

- Norair Salviano dos Reis -

CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DO  
TESTÍCULO DO GAMBÁ.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP, para obten-  
ção do grau de Mestre em Ciências.

Campinas, S.P.

1977

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*"Ninguém se engane a si mesmo:  
se alguém dentre vós se tem por sábio  
neste século, faça-se estulto para se  
tornar sábio.*

*Porque a sabedoria deste mun-  
do é loucura diante de DEUS; porquan-  
to está escrito:*

*Ele apanha os sábios na pró-  
pria astúcia deles.*

*E outra vez:*

*O Senhor conhece os pensamen-  
tos dos sábios,*

*que são pensamentos vãos".*

*I Corintios 3:18-20.*

*"Porque o Senhor dá a sabedo-  
ria; da sua boca vem a inteligênciã e  
o entendimento.*

*Porquanto a sabedoria entrará  
no teu coração e a inteligênciã será  
suave à tua alma".*

*Provérbios 2:6.10.*

DEDICO ESTE TRABALHO:

À minha esposa Mariza Ivete Nicola dos Reis,  
modelo de mulher, companheira e mãe, de cujo amor haurí esforços  
para encetar esta caminhada.

Aos meus filhos Alexandra, Adriana, Fabíola  
e Júnior, o melhor que pude fazer até agora.

A meus pais, exemplos de sacrifício, dedica-  
ção, trabalho e sabedoria.

A meus irmãos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Prof. Dr. Walter August Hadler, DD. Diretor do Instituto de Biologia, chefe, mestre e amigo, pela orientação e apoio cons  
tantes.

Ao Sr. Prof. Dr. Afonso Luiz Ferreira, amigo de longa data, pelo grande incentivo, ajuda e fornecimento de material.

Ao Sr. Prof. Dr. Francisco Gomes de Alcântara, pelas críticas e sugestões.

À Sra. Profa. Dra. Sineli Rita Silveira, pela deferência com que sempre nos tratou.

Aos demais Professores, pessoal técnico e administrativo do Departamento de Morfologia, Setor de Histologia e Embriologia.

Ao Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho, irmão querido cujos es  
forços sempre estiveram acima dos nossos e cujos interesses, sem  
pre abaixo.

À Sra. Abigail Vicente de Campos, pela solicitude.

À Sra. Maria Raimunda Ilma Banholati, pelo serviço de datilogra-  
fia.

nosso penhor e nossa gratidão.

## Í N D I C E

	Pág.
I. Introdução .....	1
II. Material e Métodos .....	10
III. Resultados .....	18
IV. Discussão .....	31
V. Resumo e Conclusões .....	39
Referências Bibliográficas .....	42

I. INTRODUÇÃO

A caracterização morfo-funcional das células intersticiais do testículo é motivo de controvérsias (STIEVE, 1930; HOOKER, 1944; MONTAGNA & HAMILTON, 1951; BAILLIE, 1961; MANCINI *et al.*, 1963). Não obstante tais desacordos, especialmente quanto à caracterização citoquímica desta heterogênea população celular, ao nível da microscopia óptica, passou-se a analisar a ultraestrutura celular ao microscópio eletrônico. A ausência de base histofisiológica segura e capaz de identificar os diferentes tipos celulares do interstício do testículo, decorre possivelmente, do uso de técnicas histoquímicas inadequadas para este estudo, conforme sugere BAILLIE (1961).

São conhecidos dois padrões etários para as células do interstício do testículo: o fetal e o pós-natal, este último constituído de dois períodos, o pré-púbere e o púbere. Am-

bos os padrões foram caracterizados em diversas espécies animais, tais como: no coelho (ALLEN, 1904; GONDOS et al., 1975) no porco (BASCOM & OSTERUD, 1927), no touro (HOOKER, 1944), no rato (ROOSEN-RUNGE & ANDERSON, 1959), no camundongo (BAILLIE, 1961), no hamster (GONDOS et al., 1974) e no homem (GILLMAN, 1948 ; SNIFFEN, 1950; MANCINI et al., 1963).

Após a puberdade, no interstício do testículo há vários tipos de células qualificados de acordo com algumas características morfológicas, citoquímicas e funcionais (STIEVE, 1930). Dentre estes tipos celulares, os mastócitos, os macrófagos e as células de Leydig são melhor caracterizáveis. Os demais são, prudentemente, denominados células "tipo fibroblasto" ou fusiformes, o que evidencia a grande dificuldade na sua caracterização. Dentre estas também estão colocadas células com os caracteres de secretoras, cuja morfologia é bastante heterogênea, em uma mesma espécie animal (SNIFFEN, 1950; MANCINI et al., 1963). Também pertencem a este grupo, fibroblastos verdadeiros (STIEVE, 1930 ; HOOKER, 1944), células de Leydig imaturas (MONTAGNA & HAMILTON, 1951; MANCINI et al., 1952; FAWCETT & BURGOS, 1960; MANCINI et al., 1963) e células mesenquimais (HOOKER, 1944; CHRISTENSEN & FAWCETT, 1961; GONDOS et al., 1975).

Há mais de setenta anos tentou-se caracterizar através da morfologia e da afinidade tintorial, as células inters



ticiais do testículo, e classificá-las em diferentes tipos. Assim, foram descritas células com núcleo excêntrico, tendo o citoplasma perinuclear condensado e o citoplasma periférico vacuolizado em um dos tipos e filamentosos em outro no terceiro tipo são incluídas células semelhantes às anteriores, diferindo apenas pela presença de grânulos citoplasmáticos acidófilos (WHITEHEAD, 1905).

SNIFFEN (1950) assinala, no interstício do testículo pós-puberal os seguintes tipos de células:

a) Células pequenas, que foram denominadas de células de Leydig imaturas as quais são poligonais, com fina granulação acidófila no citoplasma;

b) Células poligonais de tamanho médio, com citoplasma granular, às vezes, contendo grânulos grosseiros;

c) Células de tamanho médio, com abundância de grânulos grosseiros, frequentemente, reunidos em grumos, além de grânulos de pigmento estão presentes no citoplasma, em relativa quantidade; são comuns vacúolos que, ocasionalmente, aparecem em número tal que dão ao citoplasma uma aparência espumosa; estas células seriam células de Leydig em degeneração;

d) Células grandes ou células de Leydig maduras, com citoplasma finamente granular ao redor do núcleo e uma zona periférica clara, contendo gotículas, vacúolos e grânulos grosseiros e de pigmento.

e) Células fusiformes pequenas, na maioria das vêzes com o citoplasma repleto de pigmento, as quais foram inter-pretadas como células em involução.

TILLINGER et al. (1955) adotaram a mesma classificação de SNIFFEN (1950). Uma classificação mais simples considera dois tipos celulares: as células fusiformes pequenas e as grandes, arredondadas ou poligonais, as quais seriam rotuladas, respectivamente, de formas imaturas, ou jovens, e formas maduras das células de Leydig (FAWCETT & BURGOS, 1960). As células de Leydig jovens apresentam núcleo oval e homogeneamente basófilo; o citoplasma é P.A.S. negativo. As células de Leydig maduras mostram núcleo arredondado e vesicular, menos basófilo; o citoplasma é espumoso, e fraco, ou moderadamente, P.A.S. positivo. Além disso, são consideradas as células de Leydig em degeneração, que apresentam núcleo vesiculoso ou crenado; o citoplasma é, frequen-temente P.A.S. positivo; algumas vezes o núcleo é picnótico e o citoplasma escasso (CLEGG, 1965).

O estudo citológico e citoquímico das células de Leydig, realizado por MANCINI et al. (1963), permitiu separar di-versos tipos de fibroblastos (com diferentes graus de maturação), das células de Leydig, assim como estabelecer vários tipos entre estas últimas. Consideraram as seguintes células "tipo fibroblas-to":

a) Fibroblasto A: com núcleo redondo, cromatina pálida e um pequeno nucléolo; citoplasma escasso, basófilo e com prolongamentos, que não contém lípidos e reage negativamente ao P.A.S., às reações para mucopolissacarídeos e para o ácido ascórbico.

b) Fibroblasto B: de forma arredondada ou ovalada, com prolongamentos citoplasmáticos curtos e numerosos; exibe fra<sup>ca</sup> basofilia perinuclear e reage negativamente aos testes histoquímicos citados; o núcleo apresenta delgada carioteca, cromatina finamente granular e um pequeno nucléolo.

c) Fibroblasto C: exibe núcleo com carioteca espessada, cromatina grosseira e nucléolo, às vezes, circundado por uma vesícula clara; o citoplasma perinuclear é granular fino, basófilo e apresenta pequena quantidade de lípidos e vitamina C; apresenta prolongamentos.

d) Fibroblasto D: é semelhante ao fibrócito do tecido conjuntivo. Apresenta as variedades D<sub>1</sub>, com núcleo pálido, cromatina em finos grânulos e, frequentemente, um pequeno nucléolo; e, D<sub>2</sub>, com núcleo alongado e cromatina compacta.

Descreveram ainda dois tipos de células de Leydig, o fetal e o adulto, ambos com tres sub-tipos distintos. No tipo fetal consideram:

1) Células pequenas e bem delimitadas, cujo núcleo contém cromatina granular fina e pequeno nucléolo; o cito -

plasma é fracamente acidófilo, comumente com numerosos grânulos e moderada basofilia perinuclear.

2) Células maiores e poliédricas, com núcleo dotado de cromatina espessa e nucléolo proeminente; o citoplasma é fracamente acidófilo e contém pequenos grânulos perinucleares; alguns vacúolos localizam-se na periferia da célula; basofilia fraca, gotículas de lípidos e colesterol são detectadas, por todo o citoplasma; grânulos P.A.S., positivos resistentes à amilase salivar e ao clorofórmio-metanol, são ocasionalmente encontrados:

3) O terceiro sub-tipo engloba a maior célula desta série; apresenta núcleo picnótico; no citoplasma não há grânulos, nem acidofilia, enquanto que os vacúolos periféricos são grandes e numerosos; a basofilia é fraca e a quantidade de lípidos e colesterol é pequena.

As células de Leydig do tipo adulto apresentam os seguintes sub-tipos:

1) Células com forma poligonal ou arredondada, citoplasma finamente granular e acidófilo; o núcleo é, geralmente, pequeno, com carioteca espessa e cromatina abundante, além de grande nucléolo; o citoplasma apresenta basofilia perinuclear, gotículas de lípidos, reação positiva para o colesterol e para a vitamina C, além de reagir, moderadamente, quando são usadas técnicas para algumas enzimas, tais como: lipase, 3- $\beta$ -01-desidro

genase, citocromo-oxidase, desidrogenase succínica, esterase e leucil-aminopeptidase. Por outro lado, não apresentam fosfatase ácida, 5-nucleotidase, fosfamidase, glicose-6-fosfatase, fosforilase e fosfate alcalina.

2) Células grandes, poliédricas, com citoplasma - menos acidófilo que as do tipo anterior e com pequenos vacúolos periféricos; núcleo com carioteca espessa e um ou dois nucléolos; no citoplasma há forte sudanofilia e reação positiva para o colesterol; basofilia e reação para o ácido ascórbico de pequena intensidade; o conteúdo enzimico é o mesmo que o da célula do sub-tipo anterior; pigmentos e grânulos P.A.S. positivos, resistentes à diastase e ao clorofórmio-metanol, às vezes, estão presentes.

3) O último sub-tipo engloba células maiores, com núcleo picnótico ou, com a carioteca compactada; citoplasma parcial ou totalmente vacuolizado; há lípidos no citoplasma, mas as demais reações histoquímicas citadas dão resultado negativo, ou fracamente positivo.

Além destes tipos, foram assinaladas células em vários graus de degeneração, bem como formas de transição.

Cabe ressaltar, no tecido intersticial do testículo um tipo especial de célula, cuja característica principal é a argentofilia, por isso denominada célula argentófila do tecido

intersticial do testículo (HADLER & GONÇALVES, 1965a). As células argentófilas apresentam prolongamentos que se relacionam com os das células vizinhas de modo que constituem uma rede situada no interstício dos túbulos, em cujas malhas estão situadas as células de Leydig. As células argentófilas coram-se pelo azul de Alcian, após oxidação pelo permanganato de potássio em meio ácido. Em trabalhos posteriores, HADLER *et al.* (1968) mostraram que a coloração pelo azul de Alcian, após oxidação pelo permanganato de potássio em meio ácido, indica a presença de  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróide, dentre os quais está o colesterol.

Os fatos expostos mostram discordâncias quanto à classificação das células do tecido intersticial do testículo, relacionadas, principalmente, com os critérios adotados pelos diversos autores. Sintetizando os resultados dos trabalhos que foram anteriormente citados, devem ser considerados os seguintes tipos celulares, no interstício do testículo:

1) Mastócitos: facilmente caracterizáveis através de suas propriedades citoquímicas.

2) Macrófagos: ou células argentófilas, que podem ser bem definidas, através da argentofilia e da atrocitose.

3) Células fusiformes, do tipo fibroblasto, cujos caracteres morfológicos quando não correlacionados com outras propriedades histoquímicas e funcionais, são insuficientes para a sua identificação precisa.

4) Células secretoras, ou de Leydig, caracterizadas pela reatividade histoquímica, que revela a presença de lípidos, esteróides, vitamina C e diversas enzimas.

O emprego de novas técnicas histoquímicas poderá propiciar novos elementos para a caracterização dos tipos celulares do tecido intersticial do testículo. Levando em consideração esta possibilidade, empreendemos o presente trabalho, optando pelo estudo dos tipos celulares em uma espécie animal de nossa fauna, que se caracteriza pela abundância de células intersticiais no testículo. Portanto, a finalidade deste trabalho é a de procurar estudar, através de reações histoquímicas que caracterizam os  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides e  $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides, reação do ferricianeto férrico, todas aliadas à reação do P.A.S. e à argento-filia, os tipos celulares do tecido intersticial do testículo do gambá (Didelphis azarae).

II. MATERIAL E METÓDOS



Foram utilizados testículos de 10 gambás (Didelphis azarae, TEMMINCK, 1825) adultos jovens, obtidos no período compreendido entre os meses de julho a setembro, colhidos da seguinte maneira: após o sacrifício do animal, efetuado por concussão cerebral, ou inalação com éter etílico, os testículos foram retirados e colocados em uma das seguintes soluções fixadoras: formalina a 10%, líquido de Bouin, formol-cálcio (solução de formalina a 15%, contendo 3% de cloreto de cálcio anidro), ou formol-salina (solução de NaCl a 0,9%, 90 ml e formol neutro, 10 ml). Duas horas após o início da fixação, os órgãos foram dissecados, isolados dos tecidos adjacentes e novamente imersos no fixador, por mais duas horas. Findo esse prazo, foram efetuadas pequenas incisuras na albugínea, de modo a permitir melhor penetração do fixador no interior do testículo e, por fim, os órgãos foram recortados e os fragmentos, outra vez, mergulhados no fixador. O

tempo total de fixação variou entre 48-72 horas.

As peças fixadas nas soluções de formalina a 10%, ou líquido de Bouin, ou formol-cálcio, ou formol-salina, destinaram-se à inclusão em parafina e foram cortadas com 6µm de espessura; algumas peças fixadas em formol-cálcio foram usadas para microtomia de congelação e seccionadas na espessura de 10µm.

Para o estudo histológico geral, em cortes do material incluído em parafina foram realizadas as seguintes colorações histológicas: hemalume-eosina e tricrômico de Masson.

Para o estudo histoquímico foi processada uma das seguintes reações, em cortes de material incluído em parafina:

01) Evidenciação de grupos redutores:

a) Reação do ferricianeto férrico, segundo ADAMS (1956).

b) Tratamento pelo reativo de Schiff, durante 10 minutos, seguido de três banhos em solução de bissulfito de sódio a 0,5%, com três minutos de duração cada banho; lava - gem em água e montagem.

02) Bloqueio de grupos sulfidrilos (S-H): os cortes histológicos foram tratados, previamente, por solução aquosa saturada de bicloreto de mercúrio, durante 6 ou 42 horas, à tem-

peratura de 67°C, e submetidos à reação do ferricianeto férrico.

03) Evidenciação de grupos vic-glicólicos, pela reação do P.A.S. Foi efetuada segundo a técnica de McMANUS (1946), modificada por HOTCHKISS (1948); contraste nuclear pelo hemalume.

04) Verificação da presença de glicogênio: cortes histológicos foram, previamente, submetidos à digestão enzimica e em seguida, foi efetuada a reação do P.A.S., empregando-se para tal fim:

a) Amilase salivar, durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

b) Solução aquosa a 1% de taka-diaastase, durante 30 minutos, à temperatura de 37°C, segundo PEARSE (1961).

05) Extração de lípidos, efetuada pelas seguintes técnicas:

a) Cortes histológicos foram tratados por solução de desoxicolato de sódio a 2%, durante 8 horas, à temperatura de 47°C.

b) Cortes histológicos foram tratados por mistura de clorofórmio-metanol (1:1), durante 6 horas, à temperatura de 47°C.

Após a extração foi feita a reação do P.A.S.

06) Evidenciação de substâncias basófilas: Foi usada solução de azul de toluidina a 0,1% e azul de Alcian 0,5%,

em solução tampão de ácido oxálico-oxalato de sódio 0,1M, em pH 4,5. O tempo de coloração foi de duas horas para o azul de Alcian e de 15 minutos para o azul de toluidina.

07) Detecção de grupos  $\alpha$ -amino: efetuada pela técnica da ninhidrina-Schiff, ou aloxana-Schiff, conforme YASUMA & ICHIKAWA (1953).

08) Evidenciação de lípidos:

a) Lípidos totais, foram demonstrados pela técnica do negro de Sudan B, solução saturada em álcool 60°C, conforme LISON (1960).

b) Esteróides:

b.1. Colesterol livre e compostos afins ( $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides), conforme HADLER *et al.* (1968): oxidação dos cortes histológicos por ácido peracético, preparado conforme GREENSPAN (1946), modificado por LILLIE (1954), durante duas horas, à temperatura ambiente; lavagem em água, durante 10 minutos e coloração por solução de azul de Alcian a 1%, em pH 0,5 (solução em  $H_2SO_4$  2N), durante duas horas. Contraste de fundo opcional pelo reativo de Schiff, conforme item 01, b.

b.2. Colesterol esterificado: tratamento dos cortes histológicos por solução de KOH,

0,1M, durante 6 horas, à temperatura de 47°C; coloração conforme item 09,b.1.

b.3. Vitamina D, conforme HADLER & SILVEIRA (1977): oxidação dos cortes histológicos por mistura de partes iguais de solução de  $\text{KMnO}_4$  0,038N e NaOH 0,125N, durante 20 minutos; descoramento dos cortes por solução de bissulfito de sódio a 5% (30 a 60 segundos); lavagem em água, durante 5-10 minutos e coloração por solução de azul de Alcian a 1%, pH 0,5 (solução em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N), durante duas horas. Contraste de fundo opcional com reativo Schiff, conforme item 01,b.

b.4.  $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides:

b.4.1. Técnica de HADLER & SILVEIRA (1977): oxidação dos cortes histológicos por ácido fosfomolibdico a 2%, durante 20 minutos; lavagem prolongada em água amoniacal e coloração por solução de azul de Alcian a 1%, pH 0,5 (solução em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N); contraste de fundo por eosina a 0,5%, durante 5 minutos.

b.4.2. Reativo de Draggendorf, modifi

cado por SKIPSKI et al. (1962), que consiste de: solução A: 1,7g. de sub-nitrato de bismuto, 100ml de ácido acético a 20%; solução B: 40g. de iodeto de potássio, 100ml de água distilada; no momento de uso misturar: 4 ml da solução A, 1ml da solução B e 15ml de ácido acético a 20%. O reativo de Draggendorf, usado na evidenciação de colina, foi testado quanto à seletividade em modelos de papel de filtro, verificando-se que revela colina livre, não revela colina ligada, e evidencia também alguns hormônios, dentre os quais os  $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides. Este reativo foi aplicado a cortes histológicos por HADLER & ZITI (1977), de acordo com a técnica descrita a seguir: coloração pelo reativo de Draggendorf, durante 40 minutos, lavagem rápida em ácido acético a 0,5% , lavagem rápida em iodeto de potássio a 0,5% em ácido acético a 20%, lavagem rápida em ácido acético a 0,5%, lavagem em água distilada, desidratação e

montagem.

b.5. Testoterona e estrógenos, conforme a técnica de Liebermann-Buchardt, variante de LEWIS & LOBBAN (1961).

c) Fosfolípidos:

c.1. Técnica do ácido fosfomolibdico-tioglicólico (AFMTG), conforme HADLER & ZITI (1969b).

c.2. Reação da hidroxilamina-prata, conforme HADLER & ZITI (1969b).

09) Demonstração de vitamina E, conforme a técnica de HADLER & SILVEIRA (1977): oxidação dos cortes histológicos por ácido perfórmico, recentemente preparado, durante duas horas; lavagem em água e coloração por solução de azul de Alcian a 1%, em pH 0,5 (solução em  $H_2SO_4$  2N), durante duas horas. Contraste de fundo opcional com reativo de Schiff, conforme ítem 01,b.

10) Evidenciação do grupo sulfato, conforme HADLER *et al.* (1970).

11) Demonstração do grupo fosfato, conforme HADLER *et al.* (1977).

12) Evidenciação do ion fêrrico, pela reação do azul da Prússia, conforme HADLER *et al.* (1965b).

13) Detecção topoquímica de catalases: realizada em material seccionado por microtomia de congelação; foi efetuada a demonstração da atividade catalásica, conforme técnica de

HADLER *et al.* (1969a), estudada quanto à especificidade por SILVEIRA (1974).

14) Com a finalidade de melhor correlacionar a reatividade histoquímica dos diferentes tipos celulares do tecido intersticial do testículo, foram feitas as seguintes reações histoquímicas, em sequência:

- a) Vitamina D + P.A.S.
- b)  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides + P.A.S.
- c) Vitamina E + P.A.S.

15) Argentofilia: efetuada conforme técnica de RIO HORTEGA (1919), modificada por HADLER (1962).

Além disso, a argentofilia após descoloração pelo lugol, foi seguida da reação do P.A.S. + hemalume, o que permitiu correlacionar os resultados das duas técnicas. Com esta finalidade, cortes histológicos foram impregnados pela prata; foi escolhido um campo e fotografado; a prata precipitada foi removida, por tratamento com a seguinte solução: iôdo 1,0g, iodeto de potássio 2,0g e água destilada 100ml. No mesmo corte histológico foi efetuada a reação do P.A.S. e contraste nuclear pelo hemalume. Foi fotografado o mesmo campo que o fôra na argentofilia.



III. R E S U L T A D O S

Os resultados fornecidos pela reação do P.A.S., em cortes histológicos de testículos de gambás adultos jovens, distinguem dois grupos de células: células P.A.S. positivas, esparsas, situadas entre células P.A.S. negativas. As primeiras são geralmente, células grandes, globosas, poliédricas ou irregulares, com núcleo grande, globoso ou alongado, central ou excêntrico, com cromatina em finos grânulos, de tamanho uniforme, não aderentes à carioteca e homoganeamente distribuídos; os nucléolos (um ou dois) são bem proeminentes; o citoplasma é abundante, apresenta-se corado em rosa e, geralmente, contém material granular reativo ao P.A.S.

As células P.A.S. positivas apresentam distribuição em rede, no tecido intersticial do testículo (Figura 1). As células P.A.S. negativas ocupam as malhas da rede.

A morfologia dos grânulos P.A.S. positivos, presentes no citoplasma, se apresenta como fina granulação, ou granulação grosseira e esférica os quais caracterizam dois sub-tipos de células (Figura 2). As células dotadas de granulação podem apresentar vários graus de vacuolização no citoplasma. As granulações podem estar situadas difusamente, em todo o citoplasma, ou ocupar um dos polos da célula, permanecendo o outro livre de grânulos.

Tentativas para determinar a natureza do material P.A.S. positivo, efetuadas através dos pré-tratamentos com a amilase salivar, diastase, desoxicolato de sódio e metanol-clorofórmio, revelaram, após estes pré-tratamentos, apenas pequena diminuição da intensidade da reação, sem haver remoção do material P.A.S. positivo. Dentre os pré-tratamentos, o com desoxicolato de sódio foi o que mais afetou o material P.A.S. positivo, entretanto ele não removeu as granulações. A amilase salivar e a diastase não promoveram extração do material P.A.S. positivo. A ação do clorofórmio-metanol é menor quando comparada com a do desoxicolato de sódio. Estes resultados revelam que o material P.A.S. positivo não é constituído por glicogênio, nem por lípidos livres ou fracamente ligados com proteínas.

As reações da ninhidrina-Schiff e da aloxana-Schiff, que apresentam fraca intensidade na generalidade das cé-

lulas do tecido intersticial, são mais intensas em granulações - que possuem as mesmas características morfológicas dos grânulos P.A.S. positivos. Este resultado revela que as referidas granulações contêm proteínas.

A reação do ferricianeto fêrrico revela grânulos que se coram em azul, os quais são grosseiros e semelhantes aos grânulos P.A.S. positivos grosseiros. Esta reatividade não é afetada pelo bloqueio com o bicloreto de mercúrio. Estes resultados revelam que estes grânulos contêm uma substância redutora, destituída de grupos sulfidrila. Esta substância redutora é Schiff negativa.

A técnica do negro de Sudán B mostra que grânulos, semelhantes aos P.A.S. positivos, principalmente, os grânulos - grosseiros, são sudanófilos. A referida semelhança diz respeito tanto à morfologia quanto à disposição dos grânulos no interior da célula, e, também, à forma das células que os contêm. Os resultados fornecidos pelo negro de Sudán B, revelam a presença de lípidos nos referidos grânulos.

As reações para demonstração de vitamina D, de tocoferol e de colesterol e compostos afins, apresentam-se positivas em células esparsas, dispostas em rede. A reação positiva ocorre em grânulos finos situados dentro do citoplasma. Através

de colorações duplas (vitamina D + P.A.S., tocoferol + P.A.S. e  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides + P.A.S.) foi possível demonstrar, no citoplasma de uma mesma célula, ao lado de grânulos finos tocoferol positivos, ou vitamina D positivos, ou  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides positivos, grânulos P.A.S. positivos grosseiros (Figura 3). Esses resultados revelam que as mesmas células que contêm material P.A.S. positivo contêm colesterol e substâncias afins, vitamina D e tocoferol.

A impregnação argêntica revela a presença de células argentófilas, com corpo volumoso e irregular, que apresentam prolongamentos. Estes elementos celulares dispõem-se em rede, semelhante àquela formada pelas células P.A.S. positivas (Figuras 4 e 5). Quando se efetua a impregnação argêntica e o corte histológico, após ser fotografado (Figura 6) é descorado por solução de lugol e submetido à reação do P.A.S. e novamente fotografado, no mesmo campo microscópico (Figura 7), a comparação das duas figuras revela que as células argentófilas são P.A.S. positivas. No entanto, são frequentes células P.A.S. positivas que não são argentófilas. Desta maneira, foi possível demonstrar dois tipos de células: células argentófilas e P.A.S. positivas e células não argentófilas P.A.S. positivas.

Por outro lado, a reação do ferricianeto férrico, é fortemente positiva em células que têm as seguintes caracterís

ticas morfológicas: núcleo grande, esférico ou ligeiramente elíptico, cromatina granular fina e uniformemente dispersa, o que confere aspecto pálido ao núcleo; pequeno nucléolo bem visível; citoplasma com contornos nítidos, geralmente amplo e livre de qualquer inclusão ou pigmento. Estas células reúnem as características morfológicas das células de Leydig (Figura 8) e, de acordo com o volume do citoplasma, podem ser agrupadas nos seguintes sub-tipos:

1) Células grandes, com citoplasma amplo, finamente granular e homogeneamente reativo ao ferricianeto férrico (célula A, figura 8), que às vezes apresentam vacúolos no citoplasma (célula C, figura 8).

2) Células menores, citoplasma restrito a um halo perinuclear e homogeneamente reativo ao ferricianeto férrico (célula B, figura 8).

O pré-tratamento pelo bicloreto de mercúrio de -- mostra pequena diminuição da intensidade da reação, nos dois sub-tipos de células anteriormente descritas (Figura 9).

Os lípidos, demonstrados pelo negro de Sudan B, são abundantes nas células com as características das células de Leydig, sendo, no entanto, mais sudanófilas as células grandes.

As reações para demonstrar  $\Delta^4$ -esteróides são posi

tivas nas células de Leydig. Assim, a reação do ácido fosfomolibdico-azul de Alcian mostra resultados semelhantes aos da reação do ferricianeto fêrrico, evidenciando os mesmos sub-tipos celulares (Figura 10). O tratamento com o reativo de Draggendorf apresenta resultados positivos nas células com as características morfológicas das células de Leydig. O reativo de Draggendorf demonstra a estrutura finamente granular do citoplasma das células que têm as características das células de Leydig ou produtoras dos esteróides hormonais (Figura 11). Imagens semelhantes são fornecidas pela reação de Liebermann-Buchardt, variante de LEWIS & LOBBAN (1961), embora haja prejuízo na interpretação dos resultados desta reação, devido a difusão que ocorre.

Os resultados fornecidos pelas reações do ácido fosfomolibdico-tioglicólico e da hidroxilamina-prata são positivos apenas nas células com as características morfológicas das células produtoras de esteróides hormonais, mostrando a presença de lípidos dotados de colina.

A reação para demonstrar atividade catalásica revelou-se intensamente positiva nas células com as características de produtoras de hormônios e negativa nas demais células do tecido intersticial do testículo (Figura 12).

As reações da benzidina, usadas na demonstração

de grupos sulfato e fosfato, mostraram-se negativas em todos os tipos de células do tecido intersticial do testículo. Igualmente negativo é o resultado da reação do azul da Prússia, para demonstrar o íon fêrrico. A coloração por solução de azul de toluidina revelou resultados negativos nas células intersticiais do testículo.



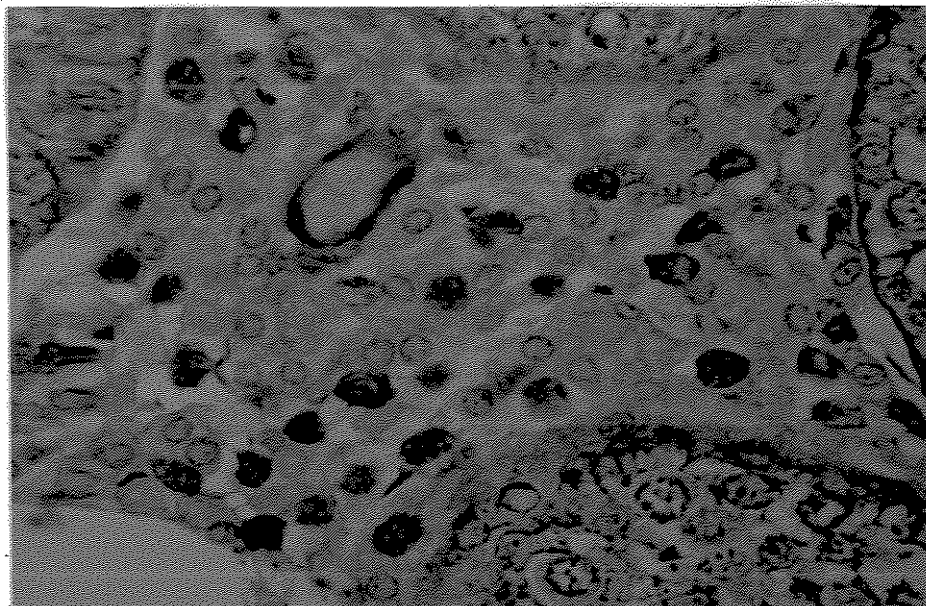


Figura 1.

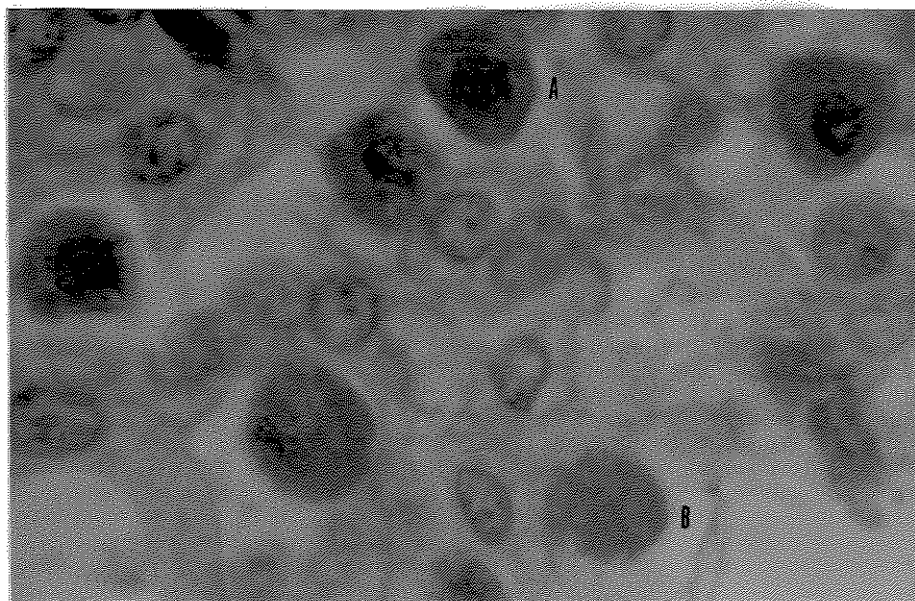


Figura 2.

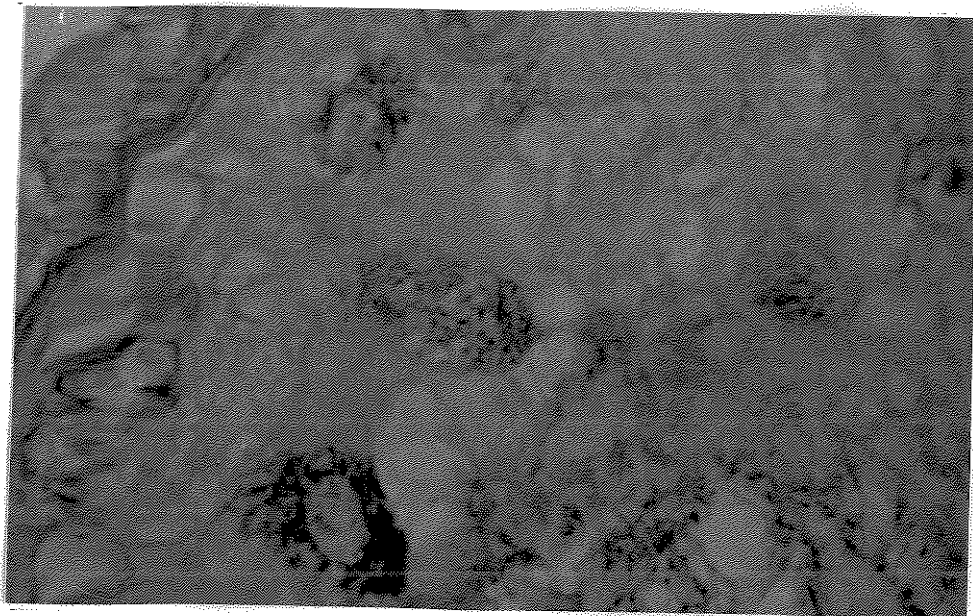


Figura 3.

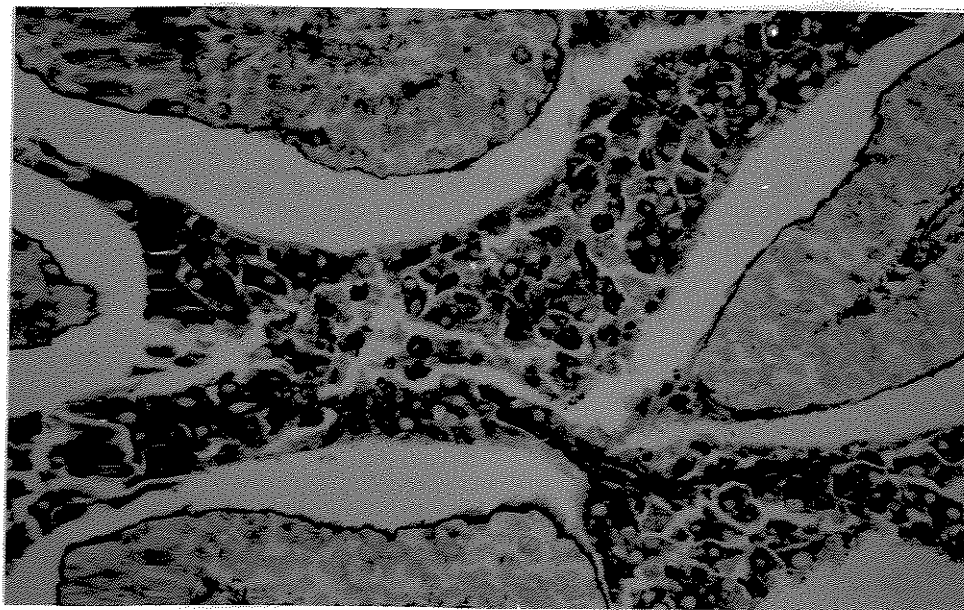


Figura 4.

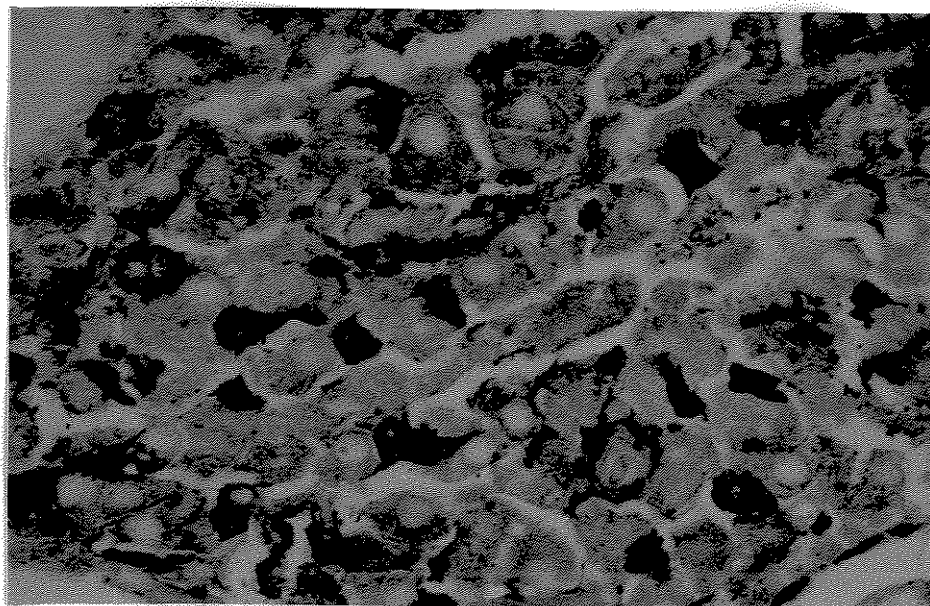


Figura 5.

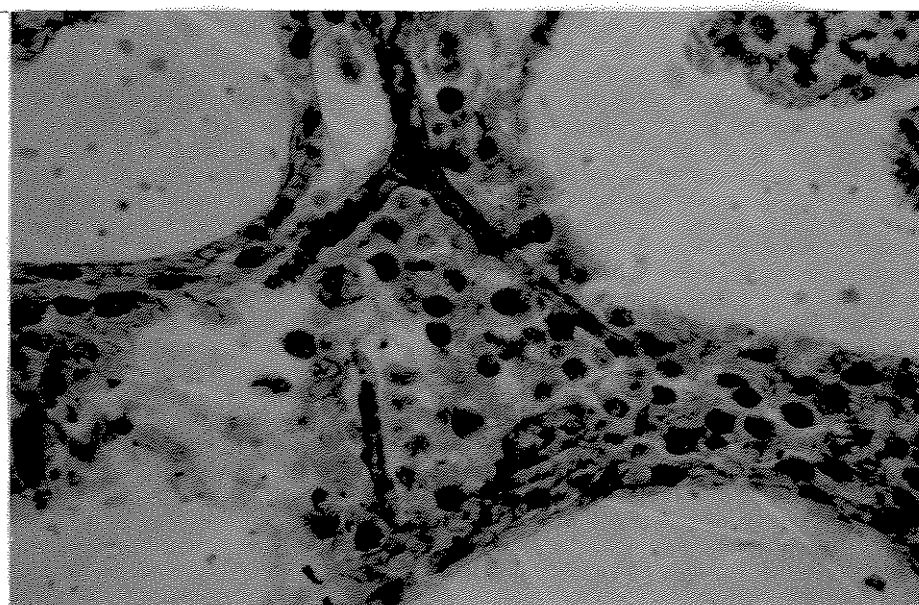


Figura 6.

Figura 7. P.A.S. + hemalume 204 x

Células P.A.S. positivas. Mesma lâmina e mesmo campo da figura 6, após remoção da prata com solução de lugol. A maioria das células são P.A.S. positivas.

Figura 8. Reação do ferricianeto férrico 512 x

Células ferricianeto férrico positivas; algumas exibem citoplasma amplo (A), outras têm o citoplasma restrito a um halo perinuclear (B) e, outras, ainda, com citoplasma amplo e vacuolizado (C).

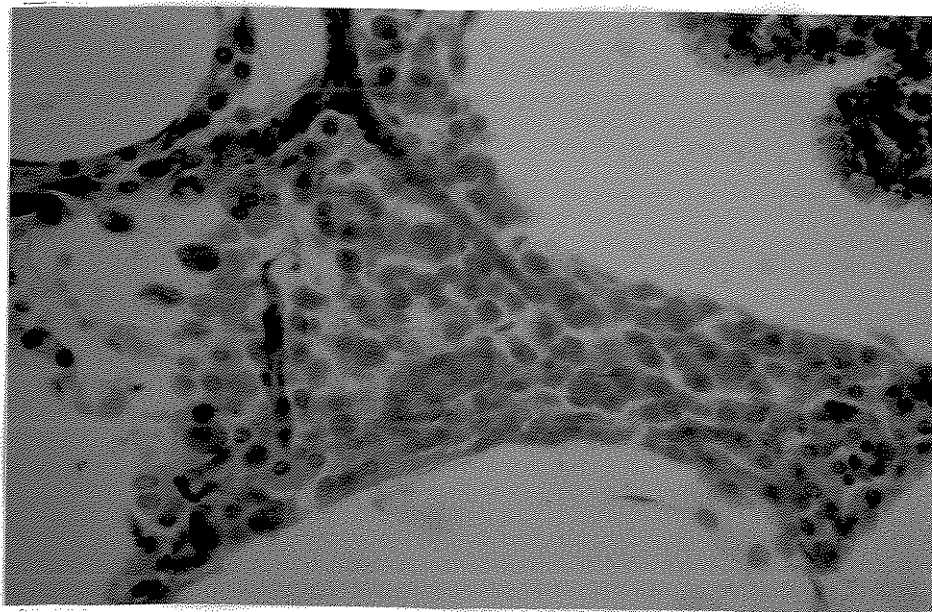


Figura 7.

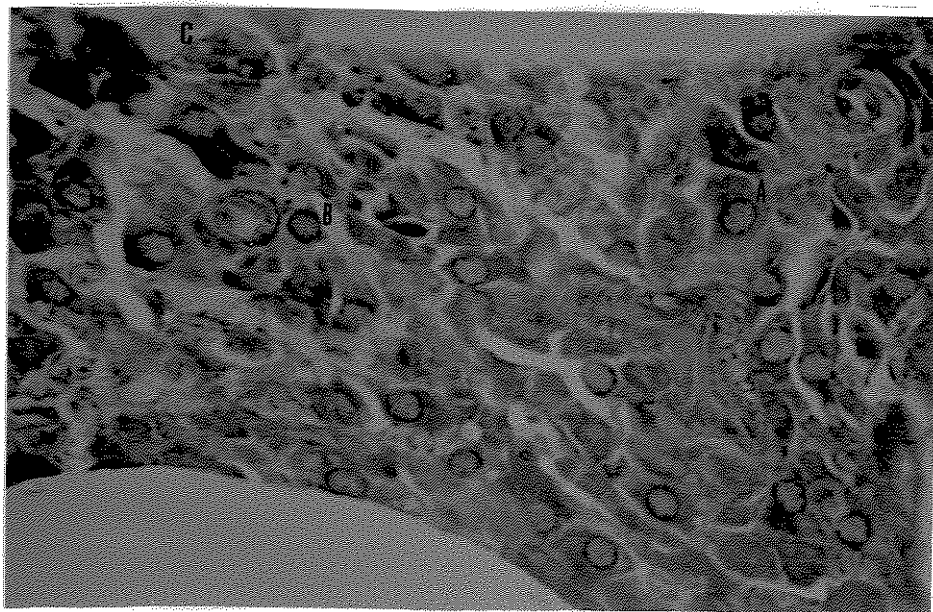


Figura 8.

Figura 9.  $\text{HgCl}_2$  + reação do ferricianeto fêrrico 512 x  
Após tratamento com bicloreto de mercúrio, a quente,  
as células intersticiais ainda são positivas ao ferricianeto fêrrico.

Figura 10. Ácido fosfomolibdico-azul de Alcian + eosina 320 x  
Células intersticiais cuja morfologia é semelhante  
àquela evidenciada pela reação do ferricianeto fêrrico;  
algumas com citoplasma amplo e outras com citoplasma vacuolizado.

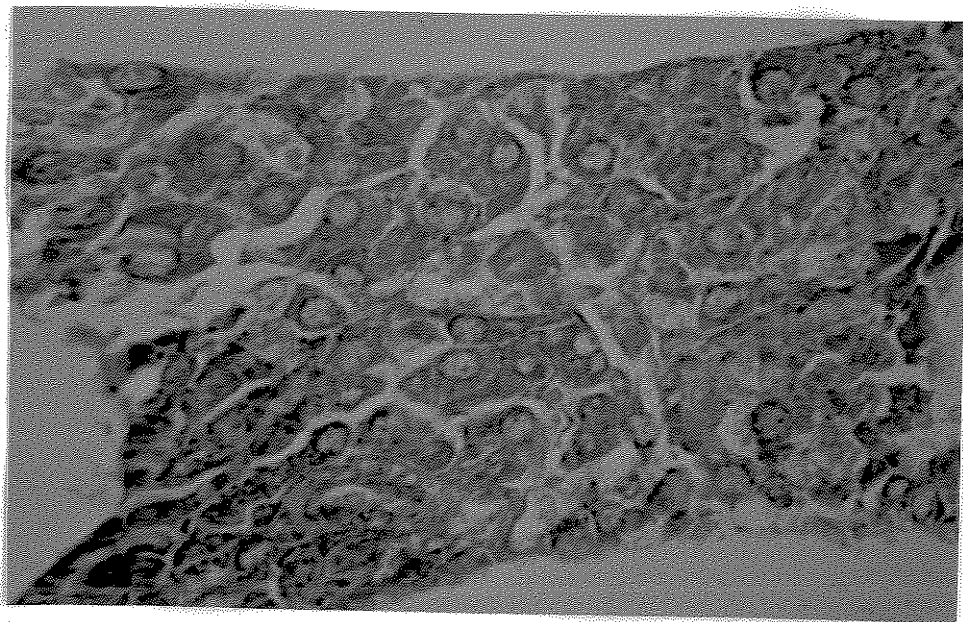


Figura 9.

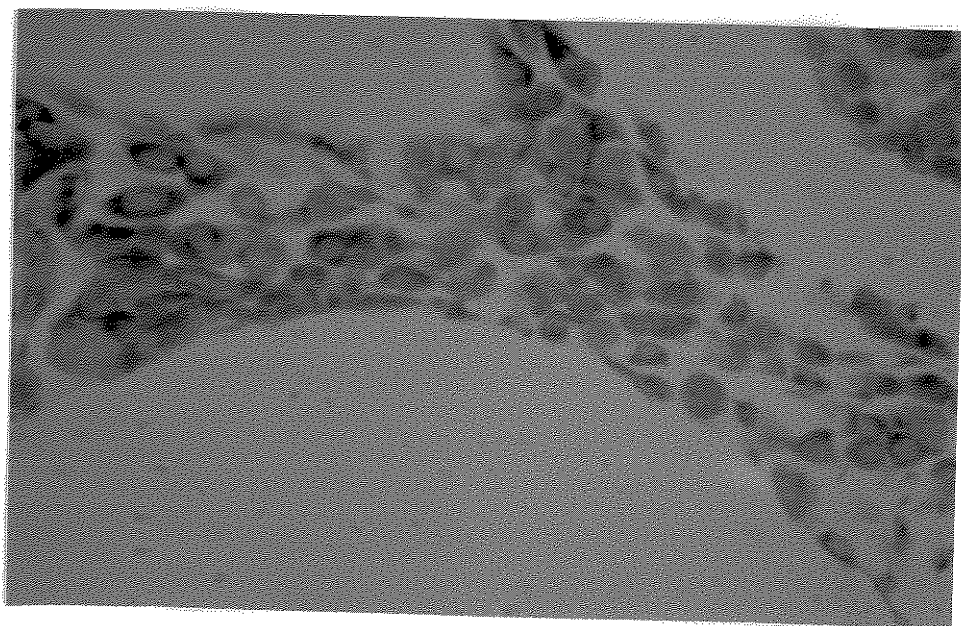


Figura 10.

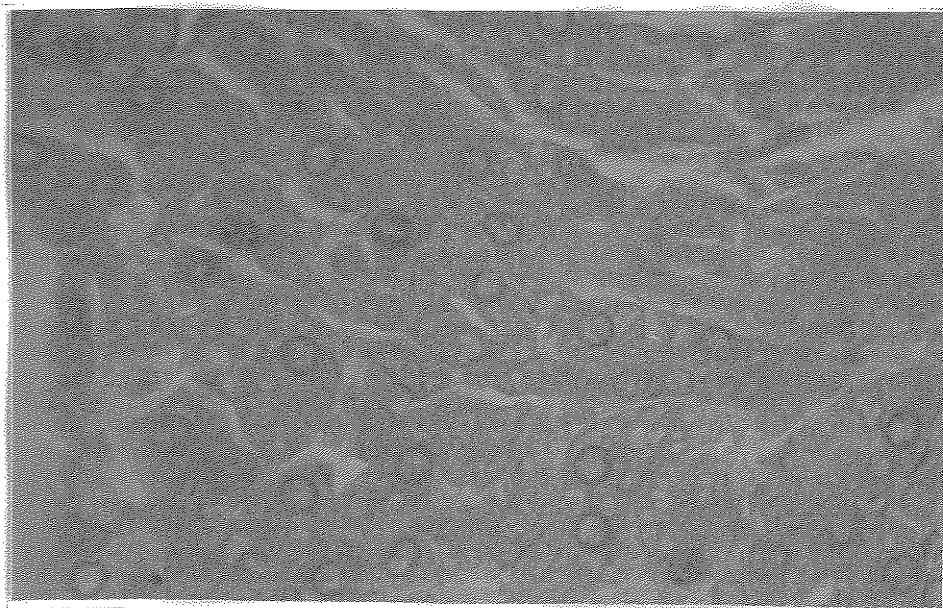


Figura 11.

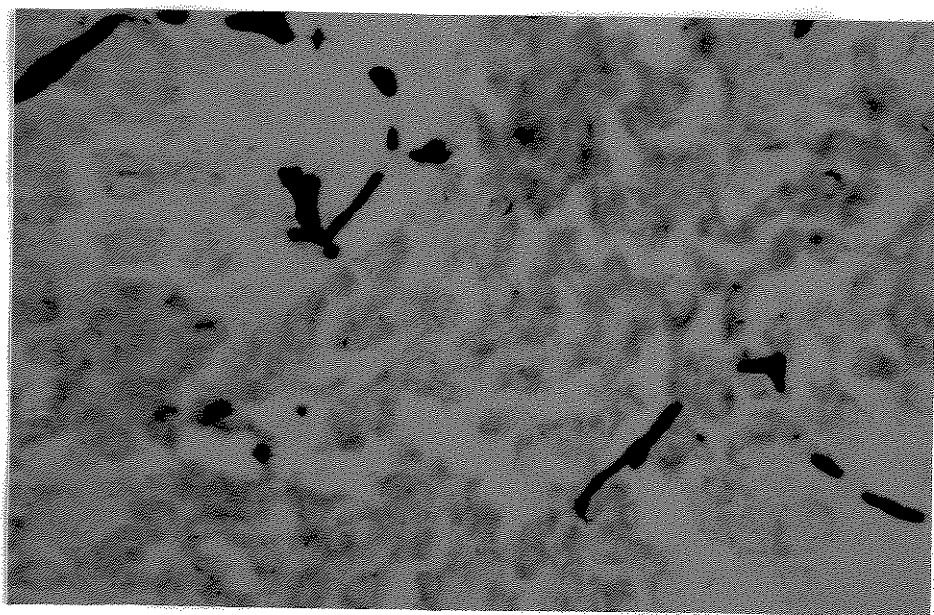


Figura 12.



IV. D I S C U S S Ã O

Os resultados obtidos nas células intersticiais do testículo de gambás, com os testes histoquímicos correlacionados com as características morfológicas e com a argentofilia, apresentados por essas células, permitem caracterizar, basicamente, dois grupos celulares que são:

1) Células dispostas em rede, em cujas malhas estão situadas as células de Leydig e que reagem positivamente à reação do P.A.S., a qual além de corar o citoplasma, demonstra a presença de grânulos de várias dimensões, constituídos por, provavelmente, glicolipoproteínas; os grânulos reagem positivamente com as reações histoquímicas para demonstrar colesterol e substâncias afins, vitamina D e tocoferol; estas células apresentam, ainda, a propriedade de serem argentófilas, mas não em sua totalidade, o que permite classificá-las em dois grupos, ou seja:

células P.A.S. positivas argentófilas e células P.A.S. positivas não argentófilas.

2) Células com a morfologia das clássicas células de Leydig e que apresentam as seguintes reações histoquímicas positivas: reação do ferricianeto férrico, que revela a presença de substâncias redutoras; reação com o reativo de Draggendorf e com ácido fosfomolibdico-azul de Alcian, que revelam a presença de  $\Delta^4$ -esteróides; reação do ácido fosfomolibdico-tioglicólico e da hidroxilamina-prata, que assinalam a presença de lípidos contendo colina; reação para atividade catalásica. Estas células, conforme os resultados histoquímicos contêm  $\Delta^4$ -esteróides e por isto foram consideradas produtoras de hormônios.

As células produtoras de hormônios formam uma população homogênea e estão dispostas em grupos, circunscritos pelas células não produtoras de hormônios.

Estes resultados mostram que, no tecido intersticial do testículo do gambá, existe uma rede celular de células argentófilas, cuja argentofilia permite correlacioná-las com os macrófagos, ou células reticulares, descritos no tecido intersticial de várias espécies de mamíferos por HADLER & GONÇALVES (1965a). A argentofilia, atribuída à presença de ferro ionizável (HADLER e col., 1964; LUCCA, 1968), define células pertencentes ao sistema argentófilo de MARSHALL (1956) e que se relacionam

com as formas jovens das células de Leydig, conforme sugerem HADLER & GONÇALVES (1965a). Estas células são, também, P.A.S. positivas, uma vez que o tratamento apenas pelo reativo de SCHIFF fornece resultado negativo.

Nossos resultados revelam a presença de células P.A.S. positivas não argentófilas, sugerindo que o caráter "argentofilia" é perdido pela célula, durante sua evolução. Como consequência, a célula se transforma em um elemento ainda P.A.S. positivo, dotado de grânulos citoplasmáticos de natureza, provavelmente, glicolipoproteica, grânulos estes que contêm colesterol e substâncias afins, vitamina D e tocoferol. Estas células contêm um precursor dos hormônios esteróides testiculares, que é o colesterol, anteriormente, apenas essa substância fora assinalada nestas células (MONTAGNA & HAMILTON, 1951; MONTAGNA, 1952; LONG & ENGLE, 1952, ICHIRO, 1969). Por este motivo, pode-se admitir que sejam precursoras das células de Leydig, ou seja das células produtoras de hormônios esteróides.

Células P.A.S. positivas foram assinaladas no tecido intersticial do testículo por MONTAGNA & HAMILTON, (1952), BAILLIE, (1960), MANCINI *et al.* (1963), NIEMI & IKONEN, (1963), CLEGG, (1965) e LIVNI & YAFFE, (1974), os quais descreveram variações quanto ao número, ao tamanho e a intensidade da reação do P.A.S. nos grânulos, relacionados com o grau de maturidade ce

lular (MONTAGNA & HAMILTON, 1951; ROOSEN-RUNGE & ANDERSON 1959; ABDEL-RAOUF *et al.*, 1975). Foram assinaladas, também, em algumas espécies animais, variações sasonais da reatividade ao P.A.S. (WISLOCKI, 1949; ABDEL-RAOUF *et al.*, 1975).

A natureza do material P.A.S. positivo, granular, foi interpretada como sendo grânulos de zimogênio (WHITEHEAD, 1904, 1905, 1906, 1908, 1912) ou de lipase (WHITEHEAD, 1912), lipídica (RASMUSSEN, 1917; MONTAGNA & HAMILTON, 1951, glicídica (LILLIE, 1950) ou glicoproteica (BAILLIE, 1960). Nossos resultados sugerem ser glicolipoproteica a natureza dessas granulações.

A influência dos lípidos na positividade da reação do P.A.S. nestes grânulos deve ser considerada, pois embora tenhamos usado material incluído em parafina, eles se coraram pelo negro de Sudan B. Convém salientar que a positividade à reação do P.A.S. não é devido a presença de glicogênio (teste da amilase salivar e diastase negativos). Estes resultados estão de acordo com WISLOCKI (1949), para quem não há glicogênio nas células intersticiais do testículo de mamíferos. Os pré-tratamentos por desoxicolato de sódio e clorofórmio-metanol sugerem que os grânulos P.A.S. positivos contenham um componente lipídico fortemente unido às proteínas.

Nossos resultados mostram ainda, que existem células

las, nas quais um polo é desprovido de grânulos e o outro é rico em grânulos P.A.S. positivos. Este fato é favorável ao que foi admitido por ROOSEN-RUNGE & ANDERSON (1959), segundo os quais as células P.A.S. positivas perderiam o material granular e transformar-se-iam em células com características das produtoras de hormônios.

A reação do ferricianeto férrico, classicamente empregada para mostrar grupos redutores, mostrou-se fortemente positiva nos dois sub-tipos de células intersticiais com as características morfológicas das células produtoras de hormônios (células de Leydig). Esta reação é igualmente positiva nos grânulos grosseiros contidos no citoplasma de algumas células com as características das células P.A.S. positivas, não produtoras de hormônios. A positividade, à reação do ferricianeto-férrico tanto das células de Leydig, quanto dos grânulos das células P.A.S. positivas, mantêm-se mesmo após o tratamento com o bicloreto de mercúrio, a quente, sugerindo que não são os grupos sulfidrilas os maiores responsáveis por aquela reatividade. BENNET (1940) sugere que o grupo responsável por esse caráter redutor, é o grupo ceto.

Estes resultados sugerem que no interior do citoplasma das células P.A.S. positivas, dotadas de grânulos grosseiros, surgem grânulos ferricianeto férrico positivos, o que pare-

ce constituir uma etapa na evolução celular. A célula não argen-  
tófila P.A.S. positiva adquiriria grânulos que passariam a rea-  
gir positivamente com a reação do ferricianeto fêrrico.

Fases funcionais diferentes, durante a evolução  
das células intersticiais, são sugeridas, também, pelos testes  
histoquímicos que revelam  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides. Assim, é pos-  
sível verificar, em células submetidas às reações que evidenciam  
colesterol e substâncias afins, seguidas pelo tratamento com o  
P.A.S., que algumas apresentam grânulos positivos para ambos os  
testes. Estes resultados sugerem que as células P.A.S. positivas,  
inicialmente destituídas de grânulos, adquiram, durante a evolu-  
ção, granulações que passam a conter  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides ,  
provavelmente colesterol. Esta substância é precursora dos  $\Delta^4$ -  
esteróides com atividade hormonal, os quais somente são encontra-  
dos nas fases sucessivas da evolução celular.

Deve ser destacada a presença de catalase nas cé-  
lulas produtoras de hormônios, fato que está de acordo com BLACK  
& BOGART (1973), que estabeleceram que as enzimas dos peroxisso-  
mos, em células produtoras de esteróides, estariam envolvidas -  
com: 1) Síntese de piridina-nucleotídeos, necessários para a ati-  
vidade de desidrogenases e hidrolases, envolvidos na conversão -  
do colesterol em hormônios; 2) Liberação do colesterol a partir  
de seus ésteres; 3) Transporte intracelular dos esteróides.

PATELLI (1969) mostrou que, no ovário da rata, há correlação entre a atividade catalásica e a produção de hormônios esteróides. Esta correlação é depreendida dos seguintes fatos: as estruturas ovarianas que contêm maior quantidade de hormônios (corpo lúteo gravídico) são as que apresentam maior atividade catalásica e vice-versa. Nossos resultados confirmam a relação da atividade catalásica com a síntese de hormônios esteróides, pois assinalam a presença da enzima nas células produtoras de hormônios. Além disso, os resultados mostram que as catalases ocorrem nas células que contêm  $\Delta^4$ -esteróides e estão ausentes nas células que contêm  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides. Isto sugere que as catalases possam estar relacionadas, direta ou indiretamente, com a síntese do  $\Delta^4$ -esteróides a partir do colesterol.

As reações histoquímicas que evidenciam radicais sulfato e fosfato não foram importantes na caracterização histoquímica das células intersticiais do testículo, enquanto a coloração por solução de azul de toluidina teve como principal finalidade identificar os mastócitos, que não foram encontrados no tecido intersticial do testículo de gambás, por nós estudado.

Os resultados discutidos sugerem a possibilidade de se estabelecer a evolução das células do tecido intersticial do testículo, através da reatividade histoquímica, da argentofilia e dos caracteres morfológicos. A evolução sugerida é a se-



guinte:

células P.A.S. positivas - argentófilas

↓  
células P.A.S. positivas - não argentófilas

(granulação fina) colesterol; vitamina D; tocoferol  
positivo positivo positivo

↓  
células P.A.S. positivas

(granulação grosseira) ferricianeto fêrrico positivo

↓  
células de LEYDIG: ferricianeto fêrrico positivo:  
 $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides

V. RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo histoquímico das células intersticiais do testículo do gambã permitiu demonstrar a presença de dois grupos celulares: 1) células P.A.S. positivas e, 2) células P.A.S. negativas.

A metodologia empregada permitiu, ainda, caracterizar, histoquimicamente, cada grupo celular e distinguí-los um do outro; assim, as células P.A.S. positivas são argentófilas, a loxana-Schiff e ou ninhidrina-Schiff positivas; reagem positivamente ao colesterol e substâncias afins à vitamina D e ao tocoferol; quando dotadas de granulação grosseira, esta é ferricianeto férrico positiva. As células P.A.S. negativas reagem positivamente ao reativo de Draggendorf e ácido fosfomolibdico-azul de Alcian, com o ferricianeto férrico, à hidroxilamina-prata e ao ácido fosfomolibdico-tioglicólico, ao negro de Sudan B e à cata-

lase.

A reatividade histoquímica permite caracterizar - no citoplasma das células do primeiro grupo, uma substância de natureza glicolipoproteica,  $\Delta^5$ -3-hidroxi-esteróides vitamina D e tocoferol enquanto no citoplasma das células do segundo grupo são evidenciadas substâncias redutoras, lípides e lípides que contêm colina  $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides e catalase.

Ante o exposto, foi possível estabelecer que além do colesterol, a vitamina D e o tocoferol são, também, encontrados no citoplasma das células P.A.S.

Evidenciou-se que, a exemplo de outros locais, no testículo a catalase tem participação nos processos metabólicos de elaboração dos esteróides.

Além disso, foi possível demonstrar que todas as células argentófilas são P.A.S. positivas, e que há células que são P.A.S. positivas e não são argentófilas.

Finalmente, mediante a correlação dos resultados histoquímicos aliada à morfologia e à argentofilia, foi possível estabelecer uma evolução das células intersticiais, quanto à reatividade histoquímica, a qual corresponde à evolução funcional.

Em primeiro lugar, aparecem no interstício testicular P.A.S. positivas com grânulos citoplasmáticos finos, que se transformam em grânulos grosseiros ainda P.A.S. positivos, mas que adquirem outras características, tais como: positividade ao ferricianeto fêrrico, à aloxana-Schiff e ou ninhidrina-Schiff, e ao negro de Sudan B. A granulação P.A.S. positiva é também argentófila. Esta granulação desaparece do citoplasma e a célula torna-se P.A.S. negativa; estágio que é confirmado pelo achado de células com um polo repleto destes grânulos e o outro livre dos mesmos.

Ainda nas células P.A.S. positivas de grânulos grosseiros são detectados grânulos de colesterol e substâncias a fins, vitamina D já assinalando o início da síntese dos esteróides com atividade hormonal, além dos quais esta presente também o tocoferol.

A transformação total das células P.A.S. positivas em células P.A.S. negativas implica em mudança no caráter histoquímico. Assim, histoquimicamente, a célula torna-se reativa às reações que revelam os  $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides, tais como: reação do ferricianeto fêrrico, ácido fosfomolibdico-azul de Alcian e ao reativo de Draggendorf, além da positividade à demonstração topoquímica da catalase. Estas células correspondem às células de Leydig maduras.

R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Ã F I C A S

- ABDEL-RAOUF, M., FATEH EL-BAB, M.R. & OWAIDA, M.M. - Studies on reproduction in the camel (Camelus dromedarius) V. Morphology of testis in relation to age and season. *J. Reprod. Fert.*, 43: 109-116, 1975.
- ADAMS, C.W.M. - A stricter interpretation of ferric-ferricyanide reaction with particular reference to the demonstration of protein-bound sulphhydryl and disulphide groups. *J. Histochem. Cytochem.*, 4: 23-55, 1956.
- ALLEN, B.M. - The embryonic development of ovary and testis of mammals. *Am. J. Anat.*, 3: 89-153, 1904.
- BAILLIE, A.H. - The interstitial cell in the testis of foetal sheep. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 101: 475-480, 1960.
- BAILLIE, A.H. - Observations on the growth and histochemistry of the Leydig tissue in the postnatal prepubertal mouse testis. *J. Anat.*, 95: 357-370, 1961.
- BASCOM, K.F. & OSTERUD, L.H. - Quantitative studies of the testis. III. A numerical treatment of development of the pig testis. *Anat. Rec.*, 37: 63-82, 1927.
- BENNET, H.S. - The life history and secretion of the cells of

the adrenal cortex of the cat. *Am. J. Anat.*, 67: 151-227, 1940.

BLACK, V.H. & BOGART, B.J. - Peroxisomes inner adrenocortical cells of fetal and adult guinea pigs. *J. Cell Biol.*, 57: 345-358, 1973.

CHRISTENSEN, A.K. & FAWCETT, D.W. - The normal structure of opossum testicular interstitial cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 653-670, 1961.

CLEGG, E.J. - Studies on artificial cryptorchidism: compensatory changes in the scrotal testis of unilaterally cryptorchid rats. *J. Endocrinol.*, 33: 259-268, 1965.

FAWCETT, D.W. & BURGOS, M.H. - Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am. J. Anat.*, 107: 245-269, 1960.

GILLMAN, J. - The development of the gonads in man, with a consideration of the role of the fetal endocrines and histogenesis of ovarians tumors. *Contr. Embryol.*, 32: 81-131, 1948.

GONDOS, B., PAUP, D.C., ROSS, J. & GORSKI, R.A. -Ultrastructural



differentiation of Leydig cells in fetal and postnatal -  
testis. *Anat. Rec.*, 178: 551-566, 1974.

GONDOS, B., RENSTON, R.H. & GOLDSTEIN, D.A. - Postnatal -  
differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am.*  
*J. Anat.*, 145: 167-182, 1975.

GREENSPAN, F.P. - The convenient preparation of per-acids. *J.*  
*Am. Chem. Soc.*, 68: 907-908, 1946.

HADLER, W.A. - Morfologia e distribuição das células reticulares  
do baço normal. Estudo efetuado mediante técnica de impreg  
nação argêntica. Tese apresentada ao concurso de Livre-Do  
cência ã 2a. Cadeira da Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto, 1962.

HADLER, W.A., LUCCA, O. de, VOZZA, J.A., PATELLI, A.S. & ZITI,  
L.M. - Relação entre a presença de cátions no fixador e a  
impregnação argêntica das células reticulares do baço.  
*Ciência e Cultura*, 16: 178, 1964.

HADLER, W.A. & GONÇALVES, R.P. - The argentophil cells of the  
interstitial tissue of testis. *Z. mikrosk. anat. Forsch.* ,  
72: 426-438, 1965a.

HADLER, W.A., LUCCA, O. de, ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & VOZZA ,

- J.A. - Histoquímica do ferro: estudo das condições mais adequadas para o desenvolvimento da reação do azul da Prússia. *Ciência e Cultura*, 17: 248, 1965b.
- HADLER, W.A., VOZZA, J.A., LUCCA, O.de, ZITI, L.M. & PATELLI A. S. - Effect of some oxidizing agents on the aldehyde-fuchsin and chrome-alume hematoxylin staining of some steroids and unsaturated compounds. *Acta Histochem.*, 30: 41-53, 1968.
- HADLER, W.A., SILVEIRA, S.R., ZITI, L.M. & REIS, N.S. - Técnica histoquímica para demonstração de catalase em tecidos. *Ciência e Cultura*, 21: 493-494, 1969a.
- HADLER, W.A. & ZITI, L.M. - Demonstração histoquímica de lípidos contendo colina. *Anais VII Congresso Brasileiro de Anatomia*. p. 5-6, 1969b.
- HADLER, W.A., ZITI, L.M. & CRUZ HÖFLING, M.A. - Método da benzidina para demonstração histoquímica do íon sulfato. *Resumos da XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*. p. 37-38, 1970.
- HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. - Tentativa de demonstração de alguns  $\Delta^4$ -3-ceto-esteróides com atividade hormonal. (trabalho

no prelo, 1977).

HADLER, W.A. & SILVEIRA, S.R. - Novas técnicas para demonstração histoquímica de tocoferol e de vitamina D. (Trabalho no prelo, 1977).

HADLER, W.A. & ZITI, L.M. - (Comunicação pessoal, 1977).

HADLER, W.A., ZITI, L.M. & CRUZ HÖFLING, M.A. - (Comunicação pessoal, 1977):

HOOKER, C.W. - The postnatal history and function of the interstitial cells of testis of the bull. *Am. J. Anat.*, 74: 1-37, 1944.

HOTCHKISS, R.D. - A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 16: 131-141, 1948.

ICHIRO, I. - Cholesterol changes in developing testicular cells of the mouse histochemical and biochemical study. *Anat. Rec.*, 163: 595-601, 1969.

LEWIS, P.R. & LOBBAN, M.C. - *J. Histochem. Cytochem.*, 9: 2, 1961.

LILLIE, R.D. - Further exploration of the  $\text{HIO}_4$ -Schiff reaction

with remarks on its significance. *Anat. Rec.*, 108: 239-253, 1950.

LILLIE, R.D. - Histopathologic technic and practical histochemistry. *The Blakiston Co. Inc.*, New York, 1954.

LISON, L. - Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et Methodes. Paris, *Gauthiers Villars*, 1960.

LONG, M.E. & ENGLE, E.I. - Cytochemistry of the tumor testis. *Ann. New York Acad. Sci.*, 55: 619-628, 1952.

LUCCA, O. de. - Estudo do mecanismo das "técnicas rápidas" de im-  
pregnação pela prata. Tese de Doutorado. Instituto de Bio-  
logia. UNICAMP, Campinas, 1968.

MANCINI, R.E., NOLAZCO, G. & F. de la BALZA. - Histochemical -  
study of normal adult tumor testis. *Anat. Rec.*, 119: 147,  
1952.

MANCINI, R.E., VILAR, O., LAVIERI, J.C., ANDRADA, J. & HEINRICH,  
J.J. - Development of Leydig cells in the normal human -  
testis. A cytological, cytochemical and quantitative study.  
*Am. J. Anat.*, 112: 203-214, 1963.

MARSHALL, A.N.E. - An outline of the cytology and pathology of

the reticular tissue. *Oliver and Boyd*, Londres, 1956 apud  
HADLER, W.A. - The argentophil cells of the interstitial  
tissue of the testis. *Z. mikrosk. anat. Forsch.*, 72: 426-  
438, 1965a.

McMANUS, J.F.A. - The histochemical demonstration of mucs after  
periodic acid. *Nature*, 158: 202, 1946.

MONTAGNA, W. - Some cytochemical observations on human testis  
and epididymes. *Ann. New York Acad. Sci.*, 55: 629-641 ,  
1952.

MONTAGNA, W. & HAMILTON, J.B. - Histological studies of human  
testis. I. The distribution of lipids. *Anat. Rec.*, 109:  
635-659, 1951.

MONTAGNA, W. & HAMILTON, J.B. - Histological studies of human  
testis. II. The distribution of glycogen and others -  
HIO<sub>4</sub>-Schiff reactive substances. *Anat. Rec.*, 112: 237-  
249, 1952.

NELLY, L. & YAFFE, H. - Histochemistry of normal and ethionine  
treated rat testis. *Histochemistry*, 40: 329-341, 1974.

NIEMI, M. & IKONEN, M. - Histochemistry of the Leydig cells in

the post-natal prepubertal testis of the rat. -

*Endocrinology*, 72: 443-448, 1963.

PATELLI, A.S. - Atividade catalásica do ovário: estudo histológico e histoquímico. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP. Campinas, 1969.

PEARSE, A.G.E. - Histochemistry: theoretical and applied. 2ed. London, *Churchill*, 1961. p. 266.

RASMUSSEN, A.T. - Seasonal changes in the interstitial cells of the woodchuck (Marmota monax). *Am. J. Anat.*, 22: 475-515, 1917.

RIO HORTEGA, P. del. - El tercer elemento de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglia. *Boletín de la Sociedad española de Biología*, 9: 68-83, 1919.

ROOSEN-RUNGE, E.C. & ANDERSON, D. - The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anat.*, 37: 125-137, 1959.

SILVEIRA, S.R. - Caracterização histoquímica das catalases. Estudo comparativo com as peroxidases, porfirinas e sais de ferro. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. UNICAMP,

Campinas, 1974.

- SKIPSKI, W.P., PETERSON, R.F. & BARCLAY, M. - Separation of phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine and other phospholipids by thin-layer-chromatography. *J. Lipid Res.*, 3: 467-470, 1962.
- SNIFFEN, R.G. - The testis. I. The normal testis. *Arch. Pathol.*, 50: 259-284, 1950.
- STIEVE, H. in MOLLENDORF, W. - *Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen.* 71: 61-77, 1930.
- TILLINGER, K.G., BIRKE, G., FRANKSSON, C. & PLANTIN, L.O. - The steroid production of the testicles and its relation to the number and morphology of Leydig cells. *Acta Endocrinol.*, 19: 340-348, 1955.
- WHITEHEAD, R.H. - The embryonic development of the interstitial cells of Leydig. *Am. J. Anat.*, 3: 167-182, 1904.
- WHITEHEAD, R.H. - Studies of the interstitial cells of Leydig. II. Their post embryonic development in the pig. *Am. J. Anat.*, 4: 193-197, 1905.
- WHITEHEAD, R.H. - The presence of granules in the interstitial

cells of the testis. *Anat. Rec.*, 1: 60-61, 1906.

WHITEHEAD, R.H. - Studies of the interstitial cells of Leydig.  
III. Histology. *Anat. Rec.*, 1: 213-229, 1908.

WHITEHEAD, R.H. - On the chemical nature of certain granules in  
the interstitial cells of the testis. *Am. J. Anat.*, 14:  
63-71, 1912.

WISLOCKI, G.B. - Seasonal changes in the testis, epididymes and  
seminal vesicles of deer investigated by histochemical  
methods. *Endocrinology*, 44: 167-189, 1949.

YASUMA, A. & ICHIKAWA, T. - Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff  
staining. A new method for protein. *J. Lab. Clin. Med.*,  
41: 296, 1953.