

ALTERAÇÕES TESTICULARES EM RATOS PRÉ-PÚBERES APÓS TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM DOXORUBICINA

Testicular alterations in pre-pubescent rats after subchronical treatment with doxorubicin

Cesar Souza Hisasi*

Danila Even Alvez Cortez*

Talita Pomin*

Juliana Silva Felix**

Suzana de Fatima Paccola Mesquita***

HISASI, Cesar Souza; CORTEZ, Danila Even Alvez; POMIN, Talita; FELIX, Juliana Silva; MESQUITA, Suzana de Fatima Paccola. Alterações testiculares em ratos pré-púberes após tratamento subcrônico com doxorubicina. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 19, p. 5-21, 2000.

Resumo: O objetivo desta pesquisa foi investigar, através da histomorfometria e estereologia, a ação da doxorubicina sobre a espermatogênese e fertilidade de ratos tratados na fase pré-púbere. A doxorubicina é um antineoplásico antraciclínico muito utilizado na quimioterapia. Quarenta ratos pré-púberes foram distribuídos em 8 grupos: 4 grupos tratados e 4 grupos controles. Os animais dos grupos tratados foram submetidos ao tratamento subcrônico com a administração, intraperitoneal, de 1 mg/Kg de peso corporal de doxorubicina, três vezes por semana, durante 6 e 8 semanas (GE6, GE8, GEA6 e GEA8). Os animais dos grupos controles receberam injeções intraperitoneais de 1mg/Kg de peso corporal de solução fisiológica, três vezes por semana durante 6 e 8 semanas (GC6, GC8, GCA6 e GCA8). Os animais dos grupos GC6, GC8, GE6 e GE8 foram sacrificados 3 dias após o término do tratamento enquanto os outros animais foram acasalados, individualmente, com duas fêmeas primíparas, durante 10 dias, 53 dias após o término do tratamento (GCA6, GCA8, GEA6 e GEA8), e, em seguida, sacrificados. Os testículos foram removidos, pesados, medidos seus eixos maior e menor e processados histologicamente. Os resultados obtidos mostraram que em nossas condições experimentais ocorreu atrofia testicular. Todos os parâmetros morfométricos e estereológicos (peso dos testículos, comprimento dos eixos maior e menor, volume testicular total, diâmetro dos túbulos seminíferos e volumes tubulares e de tecido intersticial) dos grupos experimentais mostraram reduções significativas quando comparados com os grupos controles. Estes resultados indicam que não há regeneração testicular das células da linhagem germinativa provavelmente devido à extensa mortalidade das células espermatogênicas em estádios iniciais do desenvolvimento e conseqüente depleção do epitélio seminífero.

Palavras-chave: Espermatogênese. Doxorubicina. Testículos.

* Estagiários do curso de Medicina Veterinária; ** Bolsista Iniciação Científica – UEL; *** Docente da disciplina de Embriologia do Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná.

INTRODUÇÃO

O tratamento do câncer com quimioterapia e radioterapia pode levar a danos no epitélio germinativo que resultam em oligospermia e azoospermia (JACKSON, 1964; MEISTRICH et al., 1978; ROESER; STOCKS; SMITH, 1978; LU; MEISTRICH, 1979; MEISTRICH, 1984, 1986; LUI et al., 1986; BECHTER et al., 1987; RUSSELL; RUSSELL, 1991; SAWADA; TAMADA; MORI, 1994; IMAHIE et al., 1995).

A falência gonadal, como conseqüência da quimioterapia em indivíduos adultos, interfere na auto-estima, na sexualidade e na qualidade de vida dos pacientes (MYERS; SHILSKY, 1992).

A doxorubicina é um dos agentes quimioterápicos mais importantes no tratamento de leucemias, tumores sólidos tais como carcinoma de mama e pulmão, linfomas e outras neoplasias humanas. Ela é um agente intercalante e induz alterações funcionais no metabolismo do DNA e RNA (DI MARCO; ARCAMONE; LUNINO, 1975). Além disso, inibe diretamente a Topoisomerase II, enzima que participa no mecanismo de quebra e de reunião das cadeias de DNA e RNA (VOET; VOET, 1990); induz mutação e aberrações cromossômicas em células normais e tumorais e, além disso, pode ser convertida em radicais livres por enzimas celulares (BEAN; ARMSTRONG; GALLOWAY, 1992; BENCHEKROUN; SINHA; ROBERT, 1992) e, finalmente, desencadeia o processo de morte por apoptose (ROTHMANN, 1988).

Os efeitos citotóxicos de drogas quimioterápicas em células espermatogoniais variam nos diferentes estádios de desenvolvimento conforme atestaram Lu e Meistrich (1979); Meistrich, Goldstein e Wyrobec (1985); GOULD e outros (1983); Hacker-Klom, Meistrich e Gohde (1986); LUI e outros (1986); Bechter e outros (1987); Generoso e outros (1989).

Russe e Russel (1991) que combinações de diversos quimioterápicos provocam azoospermia permanente em muitos pacientes e que alguns agentes são levemente tóxicos para as "Stem Cells" de camundongos sendo que sua recuperação pode ocorrer mesmo após o seu nível de sobrevivência ter sido reduzido a 1% ou 0,03%.

O epitélio seminífero é um dos tecidos que mais prolifera no corpo, sendo, portanto, alvo direto de drogas que atuam sobre a divisão celular. Por esta razão, ao interferir com o processo da espermatogênese, estas drogas podem induzir à esterilidade.

É muito importante conhecer o mecanismo de interferência de tais substâncias sobre a função testicular uma vez que a reversibilidade das alterações depende da interrupção do processo existente (NEUMANN, 1984).

Dados preliminares (MESQUITA, 1997) demonstraram que a administração de 1mg/Kg de peso corporal de doxorubicina, três vezes por semana, durante 2,4,6 e 8 semanas leva a um quadro de atrofia testicular dose-dependente, em animais adultos, que se inicia na 4ª semana de tratamento com doxorubicina. Imahie e outros (1995) constataram que 4 semanas de tratamento com a dose de 1mg/Kg e 2 mg/Kg de peso corporal de doxorubicina, uma vez por semana, já era suficiente para detectar efeitos da doxorubicina, especialmente em espermatogônias, um dos tipos celulares da linhagem espermatogênica. Generoso e outros (1989) observaram que a administração de altas doses de doxorubicina em camundongos adultos provoca diminuição na *performance* reprodutiva destes animais resultando em esterilidade permanente.

Considerando que a maior parte das alterações descritas ocorreram logo após o término do tratamento, tornou-se necessário avaliar se existe regeneração testicular, isto é, cessado o período de tratamento e, decorrido um tempo suficiente para que ocorra a renovação do epitélio seminífero, ocorre restabelecimento do processo de espermatogênese no rato.

Com este objetivo procurou-se realizar um estudo toxicológico abordando aspectos morfométricos e estereológicos comparativos entre testículos de animais jovens, submetidos experimentalmente ao tratamento subcrônico com doxorubicina.

MATERIAL E MÉTODOS

Doxorubicina (Adriblastina®) foi fornecida pelo laboratório Farmitália Carlo Erba, Rio de Janeiro e reconstituída em solução salina isotônica imediatamente antes da injeção dos animais.

Para a realização do trabalho foram utilizados 40 ratos Wistar, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Os animais foram distribuídos em 8 grupos (4 grupos tratados e 4 grupos controles) que foram submetidos ao seguinte esquema de tratamento (Quadro 1):

Esquema de tratamento dos grupos experimentais

Sacrifício (Dias após o tratamento)	Tratamento			
	<i>Injeção de 1mg/Kg, intraperitonealmente, três vezes por semana, durante 6 semanas.</i>		Injeção de 1 mg/Kg, intraperitonealmente, três vezes por semana, durante 8 semanas.	
	Doxorubicina	Solução Fisiológica	Doxorubicina	Solução Fisiológica
3 Dias	GE6	GC6	GE8	GC8
63 Dias	GEA6	GCA6	GEA8	GCA8

QUADRO 1:

GE = animais tratados com doxorubicina e sacrificados 3 dias após o término do tratamento

GEA = animais tratados com doxorubicina, acasalados 53 dias após o término do tratamento, com duas fêmeas primíparas, durante 10 dias e, em seguida, sacrificados.

GC = animais tratados com soro fisiológico e sacrificados 3 dias após o término do tratamento.

GCA = animais tratados com soro fisiológico, acasalados 53 dias após o término do tratamento, com duas fêmeas primíparas, durante 10 dias e, em seguida, sacrificados.

Os animais dos grupos GEA e GCA foram acasalados individualmente, durante 10 dias, com duas fêmeas primíparas, decorridos 53 dias do término do tratamento, para se avaliar sua capacidade reprodutiva após o tratamento com doxorubicina ou com soro fisiológico, respectivamente. Os animais dos grupos GE e GC foram submetidos ao tratamento com doxorubicina e sacrificados 3 dias após o último tratamento com a droga ou com solução fisiológica, respectivamente.

À época do sacrifício, os testículos de todos os animais foram removidos do escroto e seus pesos determinados. Seus eixos maiores e menores foram medidos com paquímetro e, a seguir, eles foram fixados em líquido de Bouin. Após a fixação, os testículos foram desidratados, diafanizados e embebidos em Paraplast. Posteriormente foram feitos cortes histológicos de 6 µm de espessura, corados com Hematoxilina e Eosina de Lison (HE) para análise ao microscópio de luz.

1 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA

A análise histomorfométrica consistiu na(o): 1- determinação dos pesos testiculares (em gramas) e dos com-

primentos dos eixos testiculares (em milímetros); 2- cálculo do volume testicular total, utilizando a fórmula: $VT = 4/3 \pi ab^2$, onde a é o semi-eixo maior e b é o semi-eixo menor (HAYASHI; CEDENHO, 1980; MIRAGLIA; HAYASHI, 1993); 3- determinação da média dos diâmetros dos túbulos seminíferos (em micrômetros) através da medida de 40 seções tubulares dos testículos de cada animal, escolhidos ao acaso, utilizando-se ocular morfológica acoplada ao microscópio binocular, em aumento final de 80 vezes.

O estudo estereológico consistiu no cálculo dos volumes dos tecidos básicos componentes dos testículos (túbulos seminíferos e tecido intersticial), em percentuais, com o auxílio da ocular integradora de 25 pontos (WEIBEL, 1963) acoplada ao microscópio óptico binocular. Os pontos foram contados em 40 campos das seções tubulares escolhidas ao acaso, num total de 1000 pontos, para cada testículo. Após o cálculo dos volumes médios testiculares totais determinou-se o volume do parênquima e do tecido intersticial com base na porcentagem de volumes obtidos através da técnica estereológica com auxílio da ocular integradora. A fertilidade dos animais foi avaliada através do índice de fertilidade definido como a relação da quantidade total da prole pelo número de fêmeas acasaladas.

Procedeu-se a análise de comparação entre os animais tratados e controles através do teste "t" de Student com níveis de significância (α) igual a 5%.

RESULTADOS

I DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA (FIGURA 1)

Os animais tratados por 6 semanas e sacrificados 3 dias após o término do tratamento com doxorubicina apresentaram grande número de seções tubulares com ampla redução de células da linhagem germinativa. As seções examinadas não apresentaram espermatogônias,

raros espermatócitos primários foram observados e houve redução na frequência de espermatídes jovens. Após o tratamento por 8 semanas e sacrifício 3 dias após o término do tratamento, os testículos dos animais tratados apresentaram a totalidade de seções tubulares com intensa vacuolização intratubular e contendo somente células de sustentação.

Os animais tratados por 6 e 8 semanas e sacrificados 63 dias após o término do tratamento mostraram a totalidade das seções tubulares desprovidas de células da linhagem germinativa, somente com células de sustentação e intensa vacuolização intratubular.

As células da Leydig exibiram morfologia normal ao microscópio de luz em todos os grupos analisados.

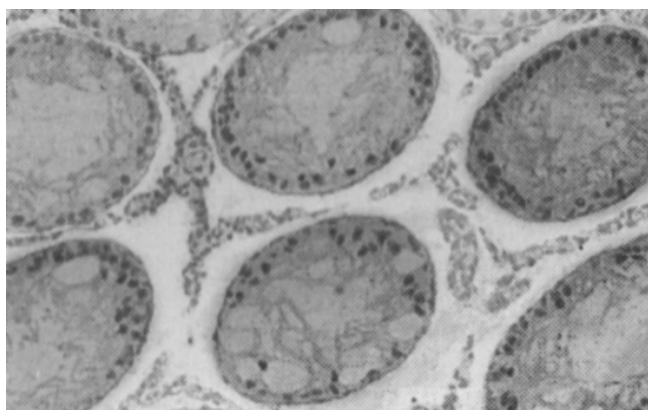


Figura 1: Túbulos seminíferos do testículo de animal tratado com doxorubicina por 8 semanas.

Notar intensa vacuolização e sertolização do epitélio seminífero. 250x HE.

II RESULTADOS MORFOMÉTRICOS E ESTEREOLÓGICOS

Em todos os grupos experimentais ocorreu uma redução significativa do diâmetro médio dos túbulos seminíferos, do volume total do testículo, do volume de parênquima testicular, do tecido intersticial e do peso testicular após o tratamento com doxorubicina. Observou-se que tais reduções foram sempre maiores nos animais sacrificados após 63 dias do término do tratamento (Tabela 1 e 2).

TABELA 1:

Morfometria testicular em ratos albinos dos grupos Controles (GC e GCA) e Experimentais (GE e GEA). Média \pm Desvio Padrão (n=5)

Grupos	Peso testicular (g)	Eixos (mm)		Volume Testicular (mm ³)
		Maior	Menor	
GE ₆	0,76 \pm 0,02*	14,4 \pm 0,59*	9,0 \pm 0,11*	640,59 \pm 61,40*
GC ₆	1,26 \pm 0,06	18,2 \pm 0,71	10,6 \pm 0,34	1076,16 \pm 80,73
GE ₈	0,41 \pm 0,04*	12,2 \pm 0,93*	8,2 \pm 0,19*	435,16 \pm 31,93*
GC ₈	1,55 \pm 0,08	20,5 \pm 1,42	11,8 \pm 0,04	1508,71 \pm 153,14
GEA ₆	0,60 \pm 0,16*	14,8 \pm 0,83*	6,4 \pm 0,54*	322,58 \pm 72,63*
GCA ₆	1,48 \pm 0,10	18,6 \pm 0,40	11,1 \pm 0,75	1156,32 \pm 83,82
GEA ₈	0,34 \pm 0,04*	12,1 \pm 0,60*	6,7 \pm 0,52*	270,63 \pm 50,02*
GCA ₈	1,58 \pm 0,15	21,8 \pm 1,47	13,4 \pm 1,67	1967,38 \pm 314,64

*p < 0,05

TABELA 2:

Morfometria e estereologia testicular em ratos albinos dos grupos Controles (GC e GCA) e Experimentais (GE e GEA). Média \pm Desvio Padrão (n=5).

Grupos	Diâmetro tubular (μ m)	Volume tubular (mm ³)	Volume intersticial (mm ³)
GE ₆	192,79 \pm 2,67*	434,4 \pm 49,82*	206,19 \pm 16,32*
GC ₆	248,75 \pm 9,49	839,98 \pm 62,16	243,18 \pm 22,23
GE ₈	135,73 \pm 6,62*	252,36 \pm 26,42*	182,80 \pm 10,90*
GC ₈	267,78 \pm 6,39	1056,19 \pm 91,86	452,51 \pm 62,51
GEA ₆	150,77 \pm 21,42*	192,54 \pm 45,96*	130,04 \pm 29,21*
GCA ₆	271,94 \pm 12,03	881,87 \pm 60,98	274,45 \pm 57,45
GEA ₈	121,58 \pm 3,73*	141,89 \pm 22,98*	128,74 \pm 28,23*
GCA ₈	304,3 \pm 12,47	1442,44 \pm 313,93	524,96 \pm 80,86

* p < 0,05

III FERTILIDADE DOS ANIMAIS

Após 53 dias do término do tratamento com doxorubicina e 10 dias de acasalamento, os animais não foram capazes de procriar.

DISCUSSÃO

A administração subcrônica de doxorubicina, em ratos, através de injeções intraperitoneais, 3 vezes por semana na dose de 1mg/Kg de peso corporal provocou atrofia testicular, diminuição do diâmetro médio dos túbulos seminíferos e redução na frequência dos diversos tipos celulares da linhagem espermatogênica. Este quadro de atrofia testicular é decorrente da grande hipoplasia do epitélio seminífero e a intensidade destes danos relaciona-se ao tempo de utilização da droga.

Em doses altas este fármaco ataca também as células tronco de reserva da linhagem espermatogênica conforme pôde-se constatar nos animais tratados por 8 semanas onde a totalidade dos túbulos seminíferos mostraram ausência de células da linhagem germinativa restando apenas células de Sertoli.

Lu e Meistrich (1979); Meistrich (1984, 1986); Bechter (1987) e Russel e Russel (1991) constataram que a ausência de células da linhagem germinativa é consequência da morte das células tronco de renovação, por ação da terapia citotóxica.

A depleção do epitélio seminífero, bastante acentuada nos animais sacrificados 63 dias após o término do tratamento, é, provavelmente, decorrente do fato de que a doxorubicina exerce sua ação sobre a topoisomerase II e DNA (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; OSHEROFF, 1989). A interferência da doxorubicina ocorre mais efetivamente nas espermatogônias em fases tardias (tipos β e intermediárias) que realizam a síntese de DNA pré-mitótico (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988) o que justificaria a redução de espermatogônias e espermatócitos nestes animais.

A alta sensibilidade das células do epitélio seminífero, principalmente em períodos tardios após o tratamento, é observada pela diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos ocasionada pela morte de grande quantidade destas células. A hipoplasia tubular é observada através da diminuição do percentual de volume tubular dos animais tratados.

A diminuição da população de células da linhagem germinativa repercutiu diretamente na fertilidade dos animais os quais não foram capazes de procriar.

CONCLUSÃO

Ratos machos albinos tratados subcronicamente com 1mg/Kg de peso corporal de doxorubicina na fase pré-púbere exibem, na fase adulta, atrofia testicular permanente. Esta atrofia é provocada pela severa hipoplasia do epitélio seminífero com redução no volume do parênquima testicular e na frequência de células da linhagem germinativa e é acompanhada por vacuolização e/ou sertolização do epitélio seminífero bem como pela redução progressiva dos diâmetros tubulares. As células intersticiais (de Leydig) e de sustentação (de Sertoli) não foram alteradas histologicamente. Uma vez cessado o tratamento, não ocorreu regeneração do epitélio seminífero com consequente infertilidade dos animais.

HISASI, Cesar Souza; CORTEZ, Danila Even Alvez; POMIN, Talita; FELIX, Juliana Silva; MESQUITA, Suzana de Fatima Paccola. Testicular alterations in pre-pubescent rats after subchronical treatment with doxorubicin. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 19, p. 5-21, 2000.

Abstract: The aim of this research was to investigate through the histomorphometric and stereological analyses the action of doxorubicin on the spermatogenesis and fertility of rats, which had been treated during their pre-pubescent phase. Doxorubicin is an anthracycline antineoplastic used mainly in chemotherapy. Forty pre-pubescent rats were divided into 8 groups: 4 treated and 4 control groups. The animals in the treated groups underwent subchronical treatment with intrap intraperitoneal injection of 1mg/Kg body weight of physiological sodium chloride solution 3 times weekly during 6 and 8 weeks (GC6, GC8, GCA6 and GCA8). The animals in the groups GC6, GC8, GE6 and GE8 were sacrificed 3 days after the end of the treatment while the other animals were mated individually with 2 primiparous rats over 10 days, 53 days after the end of the treatment (GCA6, GCA8, GEA6 and GEA8) then, immediately killed. The testes were removed, weighed, and their major and minor axes were measured and then were histologically processed. The obtained results show that in these experimental conditions, testicular atrophy occurs. All morphometric and stereological parameters (testes weight, length of greater and lesser testicular axes, total testicular volume, diameter of seminiferous tubules and volumes of seminiferous tubules and interstitial tissue) from experimental groups revealed significant reductions, when compared to the control groups data. These results indicate that there was no regeneration of germinative lineage cells probably due to the extensive mortality of spermatogenic cells at the early stage of development and consequent depletion of seminiferous epithelium.

Keywords: Spermatogenesis. Doxorubicin. Testes.

BEAN, C. I.; ARMSTRONG, M. J.; GALLOWAY, S.M. Effect of sampling time on chromosomal aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Res.**, n. 265, p. 31-44, 1992.

BECHTER, R.; HAEBLER, R.; ETTLIN, R. A.; HASEMAN, J. K.; DIXON, R. L. Differential susceptibility of immature rat testis to doxorubicin at critical stages of maturation. **Arch. Toxi col.**, n. 60, p. 415-21, 1987.

BENCHEKROUN, M. N.; SINHA, B. K.; ROBERT, J. Doxorubicin - resistant variants of rat glioblastoma cell lines. **FEBS Lett.** n. 322, p. 295-98, 1992.

DI-MARCO, A.; ARCARMONE, F.; ZUNINO, F. Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogues: Biological activity and mechanism of action. **Anti. bioti. cs.**, n. 3, p. 101-28, 1975.

- GENEROSO, M. M.; CAIN, K. T.; HUGHES, L. A.; FOXWORTH, L. B. A restudy of the efficacy of adriamycin in inducing dominant lethal in mouse spermatogonia stem cells. **Mut. Res.**, n. 226, p. 61-4, 1989.
- GOULD, S. F. et al. A rat model for chemotherapy- induced male infertility. **Arch. Androl.**, n. 11, p. 141-150, 1983.
- HACKER-KLOM, V. B.; MEISTRICH, M. L.; GÖHDE, W. Effect of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin mouse spermatogenesis. **Mut. Res.**, n. 160, p. 39-46, 1986.
- HAYASHI, H.; CEDENHO, A. P. Fertilizing capacity of cryptorchid rat. **J. Reprod. Fert.**, n. 59, p. 79-82, 1980.
- IMAHIE, H. et al. Effects of adriamycin, an anticancer drug showing testicular toxicity, on fertility in male rats. **J. Toxicol. Sci.**, n. 20, p. 183-193, 1995.
- JACKSON, H. The effects of alkalizing agents on fertility. **Br. Med. Bull.**, n. 20, p. 197-214, 1964.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Agentes antineoplásicos. In: _____. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 618-645, 1988.
- LU, C. C.; MEISTRICH, M.L. Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. **Cancer Res.**, n. 39, p. 3575, 1979.
- LUI, R.C. et al. Testicular cytotoxicity of intravenous doxorubicin in rat. **J. Urol.**, n. 136, p. 940-943, 1986.
- MEISTRICH, M. L. Stage specific sensitivity of spermatogonial to different chemotherapeutic drugs. **Biom. Pharmacol.**, n. 38, p. 137-142, 1984.
- MEISTRICH, M. L. Relationship between spermatogonial stem cells survival and testis function after cytotoxic therapy. **Br. J. Cancer**, n. 53, p. 89-101, 1986. Suppl. 7.
- MEISTRICH, M. L.; GOLDSTEIN, L. S.; WYROBEC, A. J. Long-term infertility and dominant lethal mutation in male mice treated with adriamycin. **Mut. Res.**, n. 152, p. 53-65, 1985.
- MEISTRICH, M. L. et al. Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. **Rad. Res.**, n. 74, p. 349-362, 1978.
- MESQUITA, S. F. P. **Índice de fertilidade e alterações testiculares de ratos submentidos ao tratamento subcrônico com doxorubicina**. 1997. Tese (Doutorado) — Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.
- MIRAGLIA, S. M.; HAYASHI, H. Histomorphometry of immature rat testis after heating. **J. Morphol.**, n. 217, p. 65-74, 1993.
- MYERS, S. E.; SHILSKY, R. L. Prospects for fertility after cancer chemotherapy. **Seminars in Oncology**, n. 19, p. 597-604, 1992.
- NEUMANN, F. Effects of drugs and chemicals on spermatogenesis. **Arch. Toxicol.**, n. 59, p. 109-117, 1984. Suppl. 7.
- OSHEROFF, N. Effects of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide. **Biochemistry**, n. 28, p. 6157-6160, 1989.
- ROESER, H. P.; STOCHS, A. E.; SMITH, J. Testicular damage due to cytotoxic drugs and recovery after cessation of therapy. **Aust. N. Z. J. Med.**, n. 8, p. 250-254, 1978.
- ROTHMANN, S. Fármacos antineoplásicos. In: FUCHS, F. D.; WANNAMACHER, Z. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 317-327.
- RUSSELL, L. D.; RUSSELL, J. A. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. **Am. J. Anat.**, n. 192, p. 142-168, 1991.
- SAWADA, T.; TAMADA, H.; MORI, J. Secretion of testosterone and epidermal growth factor in mice with oligospermia caused by doxorubicin hydrochloride. **Andrologia**, n. 26, p. 151-153, 1994.
- VOET, D.; VOET, G. J. Nucleic acid structure and manipulation. In: _____. **Biochemistry**. New York: John Willeg & Sons, 1990. p. 791-851.
- WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab. Invest.**, n. 12, p. 131-155, 1963.