

ESTÍMULO DO EPITÉLIO GERMINATIVO DO RATO ADULTO COM ULTRA-SOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE.

por

S. HADDAD¹, S.O. PETENUSCI², J.A. ANSELMO-FRANCI² & T.L. LAMANO CARVALHO³

RESUMO -- O testículo de ratos machos adultos foi estimulado com ultra-som pulsado de baixa intensidade, por 20 min diários, durante 22 dias, e os animais foram sacrificados 35 dias após a interrupção do tratamento. Ratos controles foram submetidos à simulação do tratamento. O estímulo ultra-sônico não alterou os pesos relativos do testículo e cauda do epidídimo, nem a dinâmica do processo espermato gênico ou a produção de espermatozoides e sua concentração na cauda do epidídimo. Experimento piloto revelou, no entanto, que o estímulo ultrasônico do testículo pré-púbere provoca aumento no nível plasmático de testosterona, determinando valores significativamente maiores no peso e no teor de frutose da vesícula seminal.

INTRODUÇÃO

O ultra-som de baixa intensidade tem sido utilizado em medicina, com propósitos terapêuticos, revelando-se eficiente na cura de lesões que se beneficiam do estímulo ao crescimento de tecidos lesados. A terapia ultra-sônica promove a cicatrização de úlceras (Paul e cols. 1960, Galitsky e Levina 1964), sendo particularmente eficaz no tratamento de úlceras varicosas crônicas das extremidades inferiores, mesmo daquelas que resistem prolongadamente a outras formas de tratamento, estimulando a formação de tecido de granulação e o crescimento do epitélio até a epitelização completa da lesão (Dyson e cols. 1976, Dyson e Suckling 1978). O tratamento com parâmetros adequados de ultra-som também acelera a consolidação de fraturas ósseas, estimulando a neoformação de tecido ósseo a níveis superiores aos de pacientes não-estimulados (Xavier e Duarte 1983).

¹-Pós-Graduanda (mestrado),Área Interunidades de Bioengenharia (EESC/FMRP-USP), CEP: 13560 - São Carlos - SP

²-Prof. associado, Departamento de Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

³-Profa. Associada, Laboratório de Patologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, Av. do Café s/n. CEP 14050 Ribeirão Preto - SP

Estudos experimentais tem confirmado que o ultra-som de baixa intensidade pode estimular o crescimento de tecidos em áreas de injúria. Dyson e cols. (1970) removeram áreas de 1 cm^2 em toda a espessura da orelha de coelhos e observaram aumento significativo no ritmo de reposição dos tecidos (pele e anexos + cartilagem elástica), nos animais estimulados com ultra-som. Utilizando a microscopia eletrônica e a radioautografia, apresentaram evidências de estímulo ao aumento do número de fibroblastos e da síntese protéica nessas células, e também aumento da síntese de DNA, tanto no epitélio quanto nos tecidos sub-epiteliais. Recentemente, Alves (1988) mostrou os efeitos da energia ultra-sônica pulsada e de baixa intensidade na regeneração da pele do rato severamente injuriada por queimadura de terceiro grau. O estímulo com ultra-som intensificou a resposta inflamatória e a formação de tecido de granulação, além de favorecer a regeneração da epiderme e dos anexos da pele. A aplicação do ultra-som também acelera o reparo de fraturas ósseas, em coelhos (Duarte 1977, 1983).

Existem, pois, evidências experimentais e clínicas de que o ultra-som de baixa intensidade pode acelerar o reparo de tecidos danificados, por estimular tanto a proliferação quanto a atividade metabólica de suas células.

O presente trabalho teve por objetivo investigar uma possível ação estimulatória do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre um tecido íntegro lábil, i. e., que apresenta alta taxa de renovação celular. O epitélio germinativo é um tecido que apresenta alto índice mitótico, relacionado à produção constante de novas células para garantir a reposição dos espermatozóides eliminados. No presente experimento investigou-se, por meio de técnicas morfométricas, a ação do ultra-som sobre o epitélio germinativo de ratos adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 ratos machos Wistar adultos (peso corporal $203,3 \pm 1,8$ g). Os animais tratados ($n = 10$) foram estimulados na região escrotal com energia ultra-sônica pulsada por 20 minutos diários, durante um período de 22 dias. O equipamento utilizado foi otimizado para produzir estimulação com doses terapêuticas recomendadas por Alves (1988) para o reparo de tecidos moles: frequência 1,5 MHz, frequência de repetição 1 KHz, largura do pulso $200\ \mu\text{s}$, amplitude do pulso 30 volts (pico a pico) e intensidade média de aproximadamente $20\ \text{mW/cm}^2$. Nos animais controles ($n = 8$) utilizou-se o mesmo equipamento e procedimento dos animais tratados, exceto o estímulo ultra-sônico (simulação do tratamento). O transdutor ultra-sônico era posicionado na região escrotal e acoplado à superfície da pele com auxílio de um gel hidrossolúvel (Gel Contact).

Os animais foram sacrificados 35 dias após a interrupção do tratamento, e durante todo o período experimental receberam ração comercial e água a vontade (vide discussão para delineamento dos períodos de estimulação e repouso). Imediatamente após o sacrifício (por inalação de éter anestésico) foi coletado semen da cauda do epidídimo direito, para avaliação da concentração de espermatozóides, de acordo com método descrito por Kempinas e Lamano Carvalho (1988). O testículo e cauda do epidídimo esquerdos foram retirados, pesados e

imersos na solução fixadora de Alfac (85% álcool 80^o, 10% formol, 5% ácido acético glacial) por 24 horas. Após o processamento de rotina para inclusão em parafina, os tecidos foram seccionado a 7 µm de espessura e corados pela hematoxilina férrica e eosina. Aos cortes histológicos de testículos foram aplicadas técnicas morfométricas para avaliação da dinâmica da espermatogênese e da produção de espermatozóides. A dinâmica do processo espermatogênico foi estimada pela frequência relativa dos estágios I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV do ciclo do epitélio germinativo, identificados segundo Ferreira e cols. (1967), em 200 secções transversais de túbulos seminíferos.

A produção de espermatozóides foi estimada em secções transversais de túbulos seminíferos nos estágios I-VI do ciclo. Foram contados os números de espermátides em fase de maturação (estágios 15 a 18 da espermiogênese), (Leblond & Clermont, 1952) e de núcleos de células de Sertoli (apenas aqueles contendo o nucléolo). A produção de espermatozóides foi estimada pela razão entre o número médio de espermátides maduras e o número médio de células de Sertoli por secção tubular. Como as células de Sertoli não se dividem no testículo adulto, e apresentam número constante e distribuição homogênea ao longo dos túbulos seminíferos (Bustos - Obregon 1970), elas têm sido utilizadas como fator de correção para a contagem de células germinativas, em diferentes condições experimentais.

Análise estatística. A comparação entre os resultados dos grupos controle e tratado foi feita pelo teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney (Siegel 1975).

RESULTADOS

O peso corporal dos animais tratados, ao final do período experimental, foi semelhante ao dos animais controles. Os pesos relativos do testículo e da cauda do epidídimo também não se alteraram com o estímulo ultra-sônico (tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal e peso relativo do testículo e da cauda do epidídimo ($\bar{x} \pm \text{EPM}$)

GRUPOS	PESO CORPORAL (g)	TESTICULOS (g/100 g)	CAUDA EPIDÍDIMO (mg/100g)
CONTROLE	346,9 ± 7,8	0,46 ± 0,02	61,9 ± 2,3
TRATADO	346,5 ± 7,8	0,45 ± 0,01	60,4 ± 2,2

O exame histológico do testículo e da cauda do epidídimo dos ratos estimulados revelou aspecto estrutural semelhante ao dos ratos controles, sem a presença de alterações que

pudessem ser atribuídas ao tratamento. A análise morfométrica do testículo mostrou que o estímulo com ultra-som não alterou a dinâmica do processo espermatogênico (avaliada pela frequência relativa dos estágios do ciclo do epitélio germinativo) nem a produção de espermatozóides (avaliada pela razão entre o número de espermátides 15-18 e o número de células de Sertoli), (tabela 2).

A concentração de espermatozóides no esperma armazenado na cauda do epidídimo foi estatisticamente semelhante nos grupos controle e tratado. (tabela 2).

Tabela 2. Dinâmica da espermatogênese, produção de espermatozóides e sua concentração na cauda do epidídimo ($\bar{x} \pm \text{EPM}$).

Estágios do ciclo(%)	Controle	Tratado
I-VI	37,7 \pm 2,3	35,4 \pm 1,8
VII-VIII	29,5 \pm 1,5	31,1 \pm 1,0
IX-XIII	28,0 \pm 2,0	29,6 \pm 1,6
XIV	4,7 \pm 0,4	3,8 \pm 0,5
Nº Espermátides 15-18	185,2 \pm 7,6	195,0 \pm 8,2
Nº Células de Sertoli	14,5 \pm 0,5	16,3 \pm 1,1
Espermátides/Células Sertoli	12,6 \pm 0,2	12,2 \pm 0,5
Concentração de Espermatozóides (nº / ml x 10 ⁷)	187,8 \pm 12,6	180,2 \pm 10,2

DISCUSSÃO

Os efeitos danosos ou benéficos do ultra-som em meio biológico estão intimamente relacionados com as características da onda acústica. Ondas com intensidade média inferior a 100 mW/cm² parecem não provocar danos aos tecidos animais. O uso terapêutico do ultra-som baseia-se, em parte, em seu efeito de aquecimento, provocado pela absorção da energia da onda ultra-sônica. No entanto, com os parâmetros do feixe ultra-sônico otimizados para o uso terapêutico (baixas intensidade e frequência) o aumento local de temperatura é da ordem de centésimos de grau até cerca de 1°C, sugerindo a participação de mecanismos não-térmicos na ação biológica do ultra-som (Dyson e Suckling 1978). Ao atravessar os tecidos ou suspensões de células, o feixe ultra-sônico provoca movimentos unidirecionais (streaming) e circulares (microstreaming) no fluido biológico. Esses movimentos podem, por um lado, danificar macromoléculas e células (Wells 1977, Nyborg 1982) e, por outro, alterar o ritmo de difusão de partículas e a permeabilidade de membranas, desencadeando uma resposta celular que favorece o aumento do metabolismo e da proliferação de células e vasos sanguíneos (Dyson 1987, Dyson e Suckling 1978, Harvey e cols. 1975). Ao atravessar os meios biológicos, a onda acústica leva também à formação de cavidades (bolhas) cheias de gás (mecanismo de cavitação). O colapso

dessas bolhas (cavitação transitória) libera energia que pode provocar danos ao tecido (Apfel 1982). No entanto, as bolhas formadas por ondas de menores intensidades podem permanecer intactas (cavitação estável), oscilando e gerando um fluxo acústico, que deve ser um dos mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos do ultra-som (Wells 1977, Apfel 1982, Dyson e Suckling 1978). Quando uma onda ultra-sônica pulsada de baixa intensidade atinge uma superfície óssea, leva ao desenvolvimento de cargas elétricas superficiais (mecanismo piezoelétrico), estabelecendo uma corrente que estimula a proliferação e o metabolismo das células ósseas, acelerando o processo de reparo de fraturas e calos ósseos (Albertim 1983, Xavier e Duarte 1983).

Pode-se concluir, portanto, que por um ou vários dos mecanismos expostos, o estímulo de tecidos lesados com ultra-som de baixa intensidade pode acelerar o processo de reparo por estimular: a proliferação fibro-vascular com a formação de tecido de granulação; a proliferação do epitélio pavimentoso estratificado e dos anexos da pele, acelerando o reparo de lesões ulceradas; o aumento da síntese protéica por fibroblastos; a proliferação e aumento da atividade metabólica de células ósseas, acelerando a consolidação de fraturas e o reparo de lesões do osso.

No presente experimento, estimulou-se com níveis terapêuticos de ultra-som um tecido intacto que apresenta alta taxa de renovação celular. O tempo de estimulação do testículo (22 dias) seguido de um período sem estimulação (35 dias) foram determinados com base na duração das diferentes fases da espermatogênese do rato adulto (Huckins 1965). A primeira fase da espermatogênese (multiplicação das espermatogônias resultando na formação dos espermátócitos I) tem duração média de 13 dias. A segunda fase (divisões reducionais dos espermátócitos I, dando origem aos espermátócitos II e às espermátides jovens) dura 17 dias, e a terceira fase (complexas transformações estruturais das espermátides, culminando com a formação dos espermatozóides imaturos) 22 dias.

A produção contínua de espermatozóides pelos túbulos seminíferos depende da atividade mitótica das espermatogônias, que garante tanto a renovação de sua população quanto a formação dos espermátócitos I (Clermont e Bustos - Obregon 1968).

Os espermatozóides amadurecem a medida em que são transportados pelo ducto epididimário (regiões da cabeça, corpo e cauda). Os gametas maduros atingem a porção proximal da cauda do epidídimo 4 dias após sua liberação pelos túbulos seminíferos e chegam a porção distal da cauda nos próximos 5 dias (Robb e cols. 1978).

Com um período de estimulação de 22 dias (13 dias de mitoses de espermatogônias acrescidos de 9 dias de trânsito pelo ducto epididimário) seguido de 35 dias sem estímulo, pretendeu-se que, ao dia do sacrifício, tanto as espermátides em fase de maturação no interior do testículo, quanto os espermatozóides maduros armazenados na cauda do epidídimo, fossem originados de espermatogônias estimuladas.

A estimulação do testículo, com os níveis terapêuticos de ultra-som capazes de estimular o reparo de tecidos lesados, não alterou o ritmo do processo espermatogênico nem

intensificou a produção de espermatozóides. Deve-se considerar, no entanto, que em animais adultos como os do presente experimento o testículo já atingiu plena capacidade de produção de espermatozóides, sendo máxima a concentração dessas células armazenadas na cauda do epidídimo (Robb e cols. 1978). Experimento piloto realizado em nossos laboratórios mostrou que a estimulação ultra-sônica do testículo pré-púbere provoca aumento de 61% nos níveis plasmáticos de testosterona, revelando, portanto, um aumento significativo na atividade androgênica testicular. Como consequência, observou-se um aumento de 35% no peso da vesícula seminal, e também um aumento em seu teor de frutose, o principal nutriente do sêmen que favorece aos espermatozóides a energia necessária ao seu metabolismo fora do trato genital masculino. Estão em desenvolvimento experimentos para avaliação das atividades espermatogênicas e androgênicas de testículos pré-púberes, púberes e adultos, após a estimulação ultra-sônica.

AGRADECIMENTOS

O estímulo ultra-sônico foi realizado no Laboratório Interunidades de Bioengenharia (EESC / FMRP - USP), sob orientação dos Profs. Drs. Luiz R. Duarte e José B. P. Paulin, a quem os autores são gratos. Os autores agradecem também a Francisco Carlos Mazzocato, Antonio de Campos e Edna A. Santos Moraes pelo auxílio técnico.

REFERÊNCIAS

- ALBERTIN, L. M. (1983) Efeito do ultra-som no reparo de falha óssea experimental. Avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. Dissertação de Mestrado, área Interunidades EESC/FMRP-USP.
- ALVES, J. M. (1988) Efeitos da energia ultra-sônica na regeneração de pele animal com queimadura por calor. Dissertação de Mestrado, área Interunidades EESC/FMRP-USP.
- APFEL, R. E. (1982), "Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound". British Journal of Cancer, Supplement 45, Pages 140-146.
- BUSTOS-OBREGON, E. (1970), "On Sertoli cell number and distribution in rat testis", Archives of Biology (Liege), Volume 81, Pages 99-108.
- CLERMONT, Y and BUSTOS-OBREGON, E. (1968), "Reexamination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto", American Journal of Anatomy, Volume 122, Pages 237-247.
- DUARTE, L. R. (1983), "The stimulation of bone growth by ultrasound," Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery, Volume 101, Pages 153-159.
- DUARTE, L.R. (1977) Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. Tese de Livre Docência, Escola de Engenharia de São Carlos - USP.
- DYSON, M. (1987), "Mechanisms involved in therapeutic ultrasound", Physiotherapy, Volume 73, Pages 116-120.

- DYSON, M., FRANKS, C., SUCKLING, J. (1976), "Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound". *Ultrasonics*, Volume 14, Pages 232-236.
- DYSON, M., POND, J. B., JOSEPH, J., WARWICK, R. (1970), "Stimulation of tissue regeneration by pulsed plane-wave ultrasound". *IEEE Transaction on Sonics and Ultrasonics*, Supplement 17, Pages 133-140.
- DYSON, M., SUCKLING, J. (1978), "Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of mechanisms involved". *Physiotherapy*, Volume 64, Pages 105-108.
- FEREIRA, A. L., LISON, L., and VALERI, V. (1967), "Caryometric study of spermatogenesis in the rat". *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, Volume 6, Pages 271-278.
- GALITSKY, A. B., LEVINA, S. I. (1964), "Vascular origin of trophic ulcers and application of ultrasound as pre-operative treatment to plastic surgery", *Acta Chirurgica Plastica*, Volume 6, Pages 271-278.
- HARVEY, W., DYSON, M., POND, J. B., GRANAME, R. (1975), "The in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic levels of ultrasound", *Excepta Medica International Congress*, Series 363, Pages 10-21.
- HUCKINS, C. (1965) "Duration of spermatogenesis in pre and postpuberal Wistar rats", *Anatomical Record*, Volume 151, Page 364, (Abstr.).
- KEMPINAS, W. G. and LAMANO CARVALHO, T. L. (1988) "A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis", *Laboratory Animals*, Volume 22, Pages 154-156.
- LEBLOND, C. P., and CLERMONT, Y. (1952) "Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid - fuchsin sulfurous acid technique", *American Journal of Anatomy*, Volume 90, Pages 167-215.
- NYBORG, W. L. (1982), "Ultrasonic microstreaming and related phenomena", *British Journal of Cancer*, Supplement 45, Pages 156-160.
- PAUL, B. J., La FRATTA, C. W., DAWSON, A. R., BAAB, E., BULLOCK F. (1960), "Use of ultrasound in the treatment of pressure sores in patients with spinal cord injury", *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, Volume 41, Pages 438-440.
- ROBB, G. W., AMANN, R. P., KILLIAM, G. J. (1978), "Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, Volume 54, Pages 103-107.
- SIEGEL, S. (1975), *Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento*, Ed. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo.
- WELLS, P. N. T. (1977), "Biological Effects. In: *Biomedical Ultrasonics*", Academic Press, London, Pages 421-510.
- XAVIER, C. A. M., DUARTE, L. R. (1983), "Estimulação ultra-sônica do calo ósseo. Aplicação clínica", *Revista Brasileira de Ortopedia*, Volume 18, Pages 73-80.

STIMULATION OF THE GERMINAL EPITHELIUM OF ADULT MALE RATS BY PULSED ULTRASOUND OF LOW INTENSITY

ABSTRACT -- Testes of adult rats were stimulated by therapeutic levels of ultrasound for 20 min. a day, during 22 days. The animals were killed 35 days following interruption of insonation. Control animals were mock-insonated. Testicular and cauda epididymidis relative weights, as well as the rate of spermatogenesis, the production of spermatozoa and its concentration in the cauda epididymidis were not altered in insonated animals. Preliminary results, however, showed that ultrasonic stimulation of pre-pubertal rat testis causes a marked increase in both the weight and the fructose content of seminal vesicles, related to significantly higher plasma testosterone levels.