidos pelos autores) e aos relatados por DE JONG *et al* (1977) aos 21 e 42 dias. A partir dos 60 dias, porém, os valores encontrados neste estudo foram semelhantes aos descritos por esses autores.

No grupo SIALO, o crescimento pré-puberal de At, Al e Ae não diferiu do que ocorreu no grupo CONTROLE. No entanto, aos 60 dias, os animais sialoadenectomizados apresentaram menores valores de Ae, acentuando-se esta diferença aos 85 dias, quando também os valores de At e Al foram inferiores aos do grupo CONTROLE. A partir de então, entretanto, esta tendência se reverteu e,

aos 120 dias, o grupo SIALO apresentou valores de At e Ae maiores que no grupo CONTROLE, e os valores de Al foram semelhantes nos dois grupos.

O crescimento transversal do túbulo seminífero tem sido relacionado à produção de testosterona, que, no plasma do rato, tem seus níveis aumentados desde a idade de 30 dias até à maturidade, refletindo o desenvolvimento da geração adulta de células de Leydig (LEE *et alii*, 1975). ROBERT, DJAVAHERI-TEHRANI & DELOST (1978) relatam que o desenvolvimento do diâmetro tubular está em correlação linear com o teor de testosterona testicular, na puberdade.

Se realmente existe uma relação direta entre o crescimento transversal do túbulo seminífero e os níveis de testosterona no animal em desenvolvimento, talvez pudesse ser aventada a hipótese de que a deficiência transitória de crescimento de At observada nos ratos do grupo SIALO possa ser decorrente de uma redução dos níveis de testosterona, nestes animais.

Alguns autores consideram um possível envolvimento de fatores nutricionais com relação aos efeitos da sialoadenectomia no testículo (BIXLER *et alii*, 1955a; RAMALHO, 1979), tendo sido sugerido por OSÓRIO & KRAEMER (1965) que a sialoadenectomia exerceria seus efeitos sobre o crescimento por alterações metabólicas associadas com absorção e utilização do alimento. Além disso, tem sido relatada redução de ingestão de alimento em ratos sialoadenectomizados (BIXLER *et alii*, 1955a ;

WAGNER *et alii*, 1960; WAGNER, 1961; RAMALHO, 1979).

Por outro lado, GRENWAL, MICKELSEN & HAFS (1971) relatam, em ratos submetidos a uma restrição alimentar de 50% da dieta consumida diariamente por animais controle, (*ad libitum*), uma queda da testosterona sérica nas primeiras semanas de experiência, seguida por um rebote 7 semanas depois. Curiosamente, a recuperação de *At* no grupo SIALO, observada neste trabalho, ocorreu 15 semanas após a sialoadenectomia, ou seja, no mesmo período experimental em que estes autores observaram o rebote de testosterona em ratos subalimentados.

GLASS *et alii* (1979) mencionam que ratos alimentados com dieta contendo cerca de 1/3 de teor proteico da dieta padrão, por 4 semanas a partir dos 21 dias de idade, manifestaram hipoandrogenismo, com redução do peso das glândulas sexuais acessórias; porém os autores não observaram alteração do diâmetro dos túbulos seminíferos. No presente trabalho, também não foi verificada redução de *At* até 6 semanas após a sialoadenectomia. No entanto, os autores descreveram diminuição do diâmetro tubular em ratos submetidos a restrição de 60% na ingestão de alimentos.

Em ratos sialoadenectomizados, THOMAS *et al* (1967) observaram queda do nível de frutose das vesículas seminais - indicativa da redução da secreção de andrógenos - a partir de 16 dias de pós-operatório.

Como, no presente trabalho, não foi verificado o consumo alimentar nos animais experimentais, não se

dispõe de dados para discutir o problema com profundidade. Contudo, os resultados aqui obtidos quanto à área transversal tubular indicam a importância do desenvolvimento de estudos futuros, em que se possa investigar a respeito do estado nutricional e das condições hormonais após a sialoadenectomia.

3. EPITÉLIO GERMINATIVO

A análise do epitélio germinativo nos animais sialoadenectomizados, neste estudo, revelou alterações quantitativas no período pré-puberal, enquanto que, após a puberdade, o quadro histológico dos testículos de ratos sialoadenectomizados não diferiu do observado em animais controle.

Aos 21 dias de idade (4 dias de período pós-operatório), os animais do grupo SIALO apresentaram menor número de citos I em final da prófase meiótica, por túbulo seminífero, e aumento da degeneração de citos I, em relação aos animais do grupo CONTROLE. Observou-se também, entre os dois grupos, diferença na distribuição das amostras das populações de túbulos seminíferos, quanto ao número de citos por túbulo.

Aos 30 dias, os dois grupos não diferiram quanto à mediana do número de tides redondas por túbulo. No entanto, registrou-se diferença (menos acentuada que na idade anterior) na distribuição das amostras das populações de túbulos, quanto ao número de tides

por túbulo.

Aos 42 dias, a mediana do número de tides alongadas não diferiu entre os grupos CONTROLE e SIALO. Porém, verificou-se que as amostras das populações de túbulos seminíferos diferiram na distribuição, quanto ao número de tides alongadas por túbulo. Além disso, foi observado aumento da degeneração de tides no grupo SIALO.

A partir de 60 dias, no entanto, foi observada a estadiação normal da espermatogênese no grupo SIALO, e não foram detectados sinais de alterações no epitélio seminífero.

A redução do número de citos I em final da prófase meiótica em ratos de 21 dias no grupo SIALO poderia, à primeira vista, ser explicada por uma redução na taxa mitótica das células-mãe, ou seja, gônias, e/ou por aumento da degeneração de citos I no decorrer da prófase. Porém, segundo HUCKINS (1965), os citos I iniciam a prófase meiótica, em ratos Wistar, entre 12 e 13 dias de idade. Assim, o tipo celular, cujo número se mostrou reduzido no grupo SIALO aos 21 dias, já existia aos 17 dias, quando foi realizada a sialoadenectomia, e possíveis alterações na taxa mitótica das gônias, resultantes do tratamento, não poderiam ser detectáveis pelo número de citos I em final de prófase, num período tão curto. Portanto, parece mais atrativa a hipótese de que o menor número de citos I observado resultaria de um aumento da degeneração deste tipo celular. Esta hipótese é corroborada pelo achado de maior número de citos I em degenera

ção nos ratos de 21 dias do grupo SIALO.

Aos 42 dias, a diferença encontrada no teste das distribuições das amostras de túbulos seminíferos de animais dos grupos CONTROLE e SIALO, quanto ao número de tides alongadas por túbulo, e o aumento da de geração de tides no grupo SIALO, com relação ao grupo CONTROLE, fornecem indicações de que a sialoadenectomia tenha causado redução do número das células germinativas mais avançadas do epitélio seminífero, tal como aconteceu nos animais de 21 dias. A não detecção de diferença entre as medianas do número de tides alongadas por túbulo, nos dois grupos, poderia ser explicada pelo fato de que o procedimento estatístico empregado - teste de U de Mann-Whitney - , embora, por ser não paramétrico, fosse adequado aos dados em questão, não tenha grande sensibilidade para comparação de valores absolutos, por se destinar à comparação de ordenamentos. No entanto, a diferença altamente significativa ($p < 0,01$) encontrada no teste das distribuições permitiria a conclusão de que os grupos apresentaram diferença, quanto à população de tides alongadas.

As alterações encontradas, contudo, mostraram-se transitórias, restringindo-se ao período pré-puberal, e deve-se ressaltar que a sialoadenectomia não influenciou na taxa de diferenciação das células germinativas. Ou seja, os tipos celulares mais avançados encontrados em testículos de animais do grupo CONTROLE, a uma dada idade, também foram observados, na mesma etapa

de diferenciação, em animais do grupo SIALO da mesma idade. Portanto, apesar de causar aumento da degeneração das células germinativas mais avançadas, a sialoadenectomia não provocou atraso da espermatogênese.

Resultados semelhantes foram descritos por PAULO (1980), que observou em ratos sialoadenectomizados com 2 semanas de idade, aumento da degeneração das células germinativas 4 dias após o tratamento. Entretanto, não foram detectadas alterações na taxa de desenvolvimento das células germinativas. Os resultados obtidos foram por ele interpretados como a intensificação de um processo normal, de degeneração celular, sendo, porém, o efeito temporário e, provavelmente, não específico.

ABRAMS (1964) também descreveu, após sialoadenectomia em camundongos adultos, alterações degenerativas no epitélio seminífero entre 8 e 28 dias de período pós-operatório. Mas, aos 42 dias, detectou um aumento da celularidade, sugerindo a existência de um mecanismo compensatório capaz de reverter as alterações iniciais. No presente trabalho, foi evidenciado aumento da degeneração celular aos 4 e 25 dias de período pós-operatório, e o epitélio germinativo se mostrou normal a partir de 43 dias após o tratamento.

A degeneração de um número relativamente grande de células germinativas tem sido relatada como um fenômeno absolutamente constante no testículo normal (REGAUD, 1900). ALLEN & ALTLAND (1952), estudando a degeneração celular em testículos de ratos jovens intactos, observaram que o surgimento de camadas de novos tipos celula

res no epitélio germinativo está normalmente acompanhado por degeneração celular. Assim, inicialmente, seria formado um pequeno número de células numa nova fase de diferenciação, muitas das quais se degenerariam. Isto seria seguido pela formação de uma camada completa, e também ocorreria degeneração de muitas células. Finalmente, se estabeleceria uma camada normalmente funcionante de cada tipo celular, e a degeneração cessaria gradualmente. Assim, verifica-se que as células mais diferenciadas seriam mais atingidas pela degeneração, fato já observado por REGAUD (1900).

Segundo ALLEN *et al* (1952), a degeneração celular, no epitélio seminífero, teria duas funções: promover a existência de espaço suficiente para as células em rápida diferenciação, e ajudar no suprimento da energia requerida pelo epitélio, em grande atividade.

Estes autores referem-se às condições que influiriam na degeneração celular no testículo, tais como:

- a. a falta de espaço físico determinada pelo aumento do número e tamanho das células germinativas, durante o crescimento testicular;
- b. suprimento insuficiente de energia local, uma vez que a alta atividade de multiplicação e diferenciação no epitélio seminífero resultaria em maior demanda de energia;
- c. constituição genética;
- d. condições somáticas e/ou externas adversas, tais co-

mo, doença, hipoxia, altas temperaturas, anormalidades hormonais, alimentação insuficiente e desbalanceamento metabólico.

REGAUD (1900) também se refere a perturbações no contato entre células germinativas e células de Sertoli como uma provável causa da degeneração celular no epitélio seminífero.

Como já foi exposto anteriormente, muitos autores consideram que haja um envolvimento de fatores nutricionais nas alterações testiculares observadas após a sialoadenectomia. RAMALHO (1979) descreveu um quadro progressivo de lesão testicular, caracterizado por aumento da degeneração e redução da celularidade do epitélio germinativo de ratos sialoadenectomizados alimentados com ração comercial deficiente em alguns componentes (vide "Introdução"), ao passo que animais alimentados com outra ração, que apresentava maiores teores desses componentes, não mostraram alterações qualitativas do epitélio germinativo. Posteriormente, trabalhando com ratos submetidos a dieta padronizada, RAMALHO *et alii* (1983) encontraram testículos histologicamente normais, 90 dias após a remoção das glândulas salivares.

Se a sialoadenectomia realmente provoca alterações testiculares por influir no estado nutricional dos animais, o fato de não terem sido encontradas, neste trabalho, lesões de maior gravidade no epitélio germinativo dos ratos do grupo SIALO não está em divergência com os resultados obtidos por autores, que encontraram, em ra-

em ratos jovens submetidos a restrição alimentar moderada, sinais de hipoandrogenismo, mas não alterações qualitativas do epitélio germinativo (TALBERT & HAMILTON, 1955; GRENWAL *et alii*, 1971; GLASS *et alii*, 1979).

Mesmo em ratos sialoadenectomizados, THOMAS *et al* (1967) observaram indicações de queda da secreção androgênica, mas as modificações no epitélio seminífero restringiram-se a uma ligeira redução do número de elementos germinativos.

Por outro lado, os resultados de PAULO (1980) sugerem que o efeito da ablação das glândulas salivares sobre o epitélio germinativo envolveria outros fatores, além dos nutricionais. Este autor observou que ratos controle de duas semanas, submetidos a privação alimentar, não apresentaram o aumento de degeneração das células germinativas que foi verificado em animais sialoadenectomizados da mesma idade.

O estudo quantitativo realizado no presente trabalho revelou que a ablação das glândulas submandibulares e sublinguais afetou, ainda que ligeira e temporariamente o epitélio seminífero, em animais imaturos, que ainda apresentam flutuações do padrão secretório de gonadotrofinas hipofisárias e hormônios sexuais. Isto leva a crer que seja de grande importância o desenvolvimento de novos estudos para esclarecer os mecanismos pelos quais a sialoadenectomia poderia exercer este tipo de efeito sobre a espermatogênese.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar quantitativamente o efeito da remoção das glândulas salivares submandibulares e sublinguais sobre o epitélio seminífero de ratos, acompanhando - se a espermatogênese destes animais desde o período pré-pu-beral até a idade adulta.

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, que, aos 17 dias de idade, sofreram a-blação das glândulas submandibulares e sublinguais (gru-po SIALO) , ou uma simulação desta cirurgia (grupo CON-TROLE). De cada grupo, foram sacrificados 5 ratos aos 21, 30, 42, 60, 85 e 120 dias de idade. No dia do sacri-fício, foram registrados os pesos corporal e testicu-lar. Os testículos esquerdos foram submetidos a proces-samento histológico, para posterior exame. A avaliação histológica dos testículos consistiu, nos animais pré-púberes, de contagem dos elementos germinais mais dife-renciados por túbulo seminífero (espermatócitos primá-rios em paquíteno avançado e diplóteno, aos 21 dias; es-permátides redondas, aos 30 dias; e espermátides alonga-das aos 42 dias). Nos animais de 60, 85 e 120 dias, foi realizada a determinação das frequências relativas dos estádios do ciclo do epitélio seminífero. E, em todas as idades, foram determinadas as áreas transversais to-tais (At) , luminais (Al) e epiteliais (Ae) dos túbu-

los seminíferos.

Os dados de peso corporal, peso testicular, áreas tubulares e frequências relativas dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foram avaliados estatisticamente por análise de variância, empregando-se o teste de Tukey para os casos significativos. Os dados das contagens de células foram testados de duas formas: comparação das medianas do número de células por túbulo; pelo teste de *U* de Mann-Whitney; e comparação das distribuições das amostras de túbulos seminíferos, dos dois grupos, quanto ao número de células por túbulo, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir dos dados de peso corporal e testicular, também foi realizado um estudo alométrico do crescimento ponderal testicular, com relação ao crescimento ponderal do corpo.

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. O crescimento ponderal corporal dos dois grupos mostrou-se diferente, com menor ganho de peso no grupo SIALO após o período puberal (85 e 120 dias de idade). Portanto, a sialoadenectomia teve influência no ganho de peso corporal.
2. O crescimento ponderal do testículo não se mostrou diferente nos grupos CONTROLE e SIALO, evidenciando que a sialoadenectomia não afetou o ganho de peso testicular.
3. No estudo do crescimento alométrico do testículo, observou-se a existência de duas etapas de desenvolvimento, em ambos os grupos: um pré-puberal, em que o

testículo cresceu proporcionalmente mais que o corpo; e outra a partir da puberdade, em que o crescimento testicular foi, em média, menor com relação ao crescimento corporal. Em ambas as etapas, não houve diferença da taxa de crescimento testicular entre os grupos CONTROLE e SIALO, o que leva a conclusão de que a sialoadenectomia não interferiu no crescimento alométrico do testículo.

4. No grupo SIALO, o crescimento pré-puberal de At, Al e Ae não diferiu do que ocorreu no grupo CONTROLE. Mas, aos 60 dias, os ratos sialoadenectomizados apresentaram menores valores de Ae. Esta diferença acentuou-se aos 85 dias, quando, no grupo SIALO, também foram encontrados valores de At e Al inferiores aos do grupo CONTROLE. Porém, a partir de então, o quadro praticamente se inverteu, de modo que, aos 120 dias, o grupo SIALO apresentou maiores valores de At e Al do que o grupo CONTROLE, enquanto que os valores de Ae eram semelhantes nos dois grupos. Se o crescimento transversal do túbulo seminífero está realmente relacionado com os níveis de testosterona testicular, seria possível supor que a sialoadenectomia poderia ter causado uma redução da produção de testosterona, havendo, no entanto, uma posterior recuperação.
5. No estudo da espermatogênese, observou-se que a sialoadenectomia não alterou a taxa de diferenciação das células germinativas. No entanto, foram encontradas alterações quantitativas no epitélio seminífero de

ratos pré-púberes do grupo SIALO, caracterizadas por menor número de espermatócitos primários em final da prófase meiótica, aos 21 dias, e redução da população de espermátides alongadas, aos 42 dias, havendo, também, aumento da degeneração de espermatócitos primários e espermátides aos 21 e 42 dias, respectivamente. A partir de 60 dias, porém, o epitélio seminífero dos ratos do grupo SIALO mostrou estadiação normal da espermatogênese e ausência de alterações. Portanto, pode-se concluir que a sialoadenectomia interfereu na espermatogênese do rato pré-púbere, aumentando a degeneração dos tipos celulares mais evoluídos. Estas alterações, contudo, foram temporárias. Não se tem elementos para considerar se a sialoadenectomia causou este tipo de efeito no testículo, diretamente, ou via eixo hipotálamo-hipofisário, por remoção de um possível fator endócrino por elas sintetizado e/ou armazenado, ou se por interferência no estado nutricional do animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, E.J. Testicular alterations in mice following salivary gland removal. *J. dent. Res.*, 43(5): 869, 1964.
- ADDIS, T. & GRAY, H. Body size and gonad weight. *Growth*, 14: 93-106, 1950.
- ALLEN, E. & ALTLAND, P.D. Studies on degenerating sex cells in immature mammals. II. Modes of degeneration in normal differentiation of the definitive germ cells in the male albino rat from age twelve days to maturity. *J. Morph.*, 91: 515-39, 1952.
- ANGELETTI, P.U.; LEVI-MONTALCINI, R. & CALISSANO, P. The nerve growth factor (NGF): chemical properties and metabolic effects. *Adv. Enzymol.*, 31: 51-75, 1968.
- ANOUMA, S.; MAYUMI, T.; NAKASHIMA, T. & SUZUKI, K. Relationships between salivary gland hormone and sexual function. IV. Effect of salivary gland hormone on guinea pig semen. *Folia endocr. jap.*, 46(2): 127-38, 1970a.
- _____; _____; _____ & _____. Relationships between salivary gland hormone and sexual function. V. Effect of salivary gland hormone on hypophysis and of hypophysectomy, testectomy on salivary gland hormone content. *Folia endocr. jap.*, 46(2): 139-47, 1970b.

- AREAS, M.A.; RAMALHO, A.C.; MACIEL, R.E. & MENEGATTO, G. Alterações do ganho de peso e do teor de nitrogênio muscular em ratos sialoadenectomizados. *Congresso Brasileiro de Fisiologia*, 18, São Lourenço, 1983. Anais (no prelo).
- AZOUBEL, R. Crescimento alométrico do olho durante o desenvolvimento ontogenético da galinha e do rato. *Folia anat. Univ. conimbr.*, 44(2): 1-36, 1975.
- BALDI, A. & CHARREAU, E.H. Testosterone metabolism by rodent submaxillary glands in relation to their sexual dimorfism. *Acta physiol. latinoam.*, 22(3): 129-34, 1972.
- BARTHE, D.; CHATELUT, J.; DARNAULT, J.; DUBOSCO, Y. & DAVID, J.F. Effets de l'ablation des glandes sous-maxillaires et de l'administration de "Parotine" sur la croissance du jeune rat. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 164: 1680-4, 1970.
- BERALDO, W.T.; SIQUEIRA, G. & HENEINE, I.F. Kallikrein and kallikrein inhibitot in rats. *Acta physiol. latinoam.*, 24: 460-3, 1974.
- BHATHENA, S.J.; SMITH, S.S.; VOYLES, N.R.; PENHOS, J. C. & RECANT, L. Studies on submaxillary gland immunoreactive glucagon. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 74(4) : 1574-81, 1977.

- BHOOLA, K.D.; DOREY, G. & JONES, C.W. The influence of androgens on enzymes (chymotrypsin- and trypsin-like proteases, renin, Kallikrein and amylase) and on cellular structure of the mouse submaxillary gland. *J. Physiol.*, Lond. 235(2): 503-22, 1973.
- BIXLER, D.; MUHLER, J.C. & SHAFER, W.G. The effects of castration, sex hormones and desalivation on dental carries in the rat. *J. dent. Res.*, 34: 889-94, 1955a.
- _____ ; _____ & _____. Effect of desalivation on adrenals, uterus and testes in the rat. *J. dent. Res.*, 34: 910-4, 1955b.
- _____ ; WEBSTER, R.C. & MUHLER, J.C. The effects of salivariadenectomy on the reproductive organs of the female rat. *J. dent. Res.*, 36: 559-65, 1957.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. *A textbook of histology*. 10.ed. Philadelphia, Saunders, 1975. p. 807.
- BUEKER, E.D.; WEIS, P. & SCHENKEIN, I. Sexual dimorphism of mouse submaxillary glands and its relationship to nerve growth stimulating protein. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 118: 204-7, 1965.
- BURDMAN, J.A. & GOLDSTEIN, M.N. Synthesis and storage of nerve growth protein in mouse submandibular glands. *J. exp. Zool.*, 160: 183-8, 1965.

- CASTRO CASTRO, J. Efectos de la hipofunción y hiperfunción de las glándulas salivales sobre los testículos de conejos. Oviedo, España, 1973. Tese - doutoramento. *Apud* ARRANZ, I.L. Correlación endocrina salivales. *An. esp. Odontoestomat.*, 34: 215-26, 1975.
- CHEYNE, D.A. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. *J. dent. Res.* 18: 457-68, 1939.
- CHRÉTIEN, M. Action de la testostérone sur la structure fine d'un effecteur: la glande sous-maxillaire de la souris male. II. Réaction des tubes sécréteurs a l'injection de testostérone chez le castrat. *J. Microsc.*, 14(11): 55-74, 1972.
- _____. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.*, 50: 333-96, 1977.
- COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. biol. Chem.*, 237(5): 1555-62, 1962.
- COLETTI, G.; DE MATTEIS, M.; GIANNANGELI, G.; SACCHETTI, G.; CONTI, P.; BOLOGNA, M. & ANGELETTI, P.U. Osservazione

- sugli effetti della asportazione della ghiandola sottomascelare nel topo sulle gonadi maschili. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 54: 292-7, 1978.
- CRUZ, A.R. Estudo do crescimento pós-natal do testículo e da supra-renal do rato: a relação de alometria como método de estudo. Ribeirão Preto, 1958. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Tese - livre-docência.
- DE JONG, F.H. & SHARPE, R.M. The onset and establishment of spermatogenesis in rats in relation to gonadotrophin and testosterone levels. *J. Endocr.*, 75(2): 197-207, 1977.
- DOINE, A.I. & FAVA DE MORAES, F. Histochemistry of the submandibular salivary gland of castrated male mice treated with androgens and anabolic steroids. *Archs. oral Biol.*, 24(8): 569-74, 1979.
- EPSTEIN, A.N.; BLASS, E.M.; BATSHAW, M.L. & PARKS, A. D. The vital role of saliva as a mechanical sealant for suckling in the rat. *Physiol. Behav.*, 5: 1395-8, 1970.
- FUKUDA, M. Histochemical studies on the rat submaxillary gland during post-natal development. *Histochemie*, 8: 342-54, 1967.

- GLASS , A.R.; MELLIT, R.; VIGERSKY, R.A. & SWERDLOFF, R. S. Hypoandrogenism and abnormal regulation of gonado - tropin secretion in rats fed a low protein diet. *Endo - crinology*, 104: 438-42, 1979.
- GRAD, B. & LEBLOND, C.P. The necessity of testis and thy roid hormones for the maintenance of the serous tubules of the submaxillary gland in the male rat. *Endocrinolo gy*, 45: 250-66, 1949.
- GRENWAL, T.; MICKELSEN, O. & HAFS, H.D. Androgen secre - tion and spermatogenesis in rats following semistarva - tion. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 138(2): 723-7, 1971.
- GRESIK, E.W.; SCHENKEIN, I.; NOEN, H. & BARKA, T. Hormo - nal regulation of epidermal growth factor and protease in the submandibular gland of the adult mouse. *Endocri - nology*, 109(3): 924-9, 1981.
- GUERRA, M.O.; ALMADA, R.L. & PETERS, V.M. Temas de Embrio logia II. Morfologia comparada do túbulo seminífero: re visão retrospectiva. *Bol. Inst. Cienc. Biol. UFJF*, 30: 1-24, 1981.
- HIRAMATSU, M.; HATAKEYAMA, K. & MINAMI, N. Male mouse submaxillary gland secretes highly toxic proteins. *Expe rientia*, 36(8): 940-2, 1980.

- HIRATA, Y. & ORTH, D.N. Concentrations of epidermal growth factor, nerve growth factor and submandibular gland renin in male and female mouse tissue and fluids. *Endocrinology*, 105(6): 1382-7, 1979.
- HOFFMAN, H.; MCAUSLAN, B.; ROBERTSON, D. & BURNETT, E. An endothelial stimulating factor from salivary glands. *Expl. Cell Res.*, 102: 269-75, 1976.
- HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. *Non parametrical statistical methods*. New York, John Wiley, 1973. p. 71 e 219.
- HOSHINO, K. & LIN, C.D. Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effects on the hosts. *Anat. Rec.*, 160: 474-5, 1968.
- _____ & _____. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 47: 329-34, 1969.
- HUCKINS, C. Duration of spermatogenesis in pre- and post-puberal Wistar rats. *Anat. Rec.*, 151(3): 364, 1965.
- HUXLEY, J.C. Constant differential growth ratios and their significance. *Nature*, 114: 895-6, 1924.
- ISHII, D.N. & SHOOTER, E.M. Regulation of nerve growth factor synthesis in mouse submaxillary glands by testosterone. *J. Neurochem.*, 25(6): 843-51, 1975.

- ITO, Y. & ANOUMA, S. *J. pharm. Soc. Japan.*, 72: 1517 , 1952. *Apud* ITO, Y. Parotin: a salivary gland hormone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85: 228-310, 1960.
- ITO, Y. Parotin: a salivary gland hormone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85: 228-310, 1960.
- JACOBY, F. & IEESON, C.R. The post-natal development of the rat submaxillary gland. *J. Anat.*, 93: 201-15, 1959.
- JOHNSON, G.; KEKEH, J. & YAPI, M. Sur l'activité endocrine des glandes salivaires sous-maxillaires sensu-stricto de la souris. *Annls. Endocr.*, 31: 573-7, 1970.
- JUNQUEIRA, L.C.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M. & FRANKENTHAL, L. Biochemical and histological observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J. cell. comp. Physiol.*, 34: 129-58, 1949.
- KATAGIRI, S. & HIGASHIJO, T. Histologische studien über die einflüsse der speicheldrüsen-exstirpation auf die wirkung des geschlechtshormons. *Trans. Jap. path. Soc.* 30: 252-60, 1940. *Apud* SHAFER, W.G. & MUHLER, J.C. *Endocrine influences upon the salivary glands. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85: 215-27, 1960.
- KRUEGER, P.M.; HODGEN, G.D. & SHERINS, R.J. New evidence for the role of the Sertoli cell and spermatogonia in

- feedback control of FSH secretion in male rats. *Endocrinology*, 95(4): 955-62, 1974.
- LACASSAGNE, A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la souris. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 133: 180-1, 1940.
- _____ & CHAMORRO, A. Réaction de la testostérone de la glande sous-maxillaire atrophiée consécutivement à l'hypophysectomie chez la souris. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 134: 223-4, 1940.
- LAWRENCE, A. M.; TAN, S. HOJVAT, S. & KIRSTEINS, L. Salivary gland hyperglycemic factor: an extrapancreatic source of glucagon-like material. *Science*, 195: 70-3, 1976.
- LEBLOND, C. P. & CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55: 548-73, 1952.
- LEE, V. W. K.; DE KRETZER, D. M.; HUDSON, B. & WANG, C. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J. Reprod. Fert.*, 42(1): 121-6, 1975.
- LEVI-MONTALCINI, R. & ANGELETTI, P. U. Growth control of the sympathetic system by a specific protein factor. *Q.*

- Rev. Biol.*, 36(2): 99-108, 1961.
- LIN, C. D. & HOSHINO, K. Testosterone dependency of the lethal factor in mouse submandibular gland isografts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 47: 335-8, 1969.
- LISON, L. Variation de la basophilie pendant la maturation du spermatozoïde chez le rat et sa signification histo-chimique. *Acta histochem.*, 2: 47-67, 1955.
- LOUSSOUARN, D. Effects de l'exérèse des glandes sous-maxillaires sur la croissance du jeune mâle rat. *Revue Stomat.*, 73(8): 627-31, 1972.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; NAKANE, P. K. & PIERCE, G. Relationships between the submaxillary gland and the thymus. *Lab. Invest.*, 29(2): 266-71, 1973.
- MICHELAKIS, A. M.; COHEN, S.; TAYLOR, J.; MURAKAMI, K. & INAGAMI, T. Studies on the characterization of pure submaxillary gland renin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 147: 118-21, 1974.
- MUDD, B. D. & WHITE, S. C. Sexual dimorphism in the rat submandibular gland. *J. dent. Res.*, 54(1): 193, 1975.
- MUHLER, J. C. & SHAFER, W. Experimental dental caries. II. Effect of desalivation on dental caries and castration

and desalivation on fluorine storage in the rat. *J. dent. Res.*, 33: 346-56, 1954.

NARASIMHAN Jr, M.J. & GANLA, V.G. *Curr. Sci.*, 36: 266 , 1967. *Apud* NARASIMHAN Jr, M.J. & GANLA, V.V. The regulatory influence of the submandibular salivary gland growth. *Annls. Endocr.*, 29(5): 513-22, 1968.

_____ & _____. The regulatory influence of the submandibular salivary gland on growth. *Annls. Endocr.*, 29(5): 513-22, 1968.

NUNEZ, J.M.S. Effect of removal of submaxillary glands on the thyroid gland. *J. dent. Res.*, 49: 454, 1970.

OLIVER, W. J. & GROSS, F. Effect of testosterone and duct ligation on submaxillary renin-like principle. *Am. J. Physiol.*, 213(2): 341-6, 1967.

OSORIO, J.A. & KRAEMER, A. Stimulative effect of parotin on the body weight of sialoadenectomized rats. *Revta. bras. Biol.*, 25(3): 233-6, 1965.

PARMON, C.I.; BABES, A.E. & PETREA, I. *Endocrinologie des glandes Salivaires*. Bibliothèque Médical Editoria A cademei Republiciis Romine, 1957. *Apud* ARRANS, I. L. *An. esp. Odontoestomat.*, 34: 215-226, 1975.

PAULO, E. The effect of sialoadenectomy performed at va-

- rious periods of the postnatal life on the histological picture of testes in male rats. *Acta biol. cracov.*, 22 (2): 163-71, 1980.
- PLAGGE, J.C. The vital importance of salivary glands to newborn rats. *Am. J. Physiol.*, 124: 612-9, 1938.
- RAMALHO, A.C. Alterações testiculares em ratos sialoadenectomizados. Campinas, 1979. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Tese - Livre Docência.
- _____; AREAS, M.A.; MACIEL, R.E. & REIS, N.S. Estudo morfológico do testículo e epidídimo do rato sialoadenectomizado. *Reunião Anual da SBPC*, 35., Belém, 1983. *Anais*. (no prelo).
- REGAUD, M.C. Dégénérescence des cellules séminales chez les mammifères, en l'absence de tout état pathologique. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 52: 268-70, 1900.
- ROBERT, A.; DJAVAHERI-TEHRANI, K. & DELOST, P. Evolution de tube séminifère chez le cobaye au cours de la puberté. *C. R. Séanc. Soc. Biol.*, 172: 912-8, 1978.
- ROBERTS, M.L. Testosterone-induced accumulation of epidermal growth factor in the submandibular salivary glands of mice, assessed by radioimmunoassay. *Biochim. Pharmac.*, 23:3302-8, 1974.

SHAFER, W. G. & MUHLER, J. C. Effect of gonadectomy and sex hormones on the structure of the rat salivary glands. *J. dent. Res.*, 32: 262-8, 1953.

_____ ; CLARK, P. G. & MUHLER, J. C. The inhibition of the hypophysectomy-induced changes in the rat submaxillary glands. *Endocrinology*, 59: 516-21, 1956.

SREEBNY, L. M.; MEYER, J.; BACHEM, E. & WEINMANN, J. P. Restoration of enzymatic activity in the submaxillary gland of the hypophysectomized albino rat. *Endocrinology*, 60: 200-4, 1957.

TALBERT, G. B. & HAMILTON, J. B. The effect of reduced rate of growth on maturation of the male reproductive system of the albino rat. *Anat. Rec.*, 121: 763-73, 1955.

THOMAS, J. A. & HILL, M. F. Effect of salivariadenectomy upon gonadal activity in male rats. *Archs. oral Biol.*, 12: 92-3, 1967.

VIEILLEMARINTE, J. Effects de l'ablation bilatérale de la glande sous-maxillaire chez le souriceau mâle nouveau-né: action sur les testiculaires. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 162(10): 1749-52, 1968.

_____ Effets sur les testicules, de l'ablation totale des glandes sous-maxillaires sensu stricto chez des

souriceaux males nouveau-nés. *Annls. Endocr.*, 31: 538-47, 1970.

WAGNER, E. M.; BIXLER, D.; MUHLER, J. C. & SHAFER, W. G.
Nutritional studies on desalivated rats. *J. dent. Res.*,
39(4): 689-90, 1960.

Influência da extirpação cirúrgica das glândulas salivares sobre o crescimento corporal de ratos machos. Porto Alegre, 1961. Universidade do Rio Grande do Sul. Tese-livre docência.

WEIMAR, V. L. & HARAGUCHI, K. H. A potent new mesodermal growth factor from mouse submaxillary gland. A quantitative, comparative study with previously described submaxillary gland growth factors. *Physiol. Chem. Phys.*, 7(1): 7-22, 1975.

WEISSBACH, L. & IBACH, B. Quantitative parameters for light microscopic assessment of the tubule seminiferi. *Fert. Steril.*, 27(7): 837-47, 1976.