



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carina Teixeira Ribeiro

**Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes,  
durante e após a puberdade e o efeito do tratamento com resveratrol**

Rio de Janeiro

2013

Carina Teixeira Ribeiro

**Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade e o efeito do tratamento com resveratrol**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R484 Ribeiro, Carina Teixeira.

Avaliação do tratamento com resveratrol em ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade / Carina Teixeira Ribeiro. – 2013. 149 f.

Orientador: Marco Aurélio Pereira Sampaio.

Coorientador: Diogo Benchimol de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Testículo – Teses. 2. Espermatozóides – Teses. 3. Resveratrol - Teses. 4. Fertilidade. 5. Torção do cordão espermático. I. Sampaio, Marco Aurélio Pereira. II. Souza, Diogo Benchimol. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 611.631

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Carina Teixeira Ribeiro

**Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade e o efeito do tratamento com resveratrol**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovada em 17 de Julho de 2013

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio  
Universidade Federal Fluminense -UFF

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Jurandyr de Abreu Câmara Filho  
Universidade Federal Fluminense - UFF

---

Prof. Dr. Hildebrando Gomes Benedicto  
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2013

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, Francisco de Assis Ribeiro e Maria do Carmo Teixeira Ribeiro, por acreditarem e não medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda benção concedida, por sempre estar presente em todos os momentos difíceis que enfrentei.

Aos professores doutores Francisco José Barcellos Sampaio, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Área de Concentração Urogenital – da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e Waldemar Silva Costa coordenador do laboratório de estrutura e ultra-estrutura da Unidade de Pesquisa Urogenital do Departamento de Anatomia, por todo ensinamento e estrutura necessária para o desenvolvimento dos projetos de todos nós alunos.

Ao professor doutor Marco Aurélio Pereira Sampaio pela confiança em mim depositada, por toda atenção, orientação e dedicação fundamentais para a concretização deste trabalho.

Ao professor doutor Diogo Benchimol de Souza por todo incentivo, dedicação, orientação, atenção e amizade essenciais à realização deste trabalho.

À minha grande companheira deste projeto e amiga Raquel Milhomem Lange, por toda dedicação, companheirismo e empenho essenciais.

Ao amigo doutorando Jorge Luiz Medeiros Júnior, por toda colaboração e incentivo.

Às alunas de iniciação científica deste trabalho: Nathalia Lousada Fernandes, Ana Letícia Moraes Souza, Lígia Serrão Fróes da Cruz Baptista por toda dedicação, empenho, carinho, não medindo esforços para que tudo desse certo. Vocês foram essenciais.

Aos demais alunos de iniciação científica: Fabiana Araújo de Oliveira, Bruna Aparecida Santos, Guilherme Sampaio por toda ajuda e empenho. Em especial à aluna de iniciação científica Michele Simões Almeida Silva, que além de me ajudar em tudo que precisei se tornou uma grande amiga.

À professora Bianca Martins Gregório por todo incentivo e carinho.

A todos os colegas da Unidade de Pesquisa Urogenital, aos amigos queridos, aos familiares que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista.

Os meus enormes agradecimentos a todos vocês.

Ninguém é suficientemente perfeito que não possa aprender com o outro; e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.

*São Francisco de Assis*

## RESUMO

RIBEIRO, Carina Teixeira. *Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade e o efeito do tratamento com resveratrol*. 2013. 149 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) –Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A torção testicular (TT) é uma afecção de relativa frequência, alvo de muitos estudos clínicos e experimentais ao longo dos anos. Pode acometer qualquer idade, no entanto é mais incidente em pacientes com menos de 21 anos de idade. Sua distribuição ocorre em dois picos: um no período neonatal e outro ao redor dos 13 anos de idade. A taxa dessa morbidade em jovens com menos de 25 anos é na ordem de 1/4000. A TT resulta em rotação do cordão espermático, que gera um comprometimento do suprimento sanguíneo testicular, considerada uma urgência urológica. Depois da TT, a artéria testicular e o plexo pampiniforme sofrem oclusão, interrompem o suprimento arterial e a drenagem venosa do testículo, diminuindo o aporte de nutrientes e oxigênio aos tecidos e células, levando à isquemia testicular. Esta condição afeta a produção de espermatozóides do testículo torcido podendo comprometer a fertilidade do indivíduo. Este presente estudo avaliou a função reprodutiva, alguns parâmetros espermáticos e morfologia dos testículos de ratos adultos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade, e também o efeito do tratamento com resveratrol. Os testículos direitos dos ratos foram torcidos a 720° por quatro horas em todos os grupos, exceto no grupo controle. A TT foi realizada durante os períodos pré-púbere (4 semanas de idade), púbere (6 semanas de idade) e adulto jovem (9 semanas de idade). Para cada grupo, houve um outro grupo que os animais foram submetidos ao mesmo procedimento e foram tratados com resveratrol, 30 mg/kg resveratrol foi injetado por via intraperitonal, 30 minutos antes da destorção, seguido por gavagem por 7 dias. Cada rato na idade adulta acasalou com três fêmeas adultas com 12 semanas de idade para avaliar parâmetros de fertilidade. Todos os animais foram mortos com 14 semanas de idade e os testículos foram removidos para análise de concentração, motilidade e viabilidade dos espermatozóides de amostras colhidas da cauda dos epidídimos. Os parâmetros morfológicos foram avaliados por métodos estereológicos macro e microscópicos. A função reprodutiva dos animais nas diferentes idades não foi afetada pela TT, no entanto, após o tratamento os ratos operados com 4 e 6 semanas de idades tiveram maior potência e os ratos operados com 9 semanas de idade apresentaram maior taxa de fecundidade na idade adulta. Os parâmetros morfológicos foram afetados em todos os testículos torcidos em todas as idades. Alguns desses parâmetros melhoram após o tratamento com resveratrol, e o efeito adjuvante foi maior nos ratos submetidos à TT com 4 semanas de idade. Entretanto, o resveratrol recuperou o epitélio seminífero no grupo que sofreu TT com 9 semanas de idade, os quais não apresentaram nenhum epitélio após a TT. Os parâmetros espermáticos dos testículos torcidos decresceram em todas as idades, e o resveratrol não foi efetivo, embora tenha recuperado a produção de espermatozóides no grupo que foi submetido à TT com 9 semanas de idade, em que todos os animais foram aspermatogênicos após a TT. Não houve nenhum dano nos testículos contralaterais. O resveratrol promoveu efeito protetor para TT, principalmente quando os animais foram submetidos à TT em idade pré-púbere.

Palavras-chave: Torção testicular. Função reprodutiva. Espermatozóides. Morfologia. Resveratrol



## ABSTRACT

RIBEIRO, Carina Teixeira. *Assessment of the testes of rats testicular torsion before, during and after puberty and the effect of treatment with resveratrol*. 2013. 149 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) –Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Testicular torsion (TT) is a disease relatively frequent, which was assessed in many experimental and clinical studies over the years. TT can occur in any age, but is more common in patients under 21 years old, mostly in neonatal period and around 13 years old. The rate of this disease in youths under 25 years is about 1/400. The TT also twists the spermatic cord, which generates an impairment of the testicular blood supply and is considered a urological emergency. After TT, the testicular artery and pampiniform plexus become occluded, disrupting arterial supply and venous drainage of the testis, decreasing provision of nutrients and oxygen for tissues and cells, leading to testicular ischemia. This condition affects sperm production of the twisted testicle and may impair the fertility. This study assessed reproductive function, some morphological and spermatic parameters in adult rats which underwent experimental TT before, during and after puberty and also the effect of the treatment with resveratrol. Right testicles of rats were twisted 720° for 4 hours in all groups except the control group. TT was done during the prepubertal period (4 weeks old), puberty (6 weeks old) and young adult period (9 weeks old). For each group, there was another group which animals underwent the same procedure and were treated with resveratrol, 30 mg/kg resveratrol was injected by an intraperitoneal route, 30 minutes before detorsion, followed by gavage for 7 days. Each rat in adulthood was mated with three adult females at 12 weeks old, in order to assess parameters of fertility. All animals were killed at 14 weeks old and testes were removed for analyses Concentration, motility and viability of spermatozoids were evaluated on samples taken from the tail of the epididymis. Morphological parameters were evaluated by macroscopic and microscopic stereological methods. Reproductive function of animals at different ages was not affected by TT, however, after treatment with resveratrol, rats operated at 4 and 6 weeks old presented greater potency and animals operated at 9 weeks old showed higher fertility rate in adulthood. Morphological parameters were affected in all twisted testes at all ages. Some of these parameters improved after treatment with resveratrol and the adjuvant effect was greater in rats which underwent TT at 4 weeks old. However, resveratrol recovered the seminiferous epithelium in the group that suffered TT at 9 weeks of age, which did not show any epithelium after TT. The spermatic parameters decreased in all ages and the resveratrol did not affect it, despite it has recovered sperm production in group that underwent TT with 9 weeks old, once all animals were azoospermic after the TT. There was almost no damage in the contralateral testis. Resveratrol promoted protective effect for TT, mainly when animals underwent TT at prepubertal age.

Keyword: Testicular torsion. Reproductive function. Spermatozoids. Morphology.  
Resveratrol

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Desenho esquemático do corte transversal de testículo.....	23
Figura 2 -	Corte transversal do túbulo seminífero de rato .....	25
Figura 3 -	Ilustração da torção testicular intravaginal.....	28
Figura 4 -	Esquema das principais vias de geração e metabolismo das espécies reativas de oxigênio.....	29
Figura 5 -	Vinho tinto, uma das fontes de resveratrol.....	33
Quadro 1 -	Divisão dos animais machos nos diferentes grupos experimentais conforme a idade na intervenção cirúrgica e os tratamentos realizados..	36
Figura 6 -	Testículo direito imediatamente após a sua rotação.....	37
Figura 7 -	Células do epitélio vaginal de rata na fase de estro (fase de ovulação)...	40
Figura 8 -	Células do epitélio vaginal de rata na fase de estro (fase de ovulação) com presença de espermatozoides (seta).....	41
Figura 9 -	Avaliação da viabilidade dos espermatozoides pelo teste hiposmótico.....	45
Figura 10 -	Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	48
Figura 11 -	Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	49
Figura 12 -	Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	50
Figura 13 -	Testículo direito após 4 horas de torção.....	56
Figura 14 -	Fotomicrografia dos espermatozóides na câmara de Neubauer em análise sob contraste de fase.....	60
Figura 15 -	Concentração dos espermatozóides dos epidídimos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada:(CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	61
Figura 16 -	Motilidade dos espermatozóides dos epidídimos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4 e 6 semanas).....	62

Figura 17 - Viabilidade dos espermatozóides dos epidídimos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4 e 6 semanas).....	63
Figura 18 - Peso dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	64
Figura 19 - Volume dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	65
Figura 20 - Testículo direito de um animal submetido à cirurgia simulada (à esquerda), e testículo direito de um animal submetido à TT com 4 semanas de idade (à direita).....	65
Figura 21 - Diâmetro dos túbulos seminíferos dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	66
Figura 22 - Altura do epitélio seminífero dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	67
Figura 23 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	68
Figura 24 - Densidade volumétrica do epitélio seminífero dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	69
Figura 25 - Densidade volumétrica do compartimento tubular dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	70
Figura 26 - Densidade volumétrica do espaço intersticial dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	71
Figura 27 - Densidade volumétrica dos vasos sanguíneos dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	72

Figura 28 - Comprimento dos túbulos seminíferos dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	73
Figura 29 - Escore de Johnsen dos túbulos seminíferos dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	74
Figura 30 - Proliferação celular do espaço tubular dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	75
Figura 31 - Proliferação celular do espaço intersticial dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	76
Figura 32 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de ratos.....	77
Figura 33 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	81
Figura 34 - Proliferação celular do espaço intersticial dos testículos esquerdos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	82
Figura 35 - Testosterona sérica dos ratos adultos submetidos à torção testicular com 4, 6 ou 9 semanas de idade.....	89
Figura 36 - Densidade volumétrica do epitélio seminífero dos testículos direitos dos ratos submetidos à torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	91
Figura 37 - Peso dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	98
Figura 38 - Volume dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	99

Figura 39 -	Altura do epitélio seminífero dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	100
Figura 40 -	Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	101
Figura 41 -	Volume absoluto do lúmen tubular dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	102
Figura 42 -	Volume absoluto do compartimento tubular dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	103
Figura 43 -	Densidade do compartimento intertubular dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	104
Figura 44 -	Densidade volumétrica dos vasos dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	105
Figura 45 -	Comprimento dos túbulos seminíferos dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	106
Figura 46 -	Proliferação celular do espaço tubular dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	107

Figura 47 -	Proliferação celular do espaço intersticial dos testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas).....	108
Figura 48 -	Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	109
Figura 49 -	Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato.....	110
Quadro 2 -	Resumo dos resultados das avaliações histológicas nas três idades submetidas à TT e tratadas com resveratrol.....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4 e TT4, respectivamente).....	57
Tabela 2 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6 e TT6, respectivamente).....	58
Tabela 3 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9 e TT9, respectivamente).....	58
Tabela 4 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4D e TT4D, respectivamente).....	78
Tabela 5 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6D e TT6D, respectivamente).....	79
Tabela 6 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9D e TT9D, respectivamente).....	80
Tabela 7 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4E e TT4E, respectivamente).....	83
Tabela 8 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6E e TT6E, respectivamente).....	83

Tabela 9 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9E e TT9E, respectivamente).....	83
Tabela 10 -	Resultados numéricos das análises dos parâmetros dos espermatozóides dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4E e TT4E, respectivamente).....	84
Tabela 11 -	Resultados numéricos das análises dos parâmetros dos espermatozóides dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6E e TT6E, respectivamente).....	84
Tabela 12 -	Resultados numéricos das análises dos parâmetros dos espermatozóides dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9E e TT9E, respectivamente).....	84
Tabela 13 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4E e TT4E, respectivamente).....	85
Tabela 14 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6E e TT6E, respectivamente).....	86
Tabela 15 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9E e TT9E, respectivamente).....	87
Tabela 16 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.....	88
Tabela 17 -	Resultados numéricos das avaliações dos espermatozóides dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades .....	89



Tabela 18 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.....	90
Tabela 19 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.....	92
Tabela 20 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 4 semanas de idade (CTRL4, TT4 e RES4 respectivamente).....	93
Tabela 21 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 6 semanas de idade (CTRL6, TT6 e RES6 respectivamente).....	94
Tabela 22 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 9 semanas de idade (CTRL9, TT9 e RES9 respectivamente).....	94
Tabela 23 -	Resultados numéricos dos parâmetros dos espermatozóides dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 4 semanas de idade (CTRL4, TT4 e RES4 respectivamente).....	95
Tabela 24 -	Resultados numéricos dos parâmetros dos espermatozóides dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 6 semanas de idade (CTRL6, TT6 e RES6 respectivamente).....	96
Tabela 25 -	Resultados numéricos dos parâmetros dos espermatozóides dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 9 semanas de idade (CTRL9, TT9 e RES9 respectivamente).....	96

Tabela 26 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos ratos submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 4 semanas de idade (CTRL4, TT4 e RES4 respectivamente).....	97
Tabela 27 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos ratos submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 6 semanas de idade (CTRL6, TT6 e RES6 respectivamente).....	98
Tabela 28 -	Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos ratos submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 9 semanas de idade (CTRL9, TT9 e RES9 respectivamente).....	97
Tabela 29 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos testículos direitos dos animais com 4 semanas de idade submetidos à cirurgia simulada, torção testicular e torção testicular tratados com resveratrol (CTRL4D, TT4D e RES4D, respectivamente).....	111
Tabela 30 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos testículos direitos dos animais com 6 semanas de idade submetidos à cirurgia simulada, torção testicular e torção testicular tratados com resveratrol (CTRL6D, TT6D e RES6D, respectivamente).....	112
Tabela 31 -	Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos testículos direitos dos animais com 9 semanas de idade submetidos à cirurgia simulada, torção testicular e torção testicular tratados com resveratrol (CTRL9D, TT9D e RES9D, respectivamente).....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
cels	Células
CEUA	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso com Animais
CL	Célula de Leydig
ct	Compartimento tubular
CTRL	Grupo controle
D	Direito
D[ts]	Diâmetro do túbulo seminífero
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Esquerdo
ELISA	Método de ensaio imunoenzimático
EPG	Espermatogônia
EPT	Espermátide
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESPZ	Espermatozoide
ESTP	Espermatócito primário
FSH	Hormônio folículo estimulante
I/R	Isquemia/reperfusão
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	Imunoglobulina G
LH	Hormônio luteinizante
NP	Não protegeu
PAS	Ácido periódico de shiff
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PP	Protegeu parcialmente
PT	Protegeu totalmente
RES	Grupo tratado com resveratrol
TT	Torção testicular
VGEF	Expressão do fator de crescimento endotelial

Vt	Volume testicular
VT	Volume do testículo
Vv	Densidade volumétrica
Vv[ct]	Densidade volumétrica do compartimento tubular

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus centígrados
%	Porcentagem
µm	Micrômetro
°	Grau de rotação
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Dióxido de hidrogênio
NO <sup>-</sup>	Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
g	Grama
±	Mais ou menos
n	Número amostral
mg	Miligrama
Kg	Kilograma
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
X	Multiplicação
pH	Potencial de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
<	Menor que
>	Maior que
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
m	Metro
=	Igual

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
1.1	<b>Geral</b> .....	34
1.2	<b>Específicos</b> .....	34
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	35
2.1	<b>Animais e Intervenções experimentais</b> .....	35
2.1.1.	<u>Animais</u> .....	35
2.1.2	<u>Torção testicular</u> .....	36
2.1.3	<u>Tratamento com resveratrol</u> .....	38
2.1.4	<u>Eutanásia</u> .....	39
2.2	<b>Coleta de dados</b> .....	39
2.2.1	<u>Teste de fertilidade</u> .....	39
2.2.2	<u>Dosagem de testosterona sérica</u> .....	42
2.2.3	<u>Avaliações dos espermatozoides</u> .....	43
2.2.3.1	Concentração de espermatozoides.....	43
2.2.3.2	Motilidade dos espermatozoides.....	44
2.2.3.3	Viabilidade dos espermatozoides.....	44
2.2.4	<u>Avaliações biométricas</u> .....	45
2.2.5	<u>Análises histológicas</u> .....	46
2.2.5.1	Avaliações morfométricas.....	46
2.2.5.1.1	Diâmetro do túbulo seminífero.....	47
2.2.5.1.2	Altura do epitélio do túbulo seminífero.....	48
2.2.5.1.3	Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares.....	49
2.2.5.1.4	Volume absoluto das diferentes estruturas testiculares.....	50
2.2.5.1.5	Comprimento total dos túbulos seminíferos.....	51
2.2.5.2	Escore de Johnsen.....	51
2.2.5.3	Avaliação da proliferação celular no testículo.....	52
2.2.5.4	Avaliação do colágeno no testículo.....	53
2.3	<b>Análise estatística</b> .....	53
3	<b>RESULTADOS</b> .....	56

3.1	<b>Função reprodutiva e testosterona sérica de animais submetidos à TT unilateral em diferentes idades.....</b>	57
3.1.1	<u>Teste de fertilidade.....</u>	57
3.1.2	<u>Dosagem da testosterona sérica.....</u>	59
3.2	<b>Produção espermática e morfologia de testículos submetidos à TT em diferentes idades.....</b>	59
3.2.1.	<u>Avaliações dos espermatozoides.....</u>	59
3.2.2	<u>Avaliação biométrica.....</u>	63
3.2.3	<u>Avaliações histológicas.....</u>	66
3.2.3.1	Avaliações morfométricas.....	66
3.2.3.2	Escore de Johnsen.....	73
3.2.3.3	Avaliação da proliferação celular no testículo.....	74
3.2.3.4	Avaliação do colágeno no testículo.....	81
3.3	<b>Produção espermática e morfologia de testículos contralaterais (esquerdos) após TT ipsilateral (dos testículos direitos) em diferentes idades.....</b>	82
3.4	<b>Influência do momento da indução experimental da TT sobre as alterações da função reprodutiva, produção espermática e morfologia testicular na idade adulta.....</b>	88
3.4.1	<u>Teste de fertilidade.....</u>	88
3.4.2	<u>Dosagem da testosterona sérica.....</u>	88
3.4.3	<u>Avaliações dos espermatozoides.....</u>	89
3.4.4	<u>Avaliação biométrica.....</u>	90
3.4.5	<u>Análises histológicas.....</u>	90
3.5	<b>Efeito do tratamento pós-operatório com resveratrol como protetor da função reprodutiva, produção espermática e morfologia de testículos em animais submetidos à TT em diferentes idades.....</b>	93
3.5.1	<u>Teste de fertilidade.....</u>	93
3.5.2	<u>Análises dos espermatozóides.....</u>	95
3.5.3	<u>Análises biométricas.....</u>	96

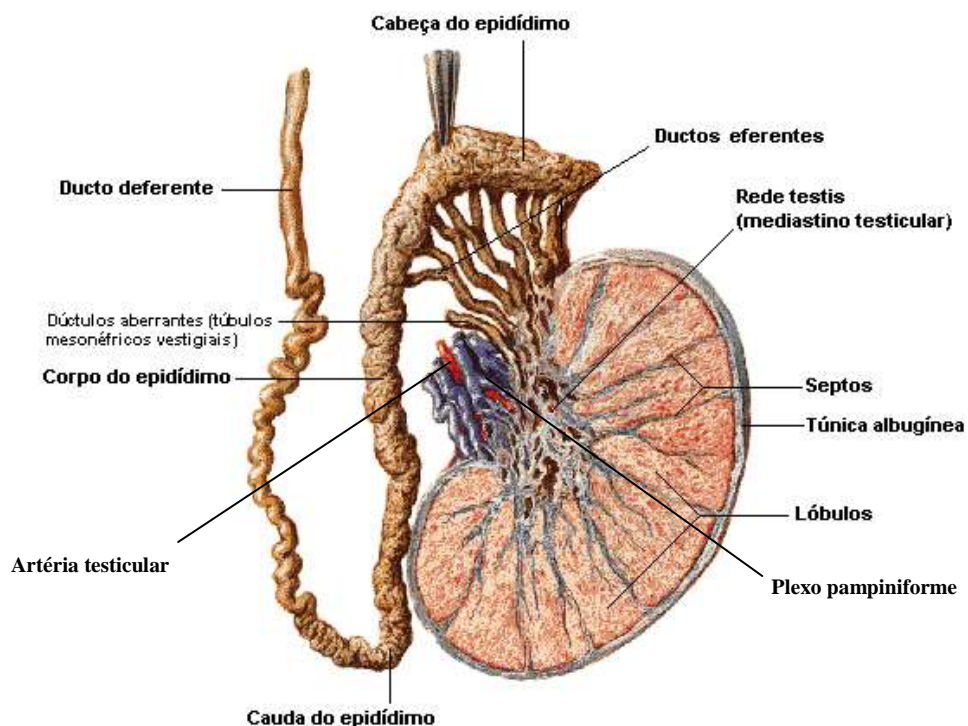
3.5.4	<u>Análises histológicas</u> .....	99
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	115
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	123
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	124
	<b>APÊNDICE</b> – Soluções utilizadas no experimento .....	131
	<b>ANEXO A</b> – Autorizações pela Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais .....	136
	<b>ANEXO B</b> - Artigo elaborado da dissertação submetido ao The Journal of Urology .....	138
	<b>ANEXO C</b> - Artigo elaborado e publicado durante o Mestrado .....	140



## INTRODUÇÃO

Os testículos são órgãos produtores dos espermatozoides e hormônios esteróides, principalmente androgênios, sobretudo a testosterona. Nos mamíferos, estes órgãos possuem formato oval e se desenvolvem retroperitonealmente na cavidade abdominal. No decorrer do desenvolvimento fetal os testículos migram e se alojam no escroto, onde ficam suspensos pelo cordão espermático. Os testículos são recobertos por uma cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que emite septos para o interior do parênquima testicular (Figura 1). Ao migrarem para o escroto, os testículos arrastam consigo um saco de membrana serosa, a túnica vaginal, derivada do peritônio. Esta túnica possui uma camada parietal (externa) e uma camada visceral (interna) (1, 2).

Figura 1 – Desenho esquemático do corte longitudinal de testículo



Fonte: adaptado de NETTER FH, 2011 (3).

O testículo pode ser dividido funcionalmente em compartimento tubular possuindo funções endócrinas e exócrinas, e em compartimento intertubular, que possui função endócrina, de sustentação e nutrição do órgão (4).

O compartimento tubular, formado pelos túbulos seminíferos, compreende cerca de 70 a 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos já estudados (4). Os túbulos seminíferos são estruturas delimitadas externamente por uma túnica própria, e formados por epitélio seminífero e lúmen. A túnica própria é composta por membrana basal, fibras colágenas e células mióides ou peritubulares (1). O epitélio seminífero é composto pelas células da linhagem espermatogênica e pelas células de Sertoli. As células da linhagem espermatogênica são responsáveis pela produção de espermatozóides, processo chamado de espermatogênese. Este processo é estimulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH) juntamente com a testosterona. As células da linhagem espermatogênica são constituídas por espermatogônias (células diplóides), que são as células mais basais que sofrem sucessivas mitoses para originarem os espermatócitos primários (células diplóides). Estes sofrem a primeira divisão meiótica e formam os espermatócitos secundários (células haplóides), que sofrem a segunda divisão meiótica para formarem as espermátides (células haplóides). Estas, por fim, sofrem sucessivas modificações até se transformarem em espermatozóides (células haplóides), num processo denominado de espermiogênese. As espermátides inicialmente possuem formato arredondado. Conforme as sucessivas modificações que ocorrem até a transformação final em espermatozóides, as espermátides perdem o citoplasma e adquirem formato mais alongado (Figura 2). Durante este processo, ocorre a formação da cauda ou flagelo do espermatozóide que permite sua mobilidade. A formação da cauda do espermatozóide ocorre no sentido oposto à formação da cabeça do espermatozóide (onde se localiza o núcleo com o DNA). Uma importante estrutura, também desenvolvida durante este processo, o acrossomo, fica localizado acima da porção rostral da cabeça do espermatozóide. O acrossomo é um estrutura essencial para o sucesso da fertilização, pois secreta enzimas necessárias para permitir a penetração do espermatozóide ao oócito (1, 4).

Figura 2 – Corte transversal do túbulo seminífero de rato



Legenda: células da linhagem espermatogênica: CS – célula de sertoli; EPG – espermatogônia; ESTP – espermatócito primário, EPT – espermatíde; ESPZ – espermatozoide. Espaço intersticial: CL – célula de Leydig.

Nota: PAS, 1000x

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Quando os espermatozóides formam-se no interior do lúmen tubular são propulsionados em direção à rede testicular. Esta estrutura conecta-se aos ductos eferentes que desembocam na primeira porção do epidídimo, a cabeça, passando pelo corpo e finalmente chega à cauda do epidídimo, local em que os espermatozóides permanecem armazenados até o momento da ejaculação. Os espermatozóides então passam pelo processo fisiológico de maturação, que é um pré-requisito para a fertilidade masculina. Na cauda do epidídimo, os espermatozoides ganham motilidade, e quando ocorre à ejaculação, eles são liberados junto com as secreções produzidas pelas glândulas acessórias masculinas (ampolas, vesículas seminiais, próstata e bulbouretais) necessárias para o processo de fertilização (2).

Já as células de Sertoli possuem sua base aderida à lâmina basal dos túbulos seminíferos, e suas extremidades apicais no lúmen dos túbulos. Estas células envolvem parcialmente as células da linhagem espermatogênica. São ainda responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fluido para o lúmen tubular,

participação na espermição, fagocitose, nutrição das células germinativas e regulação das gonadotrofinas pituitárias (1, 4). Desta forma é considerada uma célula de grande importância no processo espermatogênico.

O compartimento intertubular preenche os espaços entre os túbulos seminíferos. Este é composto por nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, por uma variável população celular constituída por macrófagos, mastócitos, células conjuntivas indiferenciadas, fibroblastos e principalmente por células de Leydig. Estas são as células mais abundantes deste compartimento e responsáveis pela produção de testosterona e estradiol. A produção desses hormônios ocorre sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) (1, 4).

As principais células precursoras de Leydig são as células mesenquimais. Mas outros tipos celulares como as células mióides, as células endoteliais dos vasos linfáticos e células perivasculares testiculares também podem dar origem às células de Leydig (4, 5). Estas começam a se proliferar após o nascimento sob estímulo do LH, e permanecem quiescentes até a puberdade. Nesta fase da maturidade sexual, ocorrem maior proliferação e produção dos hormônios androgênicos (6). Sua proliferação também é regulada pelas células de Sertoli, macrófagos e pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Já de forma antagonica, sua proliferação é limitada pelo efeito inibitório do hormônio estradiol (6).

Os hormônios androgênicos além de serem responsáveis pela diferenciação dos órgãos genitais masculinos na fase fetal são ainda responsáveis na puberdade pelo surgimento dos caracteres sexuais secundários e pela espermatogênese. Sua ação nos testículos é ampla de forma que encontram receptores localizados nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos sanguíneos, no núcleo das espermatogônias e na própria célula de Leydig (7).

O suprimento sanguíneo testicular provem da artéria testicular (Figura 1), que se origina da face ântero-lateral da aorta abdominal. Esta artéria é espiralada de forma a formar um “cone” vascular no cordão espermático. Ao penetrar no testículo, a artéria testicular se ramifica em várias arteríolas que fornecerão nutrientes necessários para a realização das funções endócrinas e exócrinas do órgão, assim como para a manutenção da arquitetura tecidual (8).

A drenagem do órgão é feita pelo plexo pampiniforme (Figura 1), que consiste em um grupo de veias que se situam anteriores ao ducto deferente envolvendo a artéria testicular no cordão espermático. Estas veias também possuem função de termorregulação do testículo. O plexo pampiniforme ao envolver a artéria testicular promove um sistema de troca de calor por contracorrente. Isso ocorre porque o sangue arterial é pré-resfriado antes de chegar ao

testículo em decorrência da troca de calor com o plexo pampiniforme, que por sua vez tem o sangue aquecido antes de entrar no abdome. Desta forma, o testículo permanece em um ambiente com temperatura inferior a 1°C ao restante do corpo. A veia testicular esquerda origina-se no plexo pampiniforme e drena para a veia renal esquerda. Já a veia renal direita possui uma origem e trajetória semelhantes, mas drena para a cava inferior. Tanto a artéria testicular quanto o plexo pampiniforme estão localizados no cordão espermático por onde os testículos estão suspensos. (1, 2, 8). Outra importante estrutura também responsável pela termorregulação dos testículos é o músculo cremáster. Este corre paralelo ao cordão espermático e se insere na extremidade superior do testículo (8).

No cordão espermático também passam os nervos e os vasos linfáticos testiculares que drenam para os linfonodos lombares. A inervação do testículo é proveniente de fibras parassimpáticas vagais e fibras simpáticas do plexo testicular, e por um ramo genital do nervo genitofemoral (8).

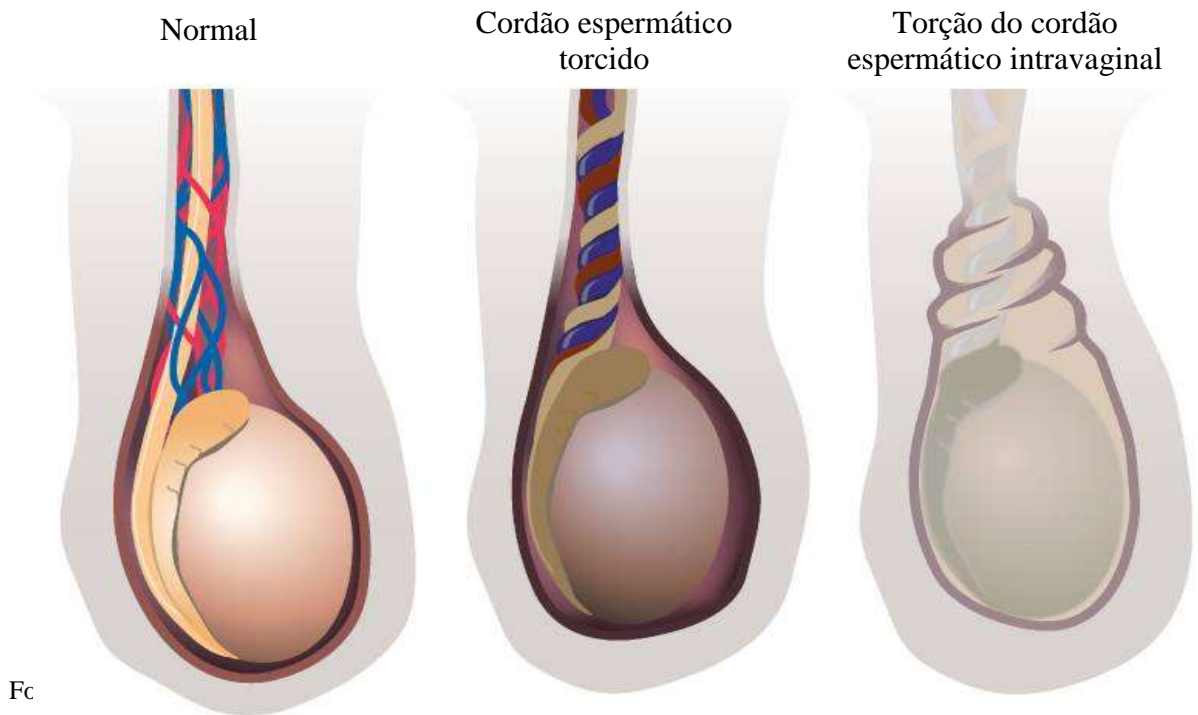
Os testículos de rato possuem formato oval similar ao do homem, no entanto são maiores proporcionalmente em comparação ao do homem em relação ao tamanho corporal. As estimativas percentuais do parênquima testicular ocupadas pelos túbulos seminíferos são de 83% e 62% no rato e no homem, respectivamente (2). Embora os testículos de ratos diferem um pouco dos testículos do homem, e considerando o aspecto patológico da TT, que não acomete os ratos, estes animais têm sido amplamente utilizados como modelos em estudos experimentais de torção testicular, e considerados bons modelos. Isso porque, as lesões encontradas nos testículos de ratos são muito semelhantes às encontradas nos testículos do homem, como relatado por Lee et al. (2012) (9), que ao induzirem TT à 720 ° durante 5 horas em ratos, relataram que as lesões testiculares foram similares às encontradas no homem.

Os espermatozóides dos ratos diferem aos do homem quanto ao tamanho e conformação notadamente curvada dos acrossomos dos espermatozoides do rato. Esta característica determina o encurvamento da cabeça do espermatozóide denominada de “cabeça em foíce”. Enquanto que a cabeça do espermatozóide do homem tem formato oval. Quanto ao tamanho, os espermatozóides do homem têm aproximadamente 50 µm comprimento contra 150 a 250 µm em ratos (2).

A torção testicular (TT) é uma urgência urológica ocasionada pela rotação do cordão espermático sobre o seu eixo (Figura 1). Esta condição induz mudanças bioquímicas e morfológicas testiculares causadas por isquemia, agravados pela reperfusão após a destorção do órgão afetado (10). Pode acometer qualquer idade, entretanto, ocorre mais frequentemente no período neonatal, em crianças e principalmente em adolescentes. (11, 12). Segundo

Mansbach, Forbes e Peters (2005) (13) para cada 100 mil homens nos Estados Unidos com menos de 25 anos de idade, aproximadamente 4,5 terão TT por ano. Já Ringdahl e Teague (2006) (14) relataram que a taxa dessa morbidade em jovens com menos de 25 anos é da ordem de 1/4000.

Figura 3 - Ilustração da torção testicular intravaginal



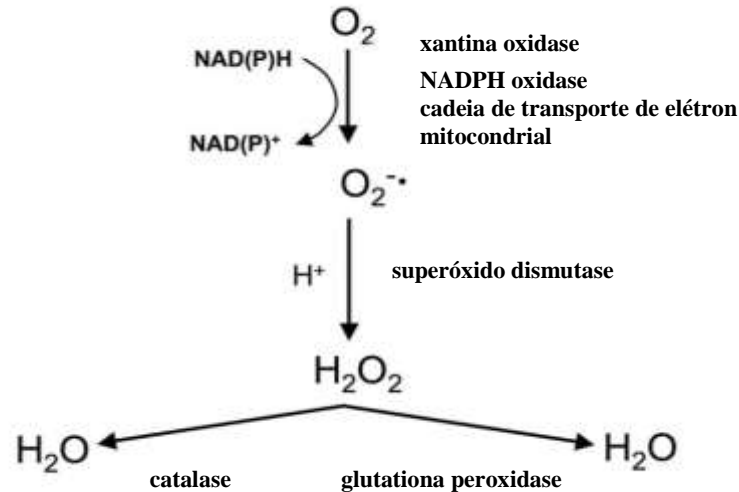
Fc

A TT pode ser classificada em dois tipos: extra ou intravaginal. A extravaginal (fora da túnica vaginal) ocorre mais comumente em recém-nascidos nos primeiros dias de vida, na fase final de fixação dos testículos. A TT extravaginal está associada com a não fixação da túnica vaginal no escroto, que ocorre ao nível do cordão espermático. Já a do tipo intravaginal (dentro da túnica vaginal) é causada por uma malformação congênita do processo vaginal que está relacionada com a túnica vaginal envolvendo o testículo e a maior parte do epidídimo, como também o cordão espermático permitindo livre rotação das estruturas dentro da túnica. Este tipo ocorre na maioria dos casos de torção testicular em crianças e adultos, sendo o seu pico na puberdade (16). Favorito, Cavalcante e Costa (2004) (17) em estudo em que se avaliou 50 testículos torcidos de pacientes com idade entre 12 e 23 anos, mostraram que a torção intravaginal é o tipo mais frequente.

O grau de TT pode variar de 180° a 1080° (18). Quando ocorre a TT, inicialmente ocorre a oclusão do retorno venoso comprometendo a drenagem do órgão afetado, culminando em edema e ruptura vascular. Posteriormente, ocorre a oclusão arterial inibindo o aporte de oxigênio e nutrientes aos tecidos e células, instalando um quadro de isquemia testicular generalizada. Mediante a instalação desse quadro isquêmico, começa a desencadear a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), que são altamente deletérias às células (19). Estas ERO, tais como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil (OH), dióxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ou ERN como o óxido nítrico ( $NO^-$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) são substâncias tóxicas, e quando estão acima dos níveis fisiológicos caracteriza o fenômeno conhecido como estresse oxidativo (9, 20).

As ERO e ERN são produzidas em condições fisiológicas, no entanto são eliminadas por enzimas do sistema antioxidante endógeno, que desempenham um papel importante no controle da eliminação dessas substâncias altamente nocivas às células. Essas enzimas constituintes do sistema de defesa incluem a superóxido dismutase, glutatona peroxidases, catalase e glutatona-S-transferas (Figura 4). No entanto, quando ocorre a geração exacerbada das ERO ou ERN, como em casos de TT, excede a capacidade do mecanismo de defesa endógeno. Quando isso ocorre, o estresse oxidativo é gerado e contribui para a formação de lesões reversíveis ou irreversíveis às células, de acordo com o grau e o tempo em que o órgão permaneceu torcido (21).

Figura 4 – Esquema das principais vias de geração e metabolismo das espécies reativas de oxigênio



Fonte: Adaptado de

A restauração do fluxo sanguíneo ao testículo após sofrer TT é essencial para salvar o tecido isquemiado. No entanto, a reperfusão possui um efeito paradoxo, pois o sangue rico em oxigênio leva ao aumento das lesões, devido o oxigênio funcionar como substrato oxidável às enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase na geração de mais ERO. Portanto, a reperfusão, que é necessária para promover a reoxigenação e nutrição do tecido, pode, também, intensificar ainda mais o grau de lesão celular, podendo causar danos irreversíveis quanto maior for o tempo de torção e rotação (22, 23)

Em casos de TT, o estresse oxidativo pode culminar em injúrias às células germinativas, podendo levar a uma redução de espermatozóides do órgão afetado. Mais precisamente, espermatozóides submetidos ao estresse oxidativo sofrem efeitos deletérios tais como peroxidação lipídica da membrana celular, injúria da peça intermediária e das estruturas do axonema, bem como malformação da capacitação e reações acrossomais, que levam a perda da concentração e da motilidade dos mesmos (24). Também pode afetar as células de Leydig com redução da sua proliferação ou no que acreditam ser por perda da sua sensibilidade ou resposta ao LH (25). Desta forma, pode levar à redução dos níveis séricos de testosterona, que pode contribuir para a perda da espermatogênese (26). Em decorrência, pode afetar negativamente a fertilidade do indivíduo acometido (25).

A respeito do efeito da torção unilateral nos testículos contralaterais ainda há muitas controvérsias. Alguns estudos em ratos, a TT promoveu danos no testículo contralateral, com



alterações histológicas e espermatogênicas. Estas alterações foram encontradas no estudo de Kar et al. (2010) (27) nos testículos contralaterais após 4 horas de torção, tanto nos que foram retirados e analisados logo após esse período, quanto nos que foram retirados e analisados após dois meses da realização da TT. Nestes, encontraram diminuição do escore de Johnsen, do diâmetro do túbulo seminífero e aumento de apoptose. De acordo com Schanaider, Aiex e Errico (2011) (28), esse fenômeno de injúria no testículo contralateral pode ser atribuído a mecanismos autoimune, como a presença de imunoglobulina G (IgG) depositado na membrana basal do túbulo seminífero. Em humanos, encontraram danos no contralateral com presença de apoptose principalmente dos espermátócitos, espermátides e das células de Sertoli (29). No entanto, outros estudos não encontraram danos nos testículos contralaterais (23, 25, 30-32).

A TT desenvolve-se subitamente, e o testículo afetado irradia uma dor severa nos quadrantes inferiores do abdômen ou períneo. De maneira semelhante a doenças do escroto agudo, os indivíduos acometidos geralmente apresentam-se com náusea, vômito, febre e inchaço escrotal. As manifestações clínicas de TT são muito similares àquelas encontradas nas demais doenças caracterizadas como escroto agudo, tais como hérnia inguinal escrotal estrangulada, orquite aguda, epididimite aguda e torção de apêndices testiculares (33).

O diagnóstico e tratamento de TT deve ser o mais rápido possível. Geralmente ao exame físico é percebido um “nó” no cordão espermático acompanhado de edema e hiperemia local (34). Cos e Rabinowitz (1982) (35) observaram que em crianças a perda do reflexo cremastérico pode indicar TT. No entanto, há a necessidade de diagnóstico complementar, que para tal são utilizadas modalidades de imagens, sendo o mais comum o ultrassom Doppler. Na torção completa, o fluxo de sangue é completamente interrompido, e facilmente diagnosticado no Doppler. Estes resultados ajudam a direcionar a conduta cirúrgica mais adequada (14).

Todos os casos de TT devem ser tratados com intervenção cirúrgica urgente, a fim de evitar a perda do testículo afetado (13). A cirurgia consiste em destorção manual do testículo, retornando-o à sua posição anatômica e orquipedexia (36). De acordo com os achados em humanos, Sessions et al. (2003) (18) relataram que a média de tempo da apresentação dos sintomas até a avaliação foi de 5 e 52,8 horas, respectivamente para os testículos recuperados (os que foram mantidos) e removidos. Já Anderson e Williamson 1988 (37) mostraram que após 12 horas de TT em humanos, 75% dos casos foram submetidos à orquiectomia, devido a presença de necrose o que torna o órgão inviável. A decisão de manter ou retirar o testículo torcido está implicado na reversão da isquemia do órgão, que está correlacionado ao grau de

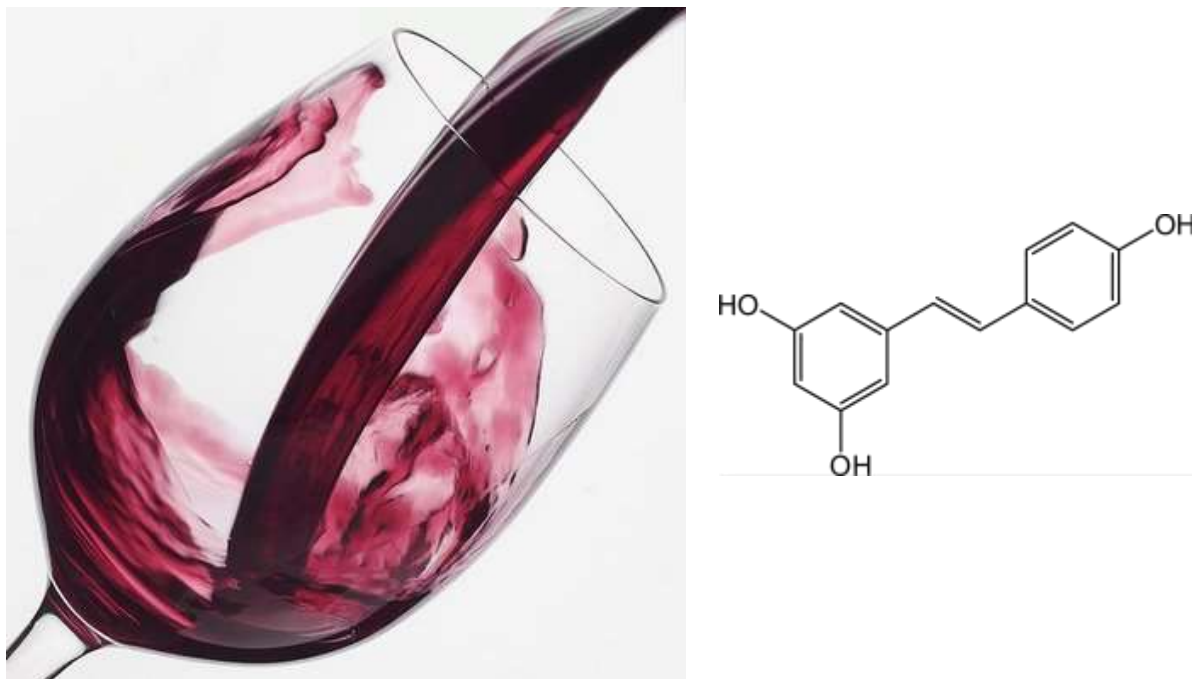
torção e o tempo em que o órgão permaneceu torcido. Se após a destorção do testículo não houver a reversão do quadro isquêmico, é então indicada a orquiectomia, pois neste caso o testículo já encontra-se necrosado e inviável. Indica-se ainda, por medida de profilaxia, a orquipexia do testículo contralateral (38, 39).

Os fatores mais importantes relacionados ao prognóstico de TT são o tempo e grau de torção (18). Este mesmo estudo avaliou 186 indivíduos com TT, e em 38% destes casos foi necessária a orquiectomia, enquanto no restante a destorção com orquipexia do órgão foi efetiva. Importante ressaltar que nos casos de orquipexia a média de rotação do testículo foi de 360°, e nos casos de orquiectomia, a média de rotação foi de 540°. Em situações de orquiectomia, pode ainda ocorrer o comprometimento da fertilidade, uma vez que o testículo contralateral pode sofrer danos decorrentes da deposição de IgG na membrana basal do túbulo seminífero, em resposta à TT do testículo ipsilateral, que pode acarretar em perda das células germinativas (14).

Como já mencionado anteriormente, a I/R decorrentes da TT induzem ao estresse oxidativo, que é altamente deletério às células. Diante disso, vários métodos e fármacos foram investigados na tentativa de minimizar as lesões provocadas pela I/R testicular em modelo experimental, como os ratos. O uso de componentes com propriedades antioxidantes, tais como melatonina, curcumina, taurina, alopurinol, n-acetilcisteína, licopeno, rutina e resveratrol foram eficientes em proteger os testículos após TT experimental em ratos, por efetuarem a remoção das ERO e/ou modular as enzimas antioxidantes endógenas (40-47).

O resveratrol (3,5,4'- triidrox-trans-estilbeno), considerado um potente antioxidante, é um flavonóide presente em diversas fontes de alimentos, tais como uvas, amendoim e mais de 70 outras fontes alimentares (48, 49). Também é especialmente abundante em vinhos tinto (Figura 5). O resveratrol também possui propriedades antiinflamatórias, é um potente antiagregante plaquetário, vasodilatador, cardioprotetor e auxilia no combate ao câncer por possuir propriedades quimiopreventivas (50-52).

Figura 5 – Vinho tinto, uma das fontes de resveratrol



Nota: adaptado de <http://qnint.s bq.org.br> e [poshumanos.com](http://poshumanos.com), 2012.

O mecanismo pelo qual o resveratrol exerce seus efeitos anti-oxidativo e anti-inflamatório tem sido atribuído à sua atividade de inibição de espécies reativas de oxigênio, bem como seus efeitos sobre o óxido nítrico, a modulação de citocinas inflamatórias e quimiocinas (48, 53). Tais propriedades fizeram com que o resveratrol fosse utilizado com sucesso como protetor em diferentes modelos de lesões por isquemia e reperfusão (I/R) neuronal, cardíaca, hepática, intestinal e testicular (47, 48, 54-57).

O resveratrol foi utilizado também como protetor em TT experimental em ratos. Em dois estudos, o uso do resveratrol promoveu redução significativa nas lesões provocadas pelo estresse oxidativo, bem como a redução no número de células germinativas apoptóticas (47, 58).

A maioria dos estudos mencionados utilizou ratos como modelo animal e em idades que correspondiam ou a puberdade e/ou a fase adulta. No entanto, nenhum desses estudos fez avaliação quantitativa da estrutura testicular tanto do testículo torcido quanto do seu contralateral, bem como o efeito sobre os níveis séricos de testosterona e sobre a função reprodutiva após TT em idades pré-púbere, púbere e adulto jovem em um mesmo estudo. Tampouco se estudou o efeito protetor do resveratrol sobre esses parâmetros em animais que foram submetidos à TT nestas diferentes fases de maturação sexual.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Geral

Avaliar a função reprodutiva e os testículos de ratos adultos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade, e o efeito adjuvante do tratamento com resveratrol.

### 1.2 Específicos

- a) Estudar a função reprodutiva e concentração de testosterona sérica de animais submetidos à TT unilateral em diferentes idades.
- b) Estudar a produção espermática e a morfologia de testículos submetidos à TT em diferentes idades.
- c) Estudar a produção espermática e a morfologia de testículos contralaterais (esquerdos) após TT ipsilateral (dos testículos direitos) em diferentes idades.
- d) Estudar a influência do momento da indução experimental da TT (pré-pubertal, durante a puberdade e em adultos jovens) sobre as alterações da função reprodutiva, produção espermática, testosterona sérica e morfologia testicular na idade adulta.
- e) Avaliar o tratamento pós-operatório com resveratrol como protetor da função reprodutiva, produção espermática e morfologia de testículos em animais submetidos à TT em diferentes idades.

## 2 METODOLOGIA

Todas as etapas deste estudo foram realizadas na Unidade de Pesquisa Urogenital, Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso com Animais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob os protocolos CEUA/008/2011 e CEUA/019/2012 (ANEXO).

### 2.1.1 Animais e Intervenções experimentais

#### 2.1.1.1 Animais

Foram utilizados 328 ratos (82 machos e 246 fêmeas) da linhagem Wistar, criados e mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Urogenital. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo artificial de 12/12h claro/escuro (07h -19h). Receberam ração comercial (Nuvilab, Nuvital Ltda®, Colombo, Paraná, Brasil) e água *ad libidum* durante todo o experimento.

Os machos foram divididos em nove grupos de diferentes idades e tratamentos conforme o quadro 1. Desta forma foram utilizados animais pré-púberes (com 4 semanas de idade), animais com idade relativa à fase de puberdade (6 semanas) e animais adultos jovens (com 9 semanas de idade), divididos conforme os tratamentos em grupos controle (CTRL4, CTRL6 e CTRL9), grupos de animais submetidos à torção testicular (TT4, TT6 e TT9) e grupos que receberam o tratamento com resveratrol após a torção testicular (RES4, RES6 e RES9) (9, 23, 59).

O peso dos ratos machos variou entre 67 e 106,5 g nos ratos pré-púberes ( $86,75 \pm 27,93$ ), 173 a 219 g nos animais púberes ( $196 \pm 32,53$ ) e 204,5 a 342,5 g nos ratos adultos jovens ( $273,5 \pm 97,58$ ).

As 246 fêmeas foram utilizadas unicamente como matrizes durante os testes de fertilidade. Desta forma, foram utilizadas fêmeas com 12 semanas de idade, que apresentavam ciclo estral regular conforme acompanhamento por citologia vaginal (60).

Quadro 1 - Divisão dos animais machos nos diferentes grupos experimentais conforme a idade na intervenção cirúrgica e os tratamentos realizados

		Tratamento		
		Controle	Torção testicular	Torção testicular + Resveratrol
Idade	Animais pré-púberes (4 semanas de idade)	CTRL4 n=10	TT4 n=10	RES4 n=8
	Animais púberes (6 semanas de idade)	CTRL6 n=10	TT6 n=9	RES6 n=8
	Animais adultos jovens (9 semanas de idade)	CTRL9 n=10	TT9 n=9	RES9 n=8

Legenda: CTRL4. Grupo controle submetido à cirurgia simulada com 4 semanas de idade  
 CTRL6. Grupo controle submetido à cirurgia simulada com 6 semanas de idade  
 CTRL9. Grupo controle submetido à cirurgia simulada com 9 semanas de idade  
 TT4. Grupo de animais submetido à torção testicular com 4 semanas de idade  
 TT6. Grupo de animais submetido à torção testicular com 6 semanas de idade  
 TT9. Grupo de animais submetido à torção testicular com 9 semanas de idade  
 RES4. Grupo de animais tratado com resveratrol após a torção testicular com 4 semanas de idade  
 RES6. Grupo de animais tratado com resveratrol após a torção testicular com 6 semanas de idade  
 RES9. Grupo de animais tratado com resveratrol após a torção testicular com 9 semanas de idade

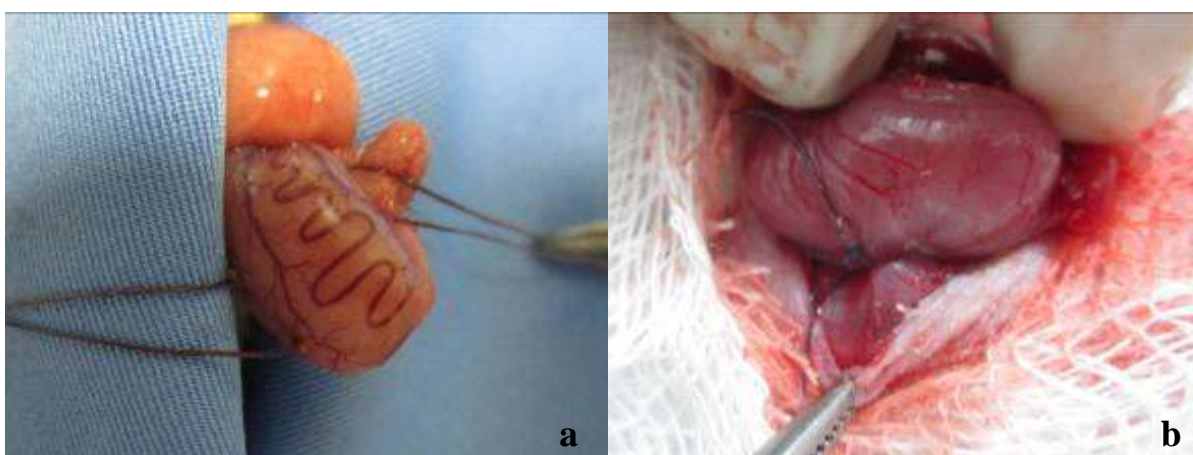
Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 2.1.2 Torção testicular

Os animais dos grupos que sofreram torção testicular (TT4, TT6, TT9, RES4, RES6 e RES9) foram anestesiados e mantidos em plano anestésico adequado através da administração de cloridrato de cetamina na dose de 80 mg/Kg (Ketamina Agener 10%, Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) associado ao cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/Kg (Xylazin 2%, Syntec, Hortolândia, São Paulo, Brasil), pela via intraperitoneal. Doses adicionais correspondentes a 1/3 da dose anestésica (26mg/kg de cloridrato de cetamina e 3mg/kg de cloridrato de xilazina) foram administradas individualmente conforme a necessidade (61). Com os animais em decúbito dorsal a região escrotal foi preparada para

cirurgia asséptica. O testículo direito foi abordado por incisão longitudinal do escroto e túnica vaginal. O funículo espermático foi então torcido pela rotação do testículo sobre seu eixo longitudinal, no sentido horário a 720 graus (duas voltas completas) (25). O testículo foi mantido nesta posição pela aplicação de um ponto em padrão de Wolf em cada face (lateral e medial) fixando-o ao septo escrotal e à túnica vaginal parietal e dartos com fio de poliglactina 910 6-0 (para os testículos dos animais pré-púberes) e 4-0 (para os testículos dos demais animais) (vicryl, Ethicon, São José dos Campos, Brasil) (Figura 6) (62). A ferida escrotal foi então suturada com fio de monofilamento preto 3-0 (Nylon, Technofio, Goiânia, Brasil) em ponto simples contínuo.

Figura 6 - Testículo direito imediatamente após a sua rotação



Legenda: a) Notar os fios de sutura passando por suas faces lateral e medial. O mesmo órgão após a fixação. b) Notar a sutura aplicada na face lateral fixando esta à túnica vaginal parietal e dartos.

Fonte: RIBEIRO, 2012.

Os testículos dos animais foram mantidos torcidos durante 4 horas (25). Durante este período os animais foram mantidos sob anestesia em plano cirúrgico. Após este período, o escroto foi novamente aberto pela remoção da sutura simples contínua aplicada. As suturas de fixação do testículo foram cuidadosamente removidas, os testículos destorcidos até que voltassem à posição anatômica e o escroto suturado com fio de poliglactina 910 6-0 ou 4-0 em padrão simples contínuo.

Os animais dos grupos controles (CTRL4, CTRL6 e CTRL9) foram submetidos à cirurgia simulada para a torção testicular. Assim, sob as mesmas condições, após abordagem do testículo direito, este foi fixado em posição anatômica (sem sofrer qualquer rotação), pela

aplicação de suturas de maneira semelhante aos grupos submetidos à torção testicular. Novamente, o escroto foi suturado e os animais mantidos em plano cirúrgico durante 4 horas, após as quais o escroto foi aberto para avaliação macroscópica e retirada dos fios utilizados para a fixação. Finalmente o escroto foi suturado com fio poliglactina 910 6-0 ou 4-0 em ponto simples contínuo.

Os animais então foram acondicionados em ambiente aquecido (28°C) até a completa recuperação da ambulação normal. Neste ambiente, as feridas cirúrgicas foram limpas com soro fisiológico, e aplicado solução de polivinilpirrolidona (Povidine, Vic Pharma, Taquaritinga, SP, Brasil). Receberam ainda uma aplicação de morfina (Dimorf 10mg/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 2,5 mg/Kg, pela via subcutânea, antes do despertar anestésico. Quando a ambulação normal era observada, os animais foram novamente acondicionados em caixas convencionais e ambiente do biotério, com acesso à água e ração comercial.

### 2.1.3 Tratamento com resveratrol

Cada animal dos grupos RES4, RES6 e RES9 foi submetido à uma injeção intraperitoneal de resveratrol (Resveratrol 99%, Terraternal, Santa Clara, CA, USA) na dose de 30 mg/kg diluído em água, 30 minutos antes da destorção do testículo direito (47). Durante o período pós operatório, a partir do dia seguinte à cirurgia, os animais receberam diariamente pela via oral. 30 mg/kg de resveratrol, também diluído em água, durante uma semana. Foram diluídos 150 mg de resveratrol em 15ml de água padronizando a concentração de 10 mg/ml, com a finalidade de evitar administração de grandes volumes aos animais. Como resveratrol possui média solubilidade em água, a diluição permanecia sob constante agitação em um agitador modelo C-MAG HS 7 S1 (IKA<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil), e dessa forma evitava que parte do resveratrol se depositasse no fundo do recipiente.



#### 2.1.4 Eutanásia

Todos os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica induzida pela administração de tiopental sódico (Tiopental 1g, Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 100 mg/Kg, injetado por via intraperitoneal.

Todos os machos foram submetidos à eutanásia por ocasião da 14ª semana de vida, portanto adultos. As fêmeas utilizadas foram submetidas à eutanásia por ocasião do 20º dia após cópula, conforme descrito na seção 3.2.1 desta dissertação.

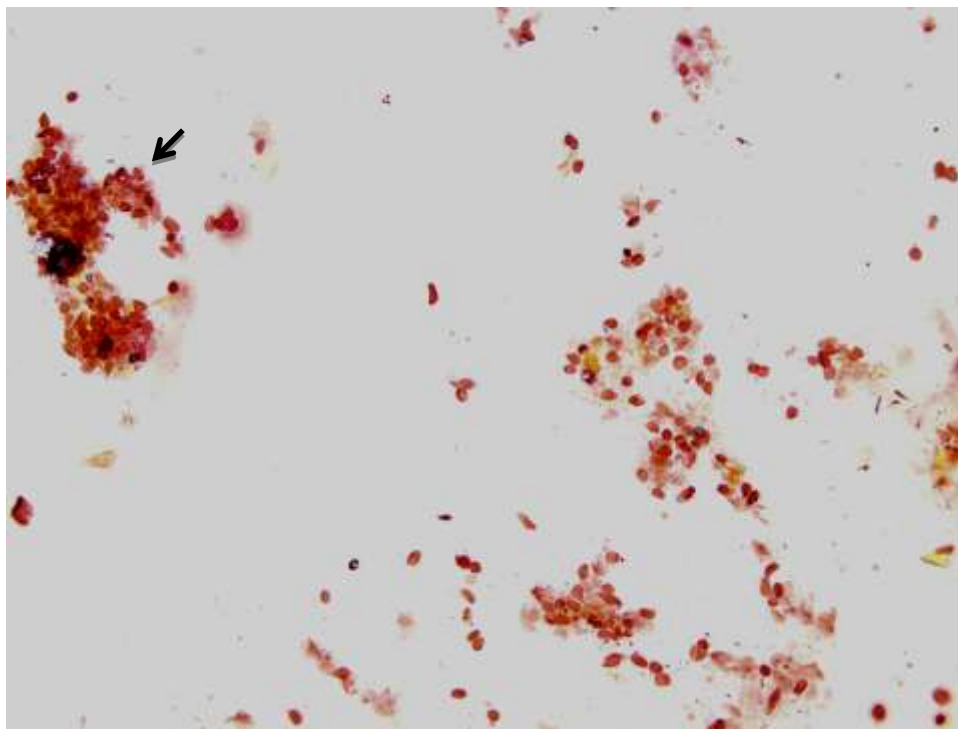
## 2.2 **Coleta de dados**

### 2.2.1 Teste de fertilidade

Durante a 12ª semana de vida, os ratos de todos os grupos foram submetidos ao teste de fertilidade (63). Neste teste, cada macho foi colocado para acasalar com três fêmeas em estro por três noites ao longo da semana. Cada uma das fêmeas foi devidamente identificada e a data em que foi colocada para cópula e com qual macho foi anotada.

Nestas fêmeas, o ciclo estral foi acompanhado por citologia vaginal realizada diariamente pela manhã (Figura 7). O ciclo estral das ratas é dividido em 4 fases (60): pró-estro (fase que antecede a ovulação, com duração de 12 horas), estro (fase de ovulação, com duração de 24 horas), metaestro (fase seguinte à ovulação, com duração de 24 horas) e diestro (fase que antecede ao pró-estro, com duração de 24 a 48 horas). Desta forma, as ratas que pela manhã eram diagnosticadas em pró-estro podiam ser colocadas para cópula durante a noite (já em estro). Na manhã seguinte, os animais eram separados e o diagnóstico da cópula era realizado pela presença de plugue espermático no vestíbulo vaginal e/ou presença de espermatozoides na vagina, verificado através de exame citológico.

Figura 7 – Células do epitélio vaginal de rata na fase de estro (fase de ovulação)



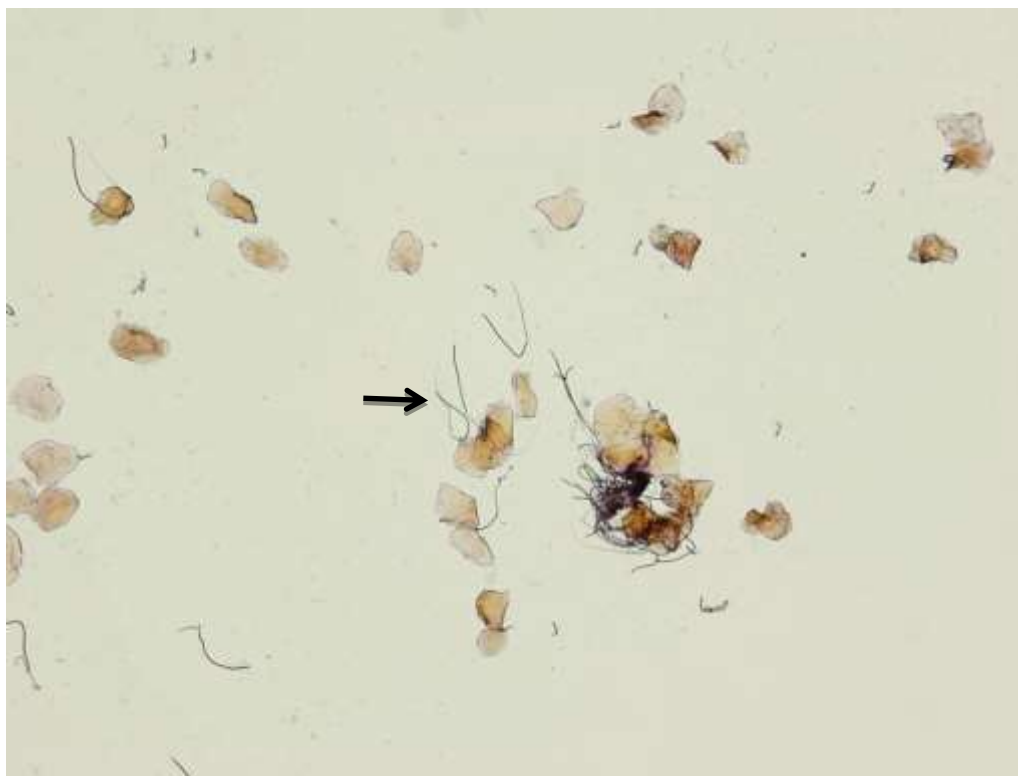
Legenda: Notar a presença das células queratinizadas, hemácias e a formação de grumos características dessa fase (seta).

Nota: HE e vermelho de shorr, 100x

Fonte: RIBEIRO, 2012.

A amostra para citologia, tanto para determinação da fase do ciclo estral, quanto para diagnóstico da cópula (Figura 8), foi coletada pela inserção de uma haste de algodão (Palinetes, York, São Paulo, SP, Brasil) umedecida com solução tampão fosfato-salino (PBS) (APÊNDICE) na vagina seguida de movimentos rotatórios de fricção contra suas paredes. Deste material foi feito um esfregaço em lâmina histológica devidamente identificada. Este material foi então fixado com álcool 100% e corados em hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente por 2 minutos, corados em vermelho de Shorr por 10 minutos e lavados em água corrente por 2 minutos. Após secagem em temperatura ambiente, foram feitas as leituras em microscopia de luz sob magnificação de 200x em um microscópio BH-2 (Olympus, Tóquio, Japão).

Figura 8 – Células do epitélio vaginal de rata na fase de estro (fase de ovulação) com presença de espermatozoides (seta)



Legenda: Confirmação do acasalamento dos animais.

Nota: HE e vermelho de shorr, 200x

Fonte: RIBEIRO, 2012.

Vinte dias após a confirmação da cópula, as fêmeas foram submetidas à eutanásia e a cavidade abdominal aberta para exame. O diagnóstico de prenhez foi realizado pela observação direta do útero gravídico. O útero e os ovários foram então removidos para exame sob magnificação. O útero foi aberto por incisão em toda sua extensão (nos seus dois cornos uterinos e corpo uterino), os fetos removidos e contados os sítios de implantação (pontos onde as placentas estavam implantadas ao endométrio) e os sítios de absorção (pontos onde houve implantações fetais que sofreram aborto espontâneo com absorção). O peso e a circunferência torácica de cada feto a termo foram quantificados. Em cada ovário foi realizada a contagem do número de corpos lúteos (63).

A potência de cada macho (considerada aqui como capacidade do macho em realizar a cópula) foi calculada como a relação do número de fêmeas com diagnóstico positivo de cópula sobre o total de fêmeas postas para copular com cada macho (total de três fêmeas por rato) (63).

O índice de fertilidade de cada macho foi calculado como a relação do número de sítios de implantação sobre o número de corpos lúteos nas fêmeas emprenhadas por este macho (63).

A fecundidade de cada grupo experimental foi calculada como a relação entre o número de ratos que geraram pelo menos um feto viável sobre o número de ratos postos para acasalar. Neste experimento o número de animais variou de 8 a 10 por grupo (63).

Foi ainda calculado o índice de perdas pré e pós-implantação, de acordo com as seguintes fórmulas (63):

f) Índice de perdas pré-implantação:

$$\frac{[\text{número de corpos lúteos}] - [\text{número de sítios de implantação}]}{[\text{número de corpos lúteos}]} \quad (1)$$

g) Índice de perdas pós-implantação:

$$\frac{[\text{número de sítios de implantação}] - [\text{número de fetos a termo}]}{[\text{número de sítios de implantação}]} \quad (2)$$

### 2.2.2 Dosagem de testosterona sérica

Durante o procedimento de eutanásia dos animais, assim que estes entraram em plano anestésico profundo, foi realizada punção cardíaca e foram coletados 5 ml de sangue (59). A amostra de cada animal foi mantida em tubos de plástico sem anticoagulante em temperatura ambiente para retração do coágulo. O soro foi então separado por centrifugação à 5.000 rotações por minuto por cinco minutos em centrífuga modelo 206 BL (Fanem, São Paulo, Brasil). O soro (sobrenadante) foi transferido para microtubos e mantido à - 20° C até a análise.

A dosagem sérica de testosterona foi realizada nos grupos CTRL4, CTRL6, CTRL9, TT4, TT6 e TT9.

A concentração sérica de testosterona foi então mensurada pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kit específico (E90458Ge, USCN, Houston, EUA), de acordo com o fabricante (APÊNDICE). As amostras foram analisadas por um leitor de microplaca modelo UVM 340 (Asys Hitech GmbH, Biochrom®, Cambs, United Kingdom) à

450 nm dentro de 20 minutos após o término da reação. Os resultados foram expressos em ng/ml.

### 2.2.3 Avaliações dos espermatozóides

Ao completar 14 semanas de vida, duas semanas após o teste de fertilidade, os machos foram submetidos à eutanásia e ambos os epidídimos (direito e esquerdo) foram coletados. Deste modo para cada análise referente aos espermatozóides os órgãos direito e esquerdo foram analisados separadamente. Assim a letra D ou E foi adicionada no final da identificação de cada grupo, fazendo então referências às análises de amostras coletadas do epidídimo direito ou esquerdo, respectivamente (p. ex. CTRL4D, TT6E, RES4D, etc.).

De cada epidídimo, a cauda foi ressecada para retirada dos espermatozóides. Esta foi seccionada quatro vezes e imersa em 5 ml de solução PBS com 0,5% de albumina de soro bovino (A9647, Albmin from bovine serum, Sigma, Frederick, EUA) à 37°C, na qual foi levemente agitada para difusão dos espermatozóides, do interior do órgão para o meio líquido (APÊNDICE) (63). Esta solução, chamada de solução espermática, foi então utilizada para todas as análises dos espermatozóides. Todo o material envolvido na análise dos espermatozóides foi mantido à 37°C.

#### 2.2.3.1 Concentração de espermatozóides

Foram coletados 100 µl da solução espermática que foi diluída de 1 a 5 vezes conforme a sua turbidez, de modo a facilitar a contagem dos espermatozóides. Esta diluição foi anotada e utilizada no cálculo final para determinação da concentração de espermatozoides (64).

Após a diluição, 10 µl foram coletados e depositados sobre uma câmara de Neubauer espelhada e coberta com lamínula. Esta amostra foi visualizada em contraste de fase e gravada em vídeo por uma câmera Basler (Vision Technologie<sup>TM</sup>, Ahrensburg, Alemanha) acoplada à um microscópio H550S (Nikon, Tóquio, Japão) sob magnificação de 100x. Assim, a contagem de espermatozóides foi realizada posteriormente, nos arquivos de vídeo gerados. Esta

metodologia foi testada previamente em estudos piloto para que diminuísse o tempo entre a coleta do epidídimo e a avaliação dos espermatozóides.

Nos arquivos de vídeo foram contados o número de espermatozóides em cinco quadrantes da câmara de Neubauer (gravados separadamente), perfazendo um volume total de  $2 \times 10^{-5}$  mL. Este valor encontrado foi corrigido para a diluição da solução espermática e convertido para espermatozóides / mL, unidade em que foram expressos os resultados.

#### 2.2.3.2 Motilidade dos espermatozóides

A motilidade dos espermatozóides foi determinada como porcentagem de espermatozóides com movimento, seja ele progressivo ou não (64). Esta análise foi feita nos mesmos arquivos de vídeo utilizados para determinação da concentração de espermatozóides. Nestas imagens o número de células imóveis foi contado, e subtraído do número total de espermatozóides em cada campo. O resultado dessa subtração foi dividido pelo número total de espermatozóides e multiplicado por 100 para determinação da porcentagem de espermatozóides móveis.

#### 2.2.3.3 Viabilidade dos espermatozóides

A viabilidade dos espermatozóides foi determinada através do teste hipo-osmótico, que avalia a integridade e funcionamento da membrana plasmática desta célula (65).

A solução espermática foi diluída na proporção 1:5 em uma solução aquosa contendo citrato de sódio a 0,735% e frutose a 1,351% de modo que esta solução tenha uma osmolaridade de 100 mOsm/L, menor do que a osmolaridade do meio intracelular e portanto considerada hipo-osmótica (APÊNDICE). Os espermatozóides foram mantidos nestas condições por 30 minutos à temperatura de 37°C. Após este período, foram coletados 10 µl da solução que foram depositados sobre lâmina histológica (previamente aquecida e identificada) e coberta com lamínula. Esta amostra foi observada em microscopia de luz sob magnificação de 200x em microscópio BH-2 (Olympus, Tóquio, Japão).

Foram considerados viáveis os espermatozóides que apresentavam dobramento de cauda (Figura 9). Tal alteração morfológica é verificada em decorrência da entrada de líquido para o meio intra-celular (mais concentrado) em espermatozóides com membrana plasmática íntegra e funcional. A viabilidade dos espermatozóides foi expressa pela porcentagem de células que exibiram dobramento de cauda em relação ao número total de células analisadas.

Figura 9 - Avaliação da viabilidade dos espermatozoides pelo teste hipo-osmótico



Legenda: As setas apontam os espermatozóides com dobramento de cauda (viáveis).

Nota: 200x

Fonte: RIBEIRO, 2012

#### 2.2.4 Avaliações biométricas

Após a eutanásia, ambos os testículos foram retirados do escroto e dissecados das suas estruturas anexas. O volume de cada testículo foi medido separadamente pelo método de Sherle (66), assim como seu peso. Desta forma, assim como para as análises de espermatozóides, os testículos direito e esquerdo foram analisados separadamente e, novamente, identificados com as letras D ou E.

### 2.2.5 Análises histológicas

Após a pesagem dos testículos, ambos tiveram sua extremidade capitata clivada, para permitir que o agente fixador penetrasse no parênquima testicular. O testículo (já sem sua porção proximal) foi fixado por imersão em solução de Bouin durante 24 horas (APÊNDICE). Após este período, o órgão foi clivado transversalmente para divisão em cinco fragmentos, dos quais os fragmentos das extremidades foram desprezados. Os três fragmentos remanescentes foram imersos em formaldeído a 4% em tampão fosfato (pH 7,4) para pós-fixação (APÊNDICE). Tal metodologia foi testada previamente em estudo piloto que concluiu ser este um método adequado para fixação do testículo de rato para fins histológicos.

Novamente, os testículos direito e esquerdo foram analisados separadamente e assim identificados neste texto como previamente mencionado.

Os fragmentos fixados foram colocados em cassetes histológicos identificados e processados para inclusão em parafina. De maneira sucinta, estes fragmentos foram desidratados pelo banho em concentrações crescentes de etanol (70% - 100%), diafinizado em xilol e embebido em parafina aquecida a 60° C antes de sua inclusão por endurecimento em temperatura ambiente. A partir destes blocos parafinados, foram obtidos cortes histológicos de 5 µm pela microtomia em equipamento rotativo modelo 2125RT (Leica, Wetzlar, Alemanha).

#### 2.2.5.1 Avaliações morfométricas

Para as análises morfométricas, os cortes coletados em lâminas histológicas convencionais foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (APÊNDICE). Estes foram fotografados sob diferentes aumentos (de acordo com a análise) pela câmera DP71 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplada à um microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando o programa ImagePro Express (5.0.1.26, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

As imagens fotografadas foram analisadas utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). Para as análises expressas em valores absolutos, o programa foi formatado para conversão de unidades de pixel para micrômetros pela calibração utilizando uma régua histológica micrometrada. Esta foi fotografada sob as mesmas condições (câmera,



microscópio, objetiva e resolução) que as lâminas a serem analisadas. Todas as fotomicrografias foram capturadas com resolução de 2040x1536.

#### 2.2.5.1.1 Diâmetro do túbulo seminífero

O diâmetro de 125 túbulos seminíferos em cada testículo (5 túbulos em 5 campos de 5 cortes) foi mensurado. Foram medidos túbulos capturados aleatoriamente, excluindo apenas túbulos pouco circulares (ovalados ou achatados). Para esta análise, foram utilizadas fotomicrografias com aumento de 100x (67).

Para tanto, foi traçada uma linha reta utilizando a ferramenta “straight line” do software. Esta linha se estendia da túnica própria de um polo ao outro do túbulo (Figura 10) passando pelo centro do túbulo. O resultado da análise de cada testículo foi considerado a média dos 125 diâmetros mensurados, expresso em  $\mu\text{m}$ .

Figura 10 - Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: A linha reta amarela mostra o traçado para a mensuração do diâmetro em um dos túbulos.

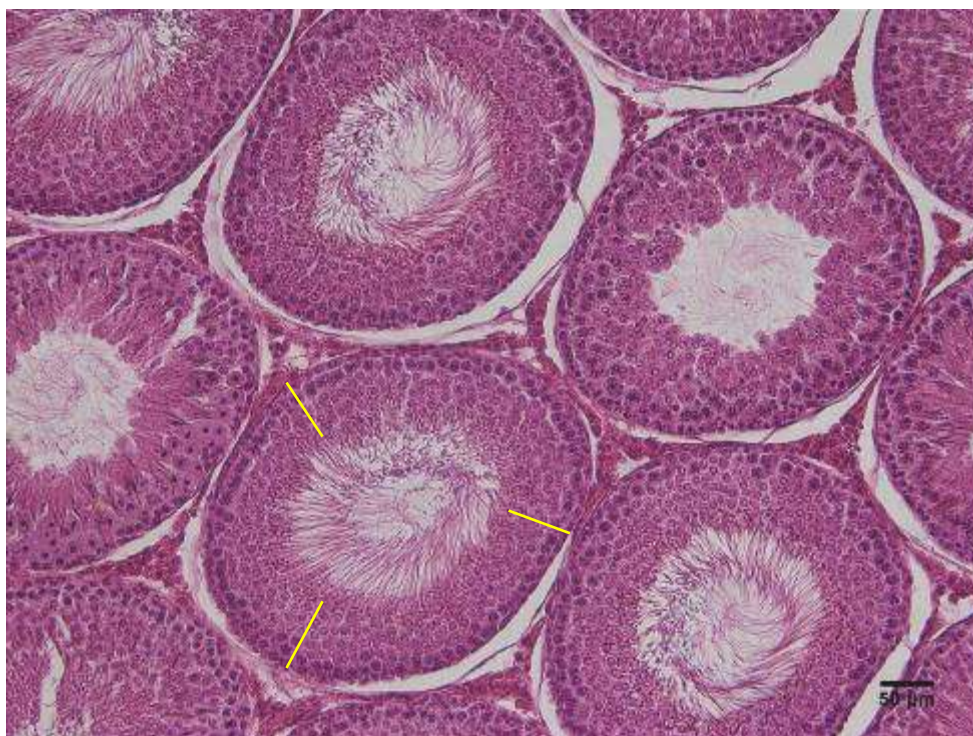
Nota: HE, 100x.

Fonte: RIBEIRO, 2012

#### 2.2.5.1.2 Altura do epitélio do túbulo seminífero

Para a análise deste parâmetro foram traçadas três linhas (utilizando a mesma ferramenta usada para o diâmetro) que se estendiam desde a túnica própria até a célula mais interna em direção ao lúmen do túbulo seminífero, excluindo-se os espermatozoides (Figura 11). Portanto, não consideramos aqui os espermatozóides como células integrantes do epitélio seminífero. As três linhas foram distribuídas de forma que ficassem equidistantes uma da outra como ilustrado na figura 4. A média destas três linhas foi considerada como a altura do epitélio daquele túbulo seminífero. Para esta análise, foram utilizadas fotomicrografias em aumento de 200x. Novamente, 125 túbulos seminíferos foram mensurados em cada testículo (5 túbulos em 5 campos de 5 cortes), escolhidos ao acaso (67). O resultado da análise de cada testículo foi considerado pela média dos 125 túbulos mensurados, expresso em  $\mu\text{m}$ .

Figura 11 - Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: As três linhas retas amarelas mostram o traçado e a disposição para a mensuração da altura do epitélio seminífero em um túbulo seminífero.

Nota: HE, 200x.

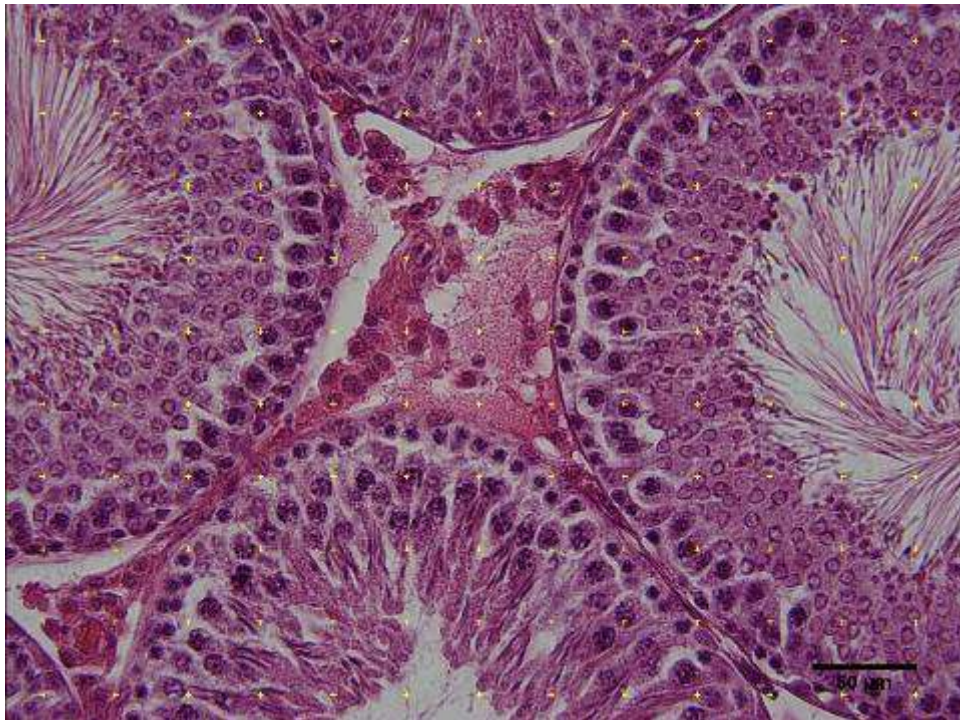
Fonte: RIBEIRO, 2012

#### 2.2.5.1.3 Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares

Tal parâmetro foi avaliado pela técnica de contagem de pontos pela superposição de uma grade de 100 pontos às fotomicrografias dos testículos utilizando a ferramenta “grid” do software (Figura 12). Com a ferramenta “cell counter” foram contados os pontos da grade que incidiam sobre as seguintes estruturas: túnica própria, epitélio seminífero, lúmen tubular (compartimento tubular), espaço intersticial e vasos sanguíneos (compartimento intertubular). A contagem de pontos que incidiram sobre cada uma destas estruturas foi expresso em porcentagem ao número total de pontos (100). O somatório das densidades volumétricas da túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular foi considerado como a densidade volumétrica do túbulo seminífero (compartimento tubular). A densidade volumétrica do espaço intersticial (compartimento intertubular) foi considerada como o somatório da densidade volumétrica dos vasos sanguíneos e das outras estruturas neste espaço, contadas em conjunto (células de Leydig, fibroblastos, colágeno, etc) (67).

Para cada testículo, foram analisadas vinte e cinco imagens histológicas aleatoriamente fotografadas de cinco cortes distintos. Para cada parâmetro, o resultado de cada órgão, expresso em porcentagem, foi calculado pela média dos resultados de cada imagem analisada. Para esta análise, foram utilizadas imagens capturadas sob aumento de 400x.

Figura 12 - Fotomicrografia de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: As cruzes amarelas são os 100 pontos da grade sobreposta à imagem para quantificação das densidades estruturais do compartimento tubular e intertubular.

Nota: HE 400x.

Fonte: RIBEIRO, 2012

#### 2.2.5.1.4 Volume absoluto das diferentes estruturas testiculares

O volume de cada uma das estruturas testiculares analisadas no item 3.2.5.1.3 foi estimado com base na sua densidade volumétrica e no volume do testículo medido pelo método de Scherle (66, 68). Para tanto foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de Y} = (V_v[Y] / 100) \times \text{volume testicular} \quad (3)$$

h) Onde Y é a estrutura analisada.

Como o volume testicular foi expresso em ml, o volume de cada uma das estruturas analisadas também foi expresso nesta mesma unidade.

#### 2.2.5.1.5 Comprimento total dos túbulos seminíferos

O comprimento total dos túbulos seminíferos de cada testículo, expresso em metros foi estimado em função do volume testicular, densidade volumétrica do túbulo seminífero e diâmetro do túbulo seminífero.

Desta forma, tal parâmetro foi determinado pela seguinte fórmula (67):

$$(Vv[ct] \times VT) / (D[ts]/2)^2 \times \pi \quad (4)$$

i) Onde:  $Vv[ct]$  = densidade volumétrica do compartimento tubular (Túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular)

$VT$  = volume do testículo

$D[ts]$  = diâmetro do túbulo seminífero

$\pi = 3,14$

#### 2.2.5.2 Escore de Johnsen

O escore de Johnsen (69) foi utilizado para avaliação da lesão dos diferentes tipos celulares do epitélio seminífero testicular. De acordo com este escore, um valor de 1 a 10 é dado a cada um dos túbulos conforme os achados histológicos referentes às células germinativas. Deste modo, o escore 10 é dado quando se observa espermatogênese completa, com muitos espermatozóides e epitélio germinativo organizado com espessura regular, deixando um lúmen aberto; o escore 9 é atribuído para túbulos com muitos espermatozóides presentes, mas epitélio germinal desorganizado com descamação ou obliteração do lúmen; 8 nos casos onde apenas alguns poucos espermatozóides são observados; 7 quando nenhum espermatozóide mas muitas espermátides estão presentes; 6 para nenhum espermatozóide e menos de cinco espermátides no túbulo; 5 para nenhum espermatozóide e espermátide mas

vários espermátócitos presentes; 4 para menos de cinco espermátócitos presentes e nenhuma espermátide ou espermatozóide; 3 para apenas espermátogônias e células germinativas presentes; 2 para ausência de células germinativas mas presença de células de Sertoli; 1 para ausência de células presentes no túbulo seminífero.

Para cada testículo, 50 túbulos foram analisados sob magnificação de 400x em cortes corados por HE e observados num microscópio H550S (Nikon, Tóquio, Japão). A média destas 50 avaliações foi considerada como o escore atribuído àquele testículo.

### 2.2.5.3 Avaliação da proliferação celular no testículo

A proliferação celular nos túbulos seminíferos e no espaço intersticial foi quantificada em cortes imunomarcados para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (APÊNDICE) (40).

Para tanto foi utilizado a técnica de imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-mouse anti-PCNA (180110, Invitrogen, Camarillo, EUA). Este anticorpo foi utilizado numa concentração de 1,29 µg/ml a partir da diluição de 1:100 da solução estoque fornecida pelo fabricante em solução tampão fosfato-salino com 1% de albumina de soro bovino (PBS BSA 1%). Os sítios antigênicos foram recuperados pelo banho em solução de Tris-EDTA à 60° C durante 12 horas. A revelação dos anticorpos ligados aos sítios específicos foi feita com o kit histostain-plus (859643, Invitrogen, Camarillo, EUA) de acordo com o fabricante e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina.

Os cortes imunomarcados foram fotografados por uma câmera DP71 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplada à um microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) e adquiridas com o software DP Controller (3.3.1.222, Olympus). Foram analisadas 20 fotomicrografias obtidas de duas lâminas por cada testículo, sob magnificação de 400x.

Foi contado o número de núcleos celulares imunomarcados nos túbulos seminíferos e no espaço intersticial de cada fotomicrografia utilizando a ferramenta “cell counter” do software ImageJ. Este número foi dividido pela área de cada uma das estruturas (túbulos seminíferos e no espaço intersticial), mensurado em mm<sup>2</sup> pela ferramenta “freehand selections” do mesmo software. Deste modo este parâmetro foi expresso em número de células em proliferação / mm<sup>2</sup> do túbulo seminífero e do espaço intersticial. Para cada testículo, o resultado desta análise foi calculado como a média dos 20 campos analisados.

#### 2.2.5.4 Avaliação do colágeno no testículo

Foi analisado o padrão de colágeno em lâminas coradas pela técnica de Picrosirius Red (APÊNDICE) (70). As secções foram analisadas diretamente em microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) equipado com lentes para microscopia de polarização, em magnificação de 200x.

Esta análise foi feita apenas nos testículos que exibiam grande quantidade de colágeno no espaço intertubular uma vez que em testículos normais, a pequena presença de colágeno inviabiliza tal análise. Para cada corte foi determinado subjetivamente se o padrão de birrefringência das fibras colágenas exibia predominância da coloração verde, vermelho-amarelado ou misto. Foram analisadas completamente duas secções transversas analisadas aleatoriamente em cada testículo. Quando houve predomínio notório do padrão de birrefringência observado entre os cortes de um grupo, este foi indicado.

### 2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados de acordo com os objetivos propostos pelo estudo.

Desta forma, para alcançar o objetivo descrito no item 2.1 (estudar a função reprodutiva e testosterona sérica de animais submetidos à TT unilateral em diferentes idades) comparamos os resultados dos grupos submetidos à cirurgia simulada e dos grupos submetidos à TT da mesma idade (CTRL4 versus TT4; CTRL6 versus TT6 e CTRL9 versus TT9). As médias de cada parâmetro foram comparadas pelo teste t de Student não pareado.

Com relação ao objetivo descrito no item 2.2 (estudar a produção espermática e a morfologia de testículos submetidos à TT em diferentes idades), comparamos os resultados das avaliações dos espermatozoides (item 3.2.3), avaliações biométricas (item 3.2.4) e análises histológicas (3.2.5) dos testículos torcidos (sempre do lado direito) e submetidos à cirurgia simulada. As médias de cada parâmetro foram comparadas pelo teste t de Student não pareado.

Referente ao objetivo descrito no item 2.3 (estudar produção espermática e a morfologia de testículos contralaterais (esquerdos) após TT ipsilateral (dos testículos direitos) em diferentes idades), comparamos os resultados das avaliações dos espermatozóides (item 3.2.3), avaliações biométricas (item 3.2.4) e análises histológicas (3.2.5) dos testículos contralaterais (esquerdos) aos submetidos à TT e à cirurgia simulada (CTRL4E versus TT4E; CTRL6E versus TT6E e CTRL9E versus TT9E). As médias de cada parâmetro foram comparadas pelo teste t de Student não pareado.

Com relação ao objetivo descrito no item 2.4 (estudar a influência do momento da indução experimental da TT (pré-pubertal, durante a puberdade e em adultos jovens) sobre as alterações da função reprodutiva, produção espermática e morfologia testicular na idade adulta), foram comparados: a) os resultados do teste de fertilidade (item 3.2.1) e dosagem de testosterona sérica (item 3.2.2) dos grupos submetidos à TT em diferentes idades (TT4 versus TT6 versus TT9); b) os resultados das avaliações dos espermatozóides (item 3.2.3), avaliações biométricas (item 3.2.4) e análises histológicas (3.2.5) dos testículos torcidos (direitos) em diferentes idades (TT4D versus TT6D versus TT9D). As médias de cada parâmetro foram comparadas pela ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni (no caso de dados paramétricos) ou pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns (no caso de dados não paramétricos).

Com relação ao objetivo descrito no item 2.5 (avaliar o tratamento pós-operatório com resveratrol como protetor da função reprodutiva, produção espermática e morfologia de testículos em animais submetidos à TT em diferentes idades), foram comparados: a) os resultados do teste de fertilidade (item 3.2.1) dos grupos submetidos à cirurgia simulada, TT e TT tratado com resveratrol em diferentes idades (CTRL4 versus TT4 versus RES4; CTRL6 versus TT6 versus RES6 e CTRL9 versus TT9 versus RES9); b) os resultados das avaliações dos espermatozóides (item 3.2.3), avaliações biométricas (item 3.2.4) e análises histológicas (3.2.5) dos testículos submetidos à cirurgia simulada, TT e TT tratado com resveratrol em diferentes idades (CTRL4D versus TT4D versus RES4D; CTRL6D versus TT6D versus RES6D e CTRL9D versus TT9D versus RES9D). As médias de cada parâmetro foram comparadas pela ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni (no caso de dados paramétricos) ou pelo método de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns (no caso de dados não paramétricos).

Os valores de cada parâmetro e de cada grupo foram avaliados se obedeciam à distribuição Gaussiana pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As médias de valores que obedeciam tal distribuição foram comparadas por testes paramétricos, enquanto as



médias oriundas de valores que não passavam no teste de normalidade foram comparadas por testes não paramétricos.

Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

### 3 RESULTADOS

As avaliações macroscópicas dos testículos direitos após a torção mostraram que todos os testículos de todos os grupos foram devidamente torcidos, pois se apresentaram bem cianóticos decorrente da congestão provocada pela TT (Figura 13).

Figura 13 - Testículo direito após 4 horas de torção



Legenda: Notar que todo o órgão apresenta-se cianótico.  
Fonte: RIBEIRO, 2012.

### 3.1 Função reprodutiva e testosterona sérica de animais submetidos à TT unilateral em diferentes idades.

#### 3.1.1 Teste de fertilidade

Em todos os parâmetros analisados do teste de fertilidade foi verificado que não houve diferença entre os animais submetidos à TT e àqueles submetidos à cirurgia simulada. A semelhança nestes parâmetros foi verificada entre os grupos submetidos ao procedimento cirúrgico com 4 (tabela 1) 6 (tabela 2) e 9 semanas (tabela 3).

Tabela 1 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4 e TT4, respectivamente).

	<b>CTRL4</b>	<b>TT4</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,61 ± 0,15	0,50 ± 0,23	0,21
<b>Fertilidade</b>	0,89 ± 0,15	0,77 ± 0,29	0,28
<b>Fecundidade</b>	1,00 ± 0,00	0,90 ± 0,31	0,33
<b>Perda pré-implantação</b>	0,10 ± 0,15	0,12 ± 0,06	0,71
<b>Perda pós-implantação</b>	0,10 ± 0,14	0,05 ± 0,07	0,42
<b>Fetos por ninhada</b>	11,0 ± 2,57	11,3 ± 1,62	0,76
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,28 ± 0,21	2,38 ± 0,27	0,39
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,91 ± 0,20	2,99 ± 0,15	0,37

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 2 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6 e TT6, respectivamente).

	<b>CTRL6</b>	<b>TT6</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,56 ± 0,31	0,33 ± 0,28	0,11
<b>Fertilidade</b>	0,83 ± 0,12	0,85 ± 0,19	0,79
<b>Fecundidade</b>	0,90 ± 0,30	0,66 ± 0,47	0,18
<b>Perda pré-implantação</b>	0,13 ± 0,09	0,17 ± 0,18	0,61
<b>Perda pós-implantação</b>	0,21 ± 0,39	0,11 ± 0,11	0,55
<b>Fetos por ninhada</b>	10,5 ± 2,27	10,7 ± 2,36	0,88
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,54 ± 0,22	2,45 ± 0,07	0,40
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,96 ± 0,06	2,92 ± 0,09	0,43

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 3 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9 e TT9, respectivamente).

	<b>CTRL9</b>	<b>TT9</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,60 ± 0,34	0,37 ± 0,30	0,45
<b>Fertilidade</b>	0,89 ± 0,12	0,78 ± 0,35	0,27
<b>Fecundidade</b>	0,90 ± 0,31	0,60 ± 0,51	0,44
<b>Perda pré-implantação</b>	0,10 ± 0,12	0,08 ± 0,08	0,35
<b>Perda pós-implantação</b>	0,06 ± 0,07	0,04 ± 0,09	0,30
<b>Fetos por ninhada</b>	9,62 ± 3,81	7,77 ± 5,96	0,50
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,51 ± 0,18	2,27 ± 0,07	0,82
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,84 ± 0,07	2,77 ± 0,03	0,84

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.1.2 Dosagem da testosterona sérica

Ao comparar os níveis séricos de testosterona entre os animais submetidos à TT e cirurgia simulada em diferentes idades, foi verificado que não houve diferença significativa provocada pela TT.

Entre os animais operados com 4 semanas de vida, a testosterona sérica média se encontrou em  $5,58 \pm 1,00$  ng / ml para o grupo CTRL4 e  $5,32 \pm 1,06$  ng / ml para o grupo TT4. Quando comparadas estas médias, o valor de p encontrado foi de 0,67.

Para os animais operados com 6 semanas de vida, os valores encontrados foram de  $6,43 \pm 0,42$  ng / ml nos animais do grupo CTRL6 e  $6,49 \pm 0,35$  ng / ml no grupo TT6. Após a comparação estatística das médias, o valor de p foi de 0,80.

Nos ratos operados na nona semana de idade, a testosterona sérica mensurada foi de  $6,66 \pm 0,34$  ng / ml no grupo CTRL9 e  $6,66 \pm 0,67$  ng / ml no grupo TT9. O valor de p resultante da comparação destas médias foi de 0,98.

## 3.2 **Produção espermática e morfologia de testículos submetidos à TT em diferentes idades.**

### 3.2.1 Avaliações dos espermatozóides

A análise de concentração de espermatozóides coletados do epidídimo foi significativamente reduzida nos testículos que sofreram TT, independentemente da idade em que a lesão foi induzida (Figuras 14 e 15).

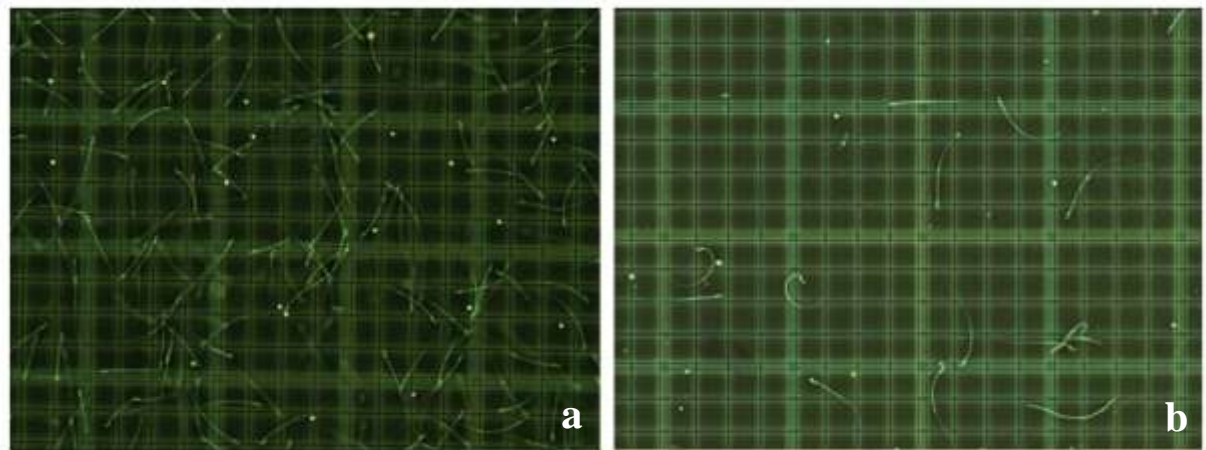
Entre os grupos operados com 4 semanas, a redução foi de 97% da concentração (CTRL4D:  $4,6 \pm 2,1 \times 10^6$  eptz / mL; TT4D:  $0,13 \pm 0,21 \times 10^6$  eptz / mL).

Nos animais operados com 6 semanas, a redução foi de 72% neste parâmetro (CTRL6D:  $4,0 \pm 2,1 \times 10^6$  eptz / mL; TT6D:  $1,1 \pm 1,7 \times 10^6$  eptz / mL).

Os animais operados na nona semana de vida foram intensamente afetados neste parâmetro, de tal modo que nos epidídimos do grupo TT9D não foram encontrados nenhum

espermatozóide, ocorrendo portanto uma redução de 100% neste parâmetro (CTRL9D:  $6,2 \pm 5,6 \cdot 10^6$  eptz / mL; TT9D  $0,0 \pm 0,0 \cdot 10^6$  eptz / mL). Desta forma as avaliações de motilidade e viabilidade não puderam ser realizadas nestas amostras.

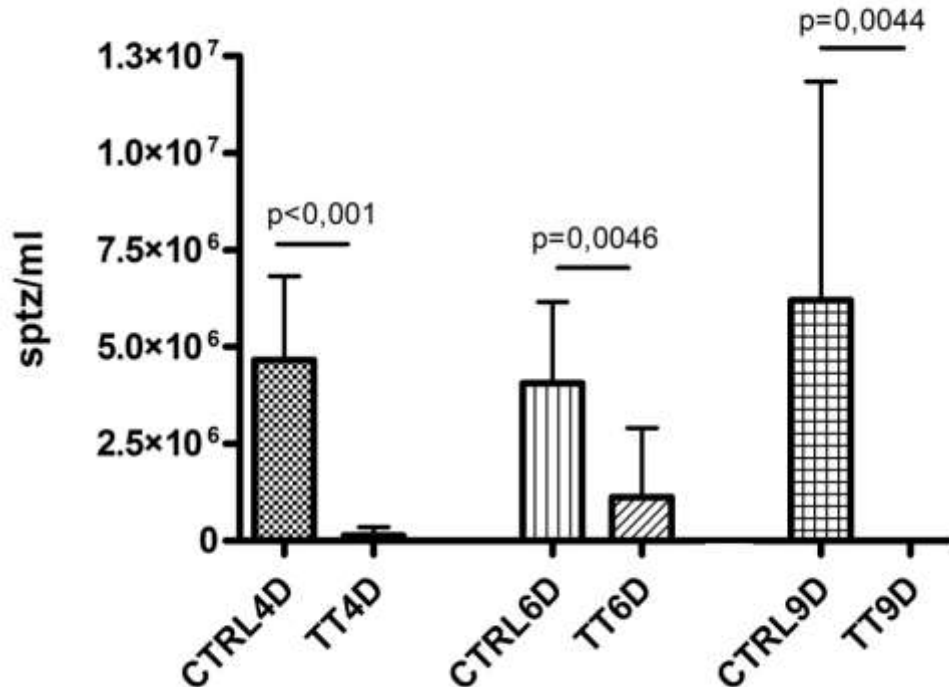
Figura 14 - Fotomicrografia dos espermatozoides na câmara de Neubauer em análise sob contraste de fase



Legenda: a) concentração de espermatozoides do epidídimo direito de um animal controle. b) concentração de espermatozoides do epidídimo direito de uma animal submetido à TT com 4 semanas de idade 100x.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 15 - Concentração dos espermatozóides dos epidídimos direitos dos ratos



Legenda: animais submetidos à cirurgia simulada:(CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

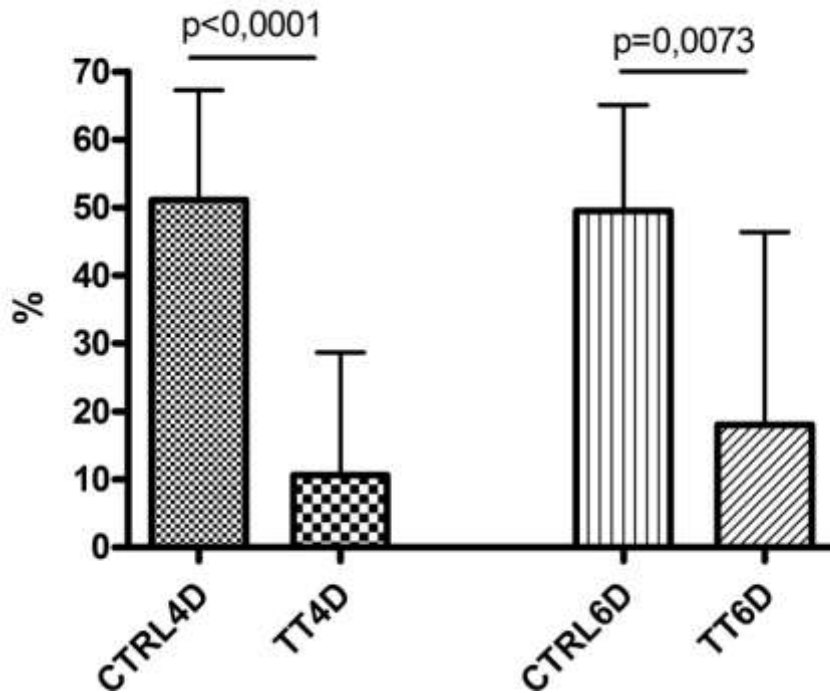
Fonte: RIBEIRO, 2013.

A análise da motilidade dos espermatozóides mostrou novamente um prejuízo causado pela TT, independentemente da idade em que a lesão foi induzida (Figura 16).

Nos grupos operados com 4 semanas, a motilidade foi reduzida de  $51,1 \pm 16,2$  % nos órgãos CTRL4D para  $10,6 \pm 18,0$  % nos epidídimos TT4D (redução de 79 %).

Entre os animais operados com 6 semanas, este parâmetro apresentou uma redução de  $49,5 \pm 15,5$  % nos órgãos CTRL6D para  $18,0 \pm 28,3$  % nos epidídimos TT6D (redução de 63 %).

Figura 16 - Motilidade dos espermatozoides dos epidídimos direitos dos ratos



Legenda: animais submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4 e 6 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

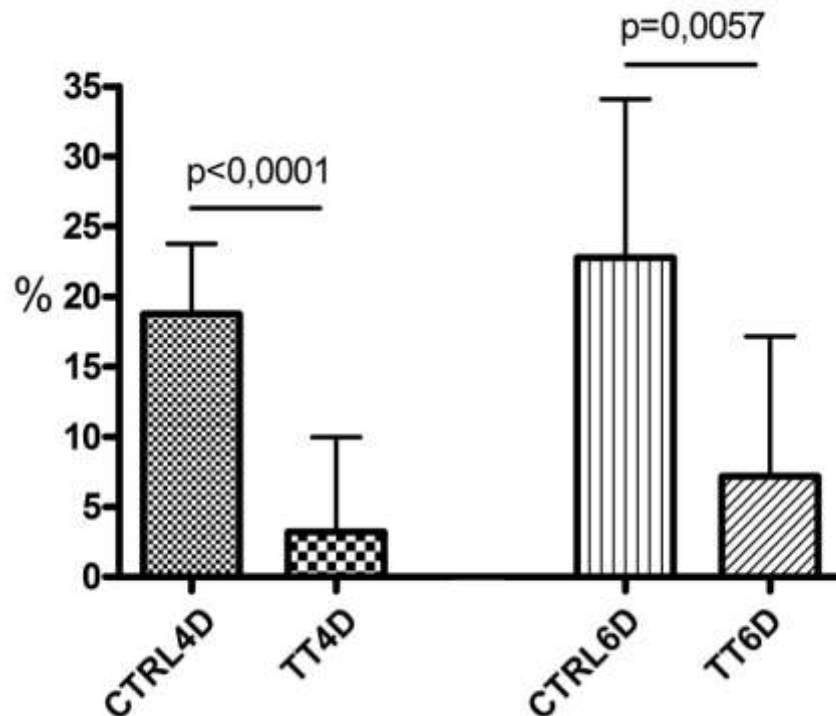
A análise de viabilidade dos espermatozoides, determinada pelo método hiposmótico, também foi afetada pela TT (Figura 17).

Entre os grupos operados com 4 semanas, houve uma redução de 82% da viabilidade (CTRL4D:  $18,7 \pm 5,0$  %; TT4D:  $3,2 \pm 6,7$  %).

Nos animais operados com 6 semanas, a redução foi de 68% neste parâmetro (CTRL6D:  $22,7 \pm 11,3$  %; TT6D:  $7,1 \pm 10,0$  %).



Figura 17 - Viabilidade dos espermatozóides dos epidídimos direitos dos ratos



Legenda: animais submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4 e 6 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.2.2 Avaliação biométrica

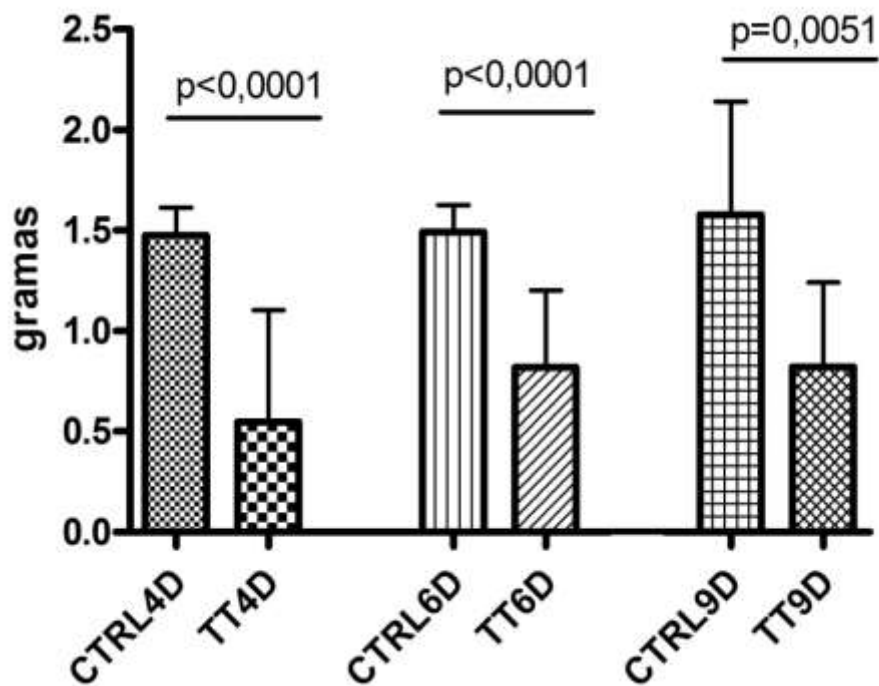
As análises do peso e volume mostraram que os testículos submetidos à TT sofreram uma diminuição significativa em comparação aos submetidos à cirurgia simulada. Tais diferenças, nos dois parâmetros, foram observadas entre os animais operados nas diferentes idades (Figuras 18, 19 e 20).

Entre os grupos operados com 4 semanas, a redução no peso testicular foi de 64% (CTRL4D:  $1,4 \pm 0,1$  g; TT4D:  $0,5 \pm 0,5$  g). A redução no volume testicular também foi de 64% (CTRL4D:  $1,4 \pm 0,1$  mL; TT4D:  $0,5 \pm 0,5$  mL).

Nos animais operados com 6 semanas, a redução do peso testicular foi de 57% (CTRL6D:  $1,4 \pm 0,1$  g; TT6D:  $0,6 \pm 0,2$  g) e a redução no volume testicular foi de 60% (CTRL6D:  $1,5 \pm 0,1$  mL; TT6D:  $0,6 \pm 0,3$  mL).

Nos grupos operados com 9 semanas, o peso do testículo foi reduzido de  $1,5 \pm 0,5$  g nos órgãos CTRL9D para  $0,8 \pm 0,4$  g nos testículos dos animais do grupo TT9D (redução de 46 %). O volume testicular destes grupos foi reduzido de  $1,5 \pm 0,5$  mL para  $0,7 \pm 0,4$  mL (redução de 53 %).

Figura 18 - Peso dos testículos direitos dos ratos

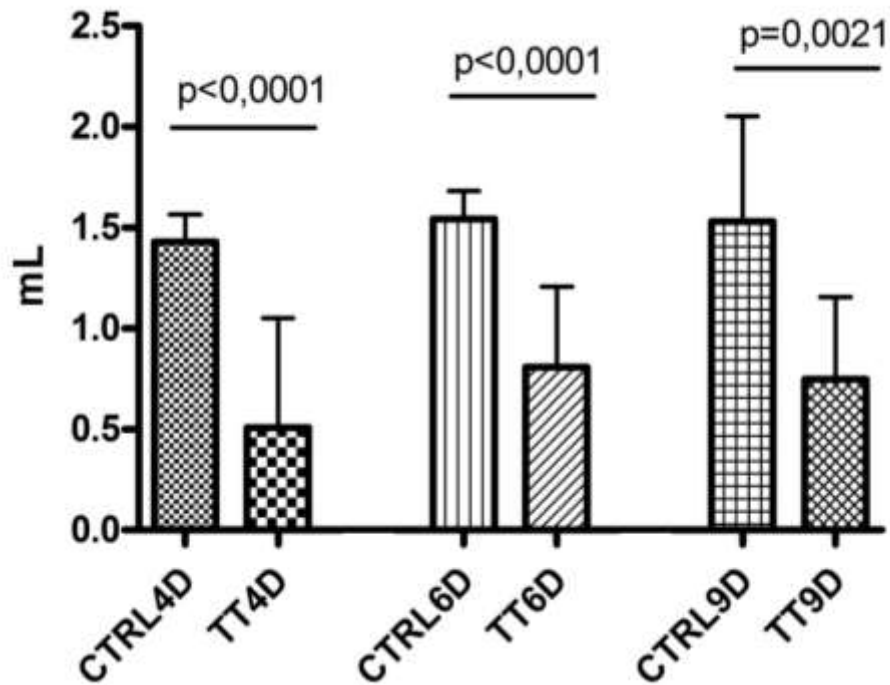


Legenda: animais submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 19 - Volume dos testículos direitos dos ratos



Legenda: animais submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 20 - Testículo direito de um animal submetido à cirurgia simulada (à esquerda), e testículo direito de um animal submetido à TT com 4 semanas de idade (à direita)



Fonte: RIBEIRO, 2013.

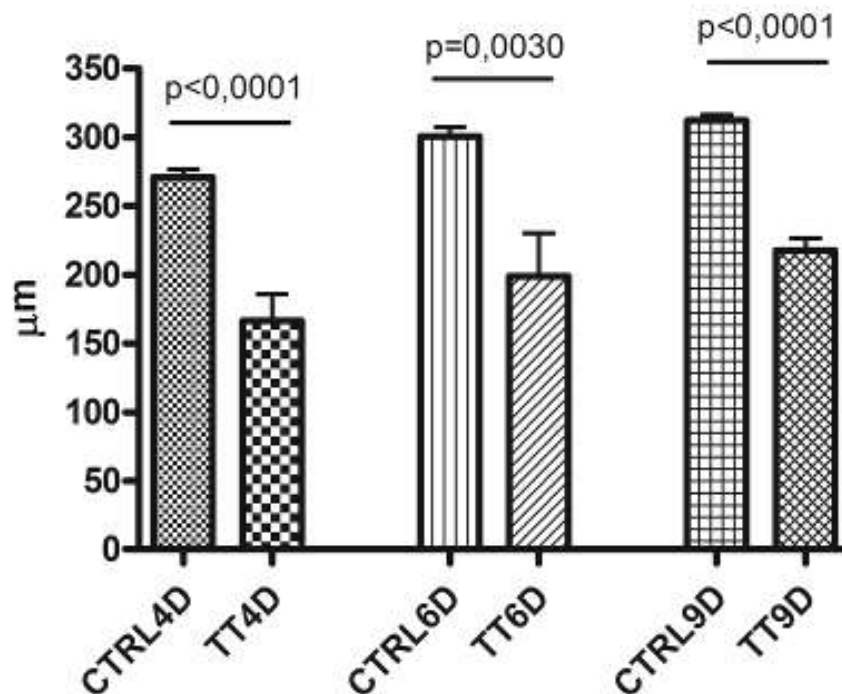
### 3.2.3 Avaliações histológicas

#### 3.2.3.1 Avaliações morfométricas

Para todas as análises morfométricas foram encontradas diferenças entre os testículos torcidos e os submetidos à cirurgia simulada entre os animais operados em pelo menos uma das idades.

Com relação ao diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero, tais diferenças foram marcantes entre os animais operados nas três diferentes idades (Figuras 21, 22 e 23). Destacaram-se os testículos do grupo TT9D onde em nenhum dos animais foi observado epitélio seminífero passível de ser mensurado (Figura 24).

Figura 21 - Diâmetro dos túbulos seminíferos

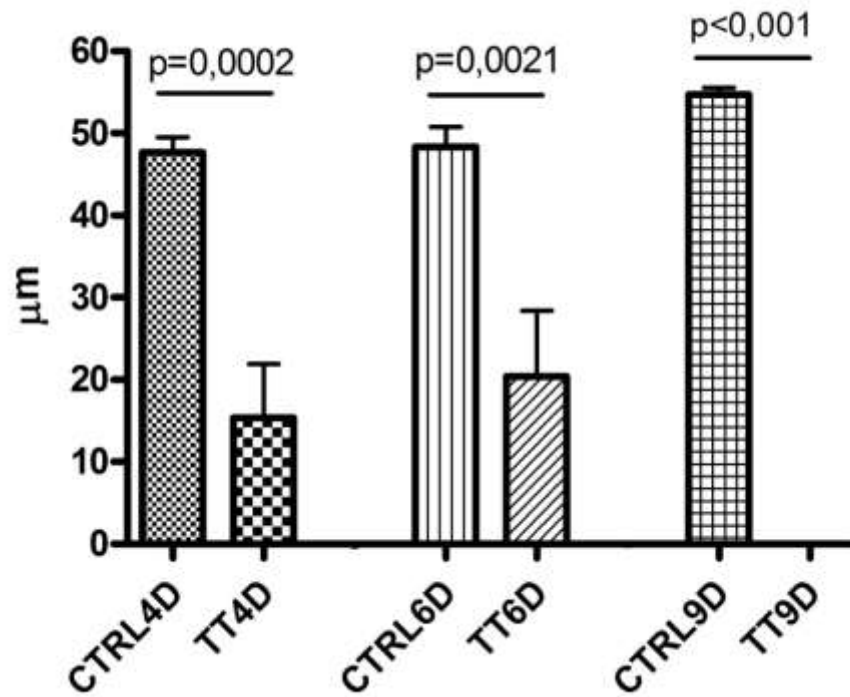


Legenda: testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 22 - Altura do epitélio seminífero seminíferos

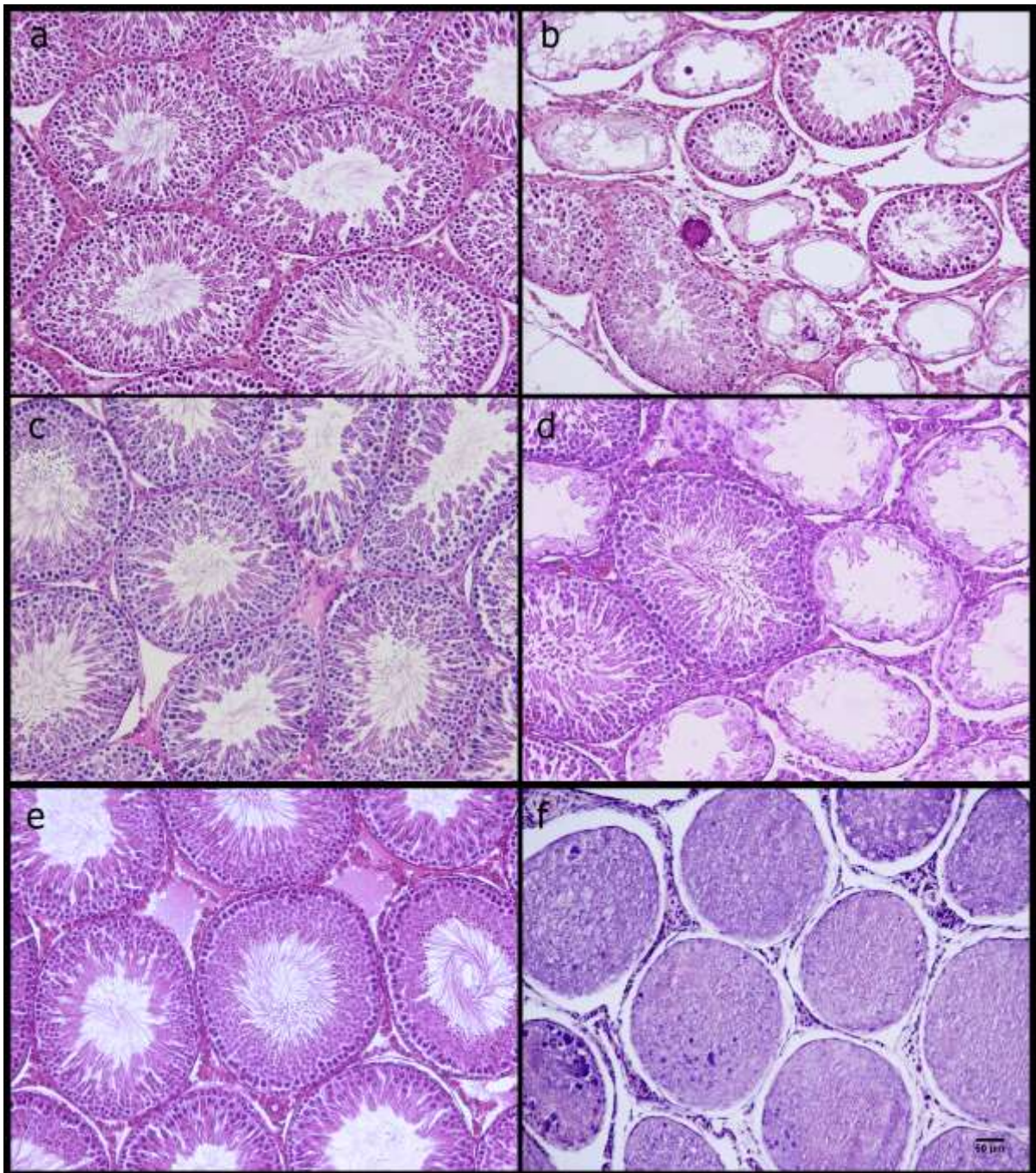


Legenda: testículos direitos dos ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 23 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



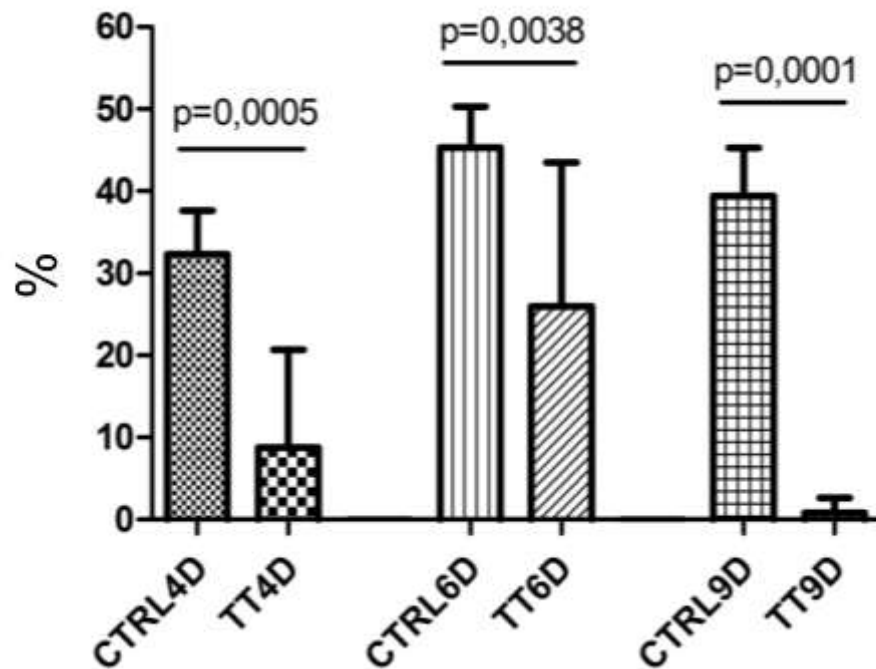
Legenda: a, c, e - testículos direitos de animais submetidos à cirurgia simulada dos grupos CTRL4D, CTRL6D e CTRL9D, respectivamente. b, d e f – testículos direitos de animais submetidos à TT dos grupos TT4D, TT6D e TT9D, respectivamente.

Nota: HE 200x.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

A densidade volumétrica do epitélio seminífero acompanhou os achados da altura deste epitélio, sendo reduzidos em todos os testículos torcidos em comparação aos submetidos à cirurgia simulada, em qualquer idade estudada (Figura 17).

Figura 24 - Densidade volumétrica do epitélio seminífero dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

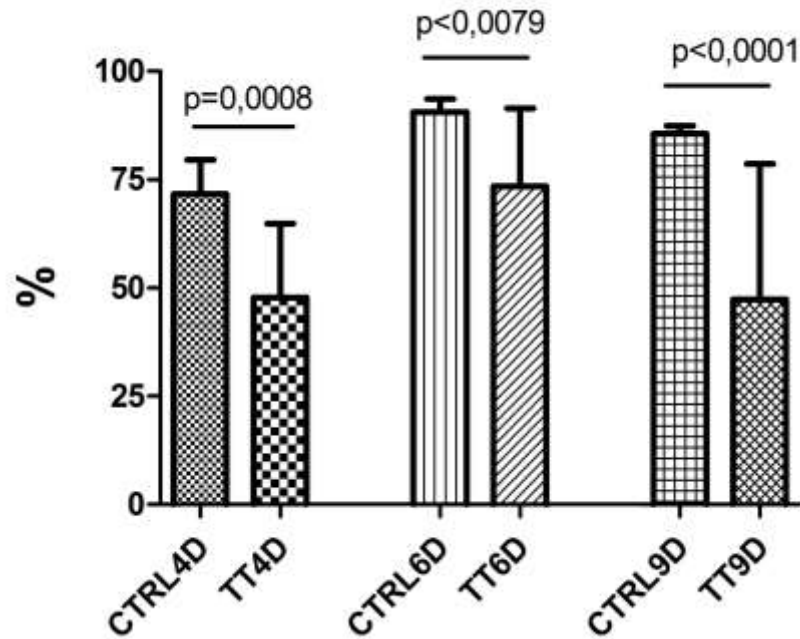
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Já a densidade volumétrica da túnica própria só se encontrou reduzida nos testículos submetidos à TT com 6 semanas de idade em comparação ao seu controle. Entre os grupos operados nas outras idades não houve diferença.

Com relação à densidade volumétrica do lúmen tubular, não houve diferença entre os testículos torcidos e controles independentemente da idade em que os animais foram operados.

Quando foi comparada a densidade volumétrica do compartimento tubular como um todo, novamente verificou-se uma diminuição significativa entre os testículos torcidos e seus controles, nos grupos operados nas três diferentes idades (Figura 25).

Figura 25 - Densidade volumétrica do compartimento tubular dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

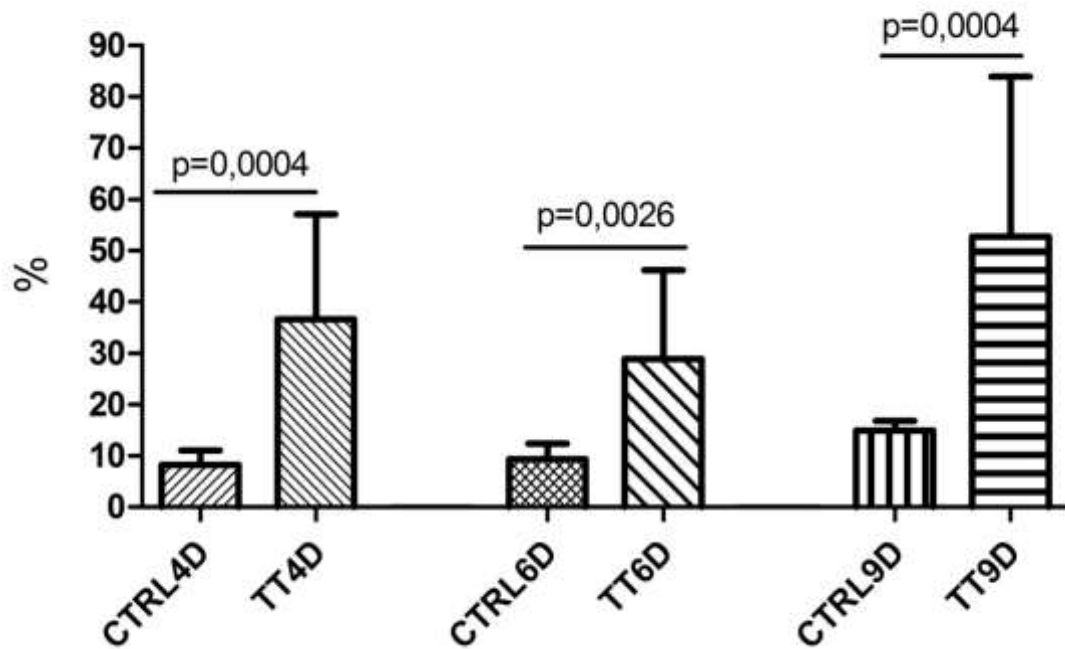
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

A densidade volumétrica do compartimento intertubular (espaço intersticial) teve um aumento significativo em todos os testículos torcidos comparados aos seus controles (Figura 26). Nestes órgãos, notou-se uma deposição de tecido colágeno no espaço intertubular, como pode ser notado na figura 26 da seção 4.2.3.4.



Figura 26 - Densidade volumétrica do espaço intersticial dos testículos direitos



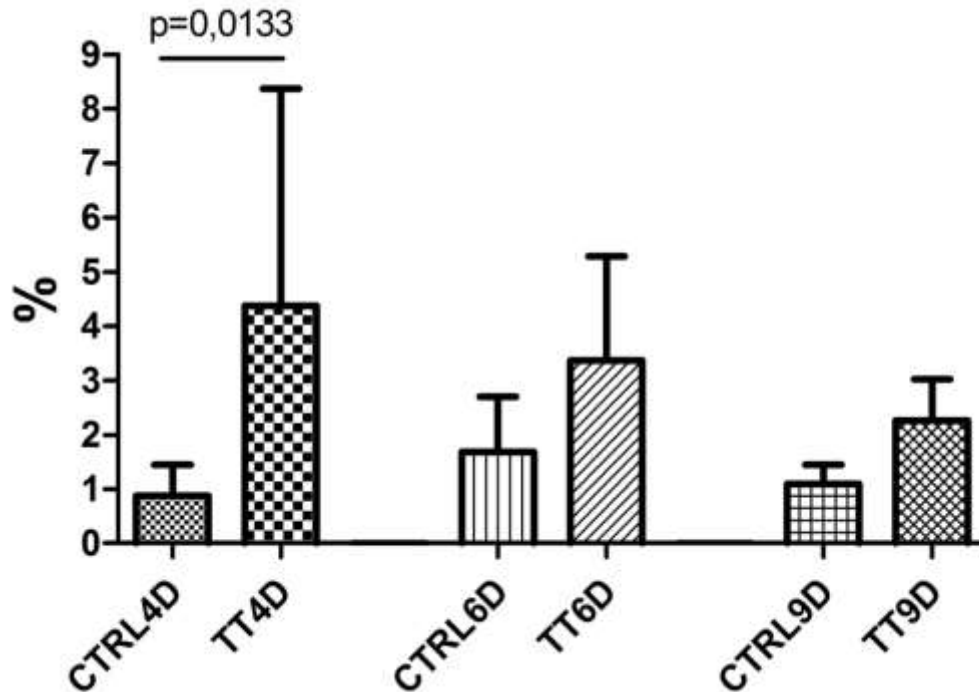
Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Em relação à densidade volumétrica dos vasos sanguíneos, somente o grupo operado com 4 semanas de idade apresentou aumento significativo no testículo torcido comparado ao seu controle (Figura 27).

Figura 27 - Densidade volumétrica dos vasos sanguíneos dos testículos direitos



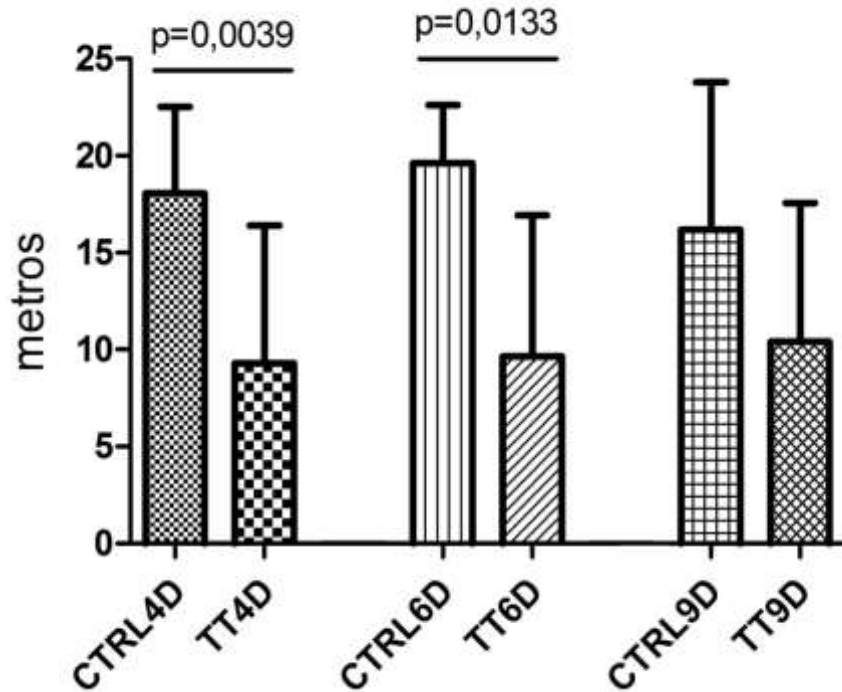
Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

O comprimento tubular apresentou diminuição nos testículos dos animais submetidos à TT com 4 e 6 semanas de idade em comparação aos seus controles. Já nos animais submetidos à TT com 9 semanas de idade, não houve diferença estatística neste parâmetro quando comparados aos seus animais controles. (Figura 28).

Figura 28 - Comprimento dos túbulos seminíferos dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

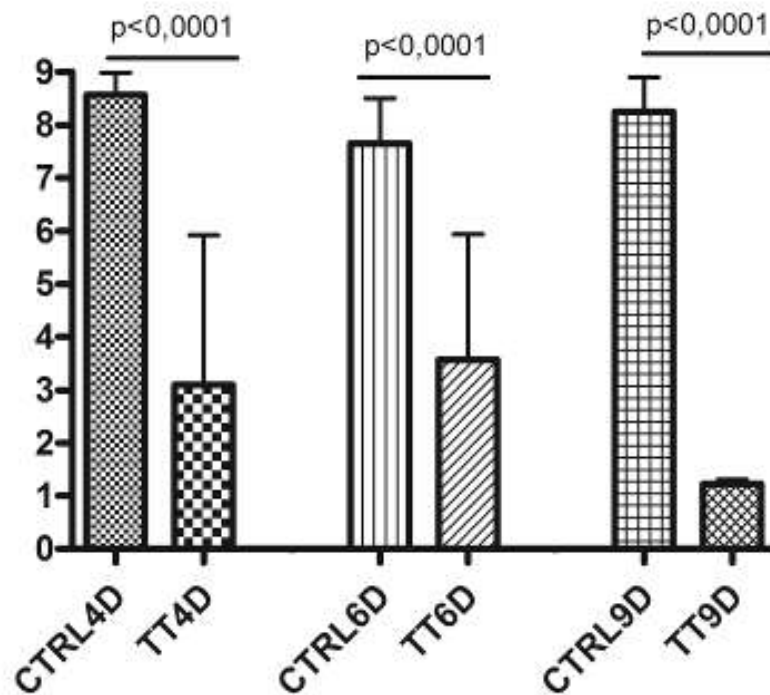
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.2.3.2 Escore de Johnsen

A análise do escore de Johnsen revelou uma maior lesão ao epitélio nos testículos torcidos comparados aos seus respectivos controles dentro de cada grupo (4, 6 e 9 semanas de idade) (Figura 29).

Figura 29 - Escore de Johnsen dos túbulos seminíferos dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

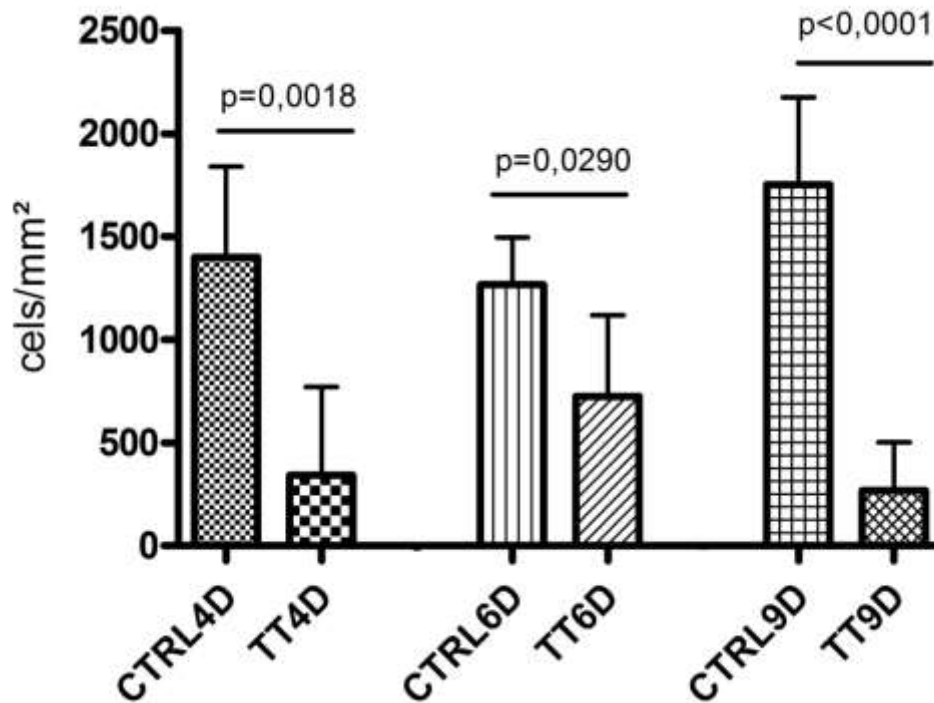
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.2.3.3 Avaliação da proliferação celular no testículo

A análise de proliferação celular no espaço tubular revelou uma diminuição significativa nos testículos torcidos, independente da idade em que foi realizada a injúria, comparados aos seus respectivos controles (Figuras 30 e 32).

Figura 30 - Proliferação celular do espaço tubular dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

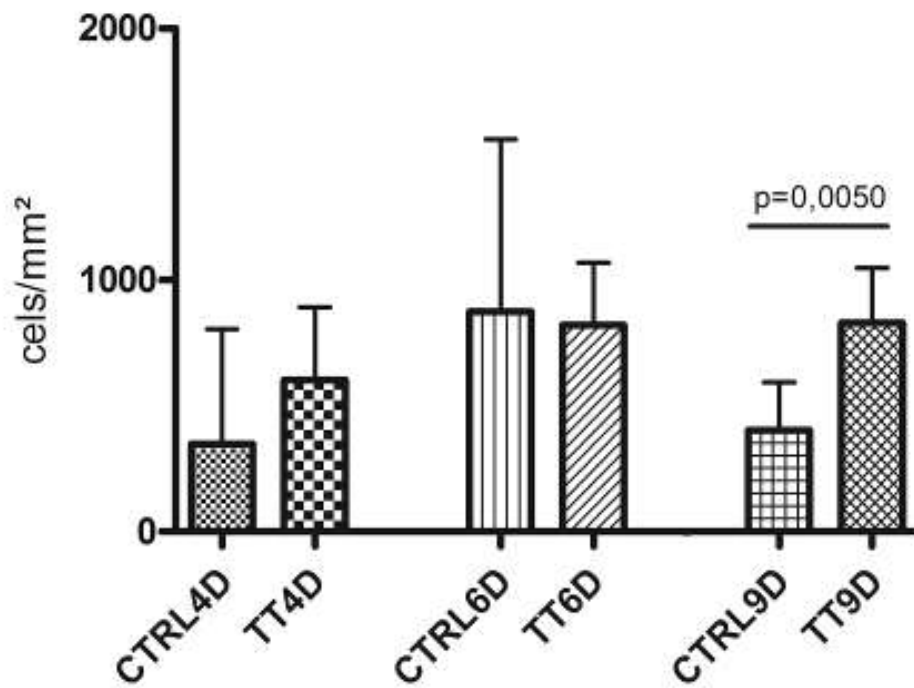
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

A análise do espaço intersticial mostrou um aumento das células em proliferação no testículo que foi submetido à TT com 9 semanas, comparado ao seu controle. Entre os demais grupos (4 e 6 semanas de idade) não houve diferença (Figura 31 e 32).

Todos os dados numéricos relativos à avaliação histológica estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6.

Figura 31 - Proliferação celular do espaço intersticial dos testículos direitos

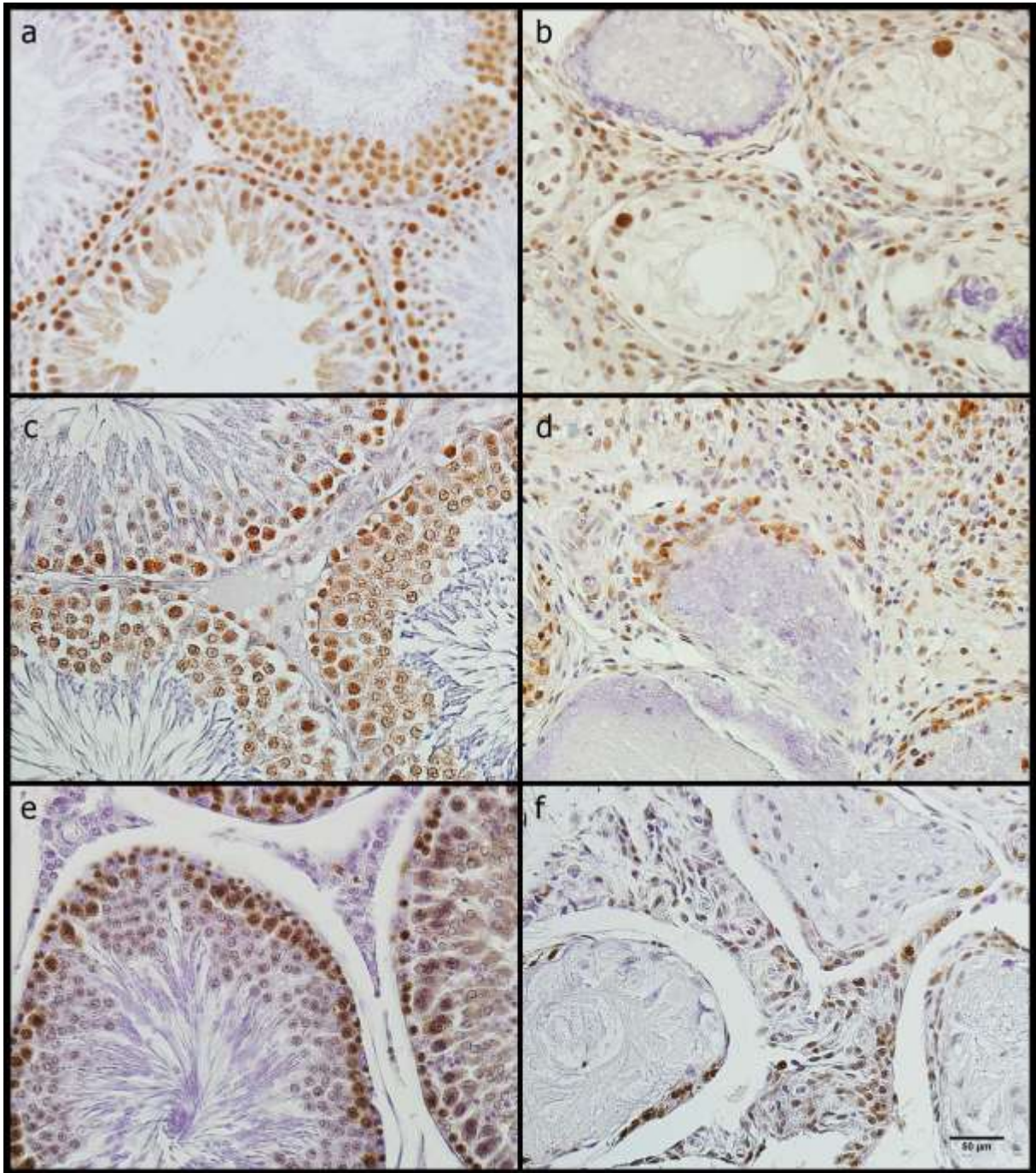


Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 32 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de ratos



Legenda: em marrom são as células imunocoradas pela técnica anti-PCNA mostrando a proliferação celular no espaço tubular e no espaço intersticial. a, c, e - testículos direitos de animais submetidos à cirurgia simulada dos grupos CRTL4D, CTRL6D e CTRL9D, respectivamente. b, d e f – testículos direitos de animais submetidos à TT dos grupos TT4D, TT6D e TT9D, respectivamente.

Nota: 400x.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 4 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4D e TT4D, respectivamente).

	<b>CTRL4D</b>	<b>TT4D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	270 $\pm$ 17,9a	166 $\pm$ 61,0b	0,0001
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	47,6 $\pm$ 5,81a	15,3 $\pm$ 20,7b	0,0002
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	32,3 $\pm$ 5,30a	8,75 $\pm$ 11,9b	0,0005
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,45 $\pm$ 0,06a	0,07 $\pm$ 0,13b	0,0001
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	6,67 $\pm$ 2,06	5,83 $\pm$ 1,83	0,3538
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,09 $\pm$ 0,03a	0,03 $\pm$ 0,03b	0,0010
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	32,6 $\pm$ 7,13	33,2 $\pm$ 6,37	0,8485
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,47 $\pm$ 0,13a	0,15 $\pm$ 0,14b	0,0001
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	71,6 $\pm$ 7,90a	47,8 $\pm$ 17,0b	0,0008
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,02 $\pm$ 0,18a	0,25 $\pm$ 0,31b	0,0001
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	8,23 $\pm$ 2,85a	36,5 $\pm$ 20,5b	0,0004
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,11 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,25	0,6063
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	0,87 $\pm$ 0,57a	4,37 $\pm$ 3,99b	0,0133
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,03	0,6171
<b>Comprimento tubular (m)</b>	18,0 $\pm$ 4,45a	9,29 $\pm$ 7,11b	0,0039
<b>Escore de Johnsen</b>	8,55 $\pm$ 0,42a	3,09 $\pm$ 2,82b	0,0001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,3x10 <sup>3</sup> $\pm$ 439a	343 $\pm$ 426b	0,0018
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	349 $\pm$ 454	601 $\pm$ 291	0,2784

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.



Tabela 5 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6D e TT6D, respectivamente).

	<b>CTRL6D</b>	<b>TT6D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	300 $\pm$ 21,8a	198 $\pm$ 89,2b	0,0030
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	48,3 $\pm$ 7,56a	15,6 $\pm$ 19,8b	0,0002
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	45,3 $\pm$ 4,95a	25,9 $\pm$ 17,5b	0,0038
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,69 $\pm$ 0,06a	0,26 $\pm$ 0,24b	0,0001
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	6,66 $\pm$ 1,95	5,76 $\pm$ 0,93	0,2266
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,10 $\pm$ 0,02a	0,04 $\pm$ 0,01b	0,0001
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	38,6 $\pm$ 7,76	38,8 $\pm$ 11,4	0,9733
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,60 $\pm$ 0,16a	0,32 $\pm$ 0,18b	0,0023
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	90,6 $\pm$ 2,98a	73,4 $\pm$ 17,9b	0,0079
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,39 $\pm$ 0,14a	0,63 $\pm$ 0,43b	0,0013
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	9,34 $\pm$ 2,98a	28,8 $\pm$ 17,2b	0,0026
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,14 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,05	0,1875
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	1,68 $\pm$ 1,02	3,36 $\pm$ 1,91	0,0676
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,6754
<b>Comprimento tubular (m)</b>	19,6 $\pm$ 3,01a	9,63 $\pm$ 7,28b	0,0133
<b>Escore de Johnsen</b>	7,64 $\pm$ 0,85a	3,56 $\pm$ 2,37b	0,0001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,2x10 <sup>3</sup> $\pm$ 230a	723 $\pm$ 394b	0,0290
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	874 $\pm$ 686	821 $\pm$ 247	0,8616

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 6 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9D e TT9D, respectivamente).

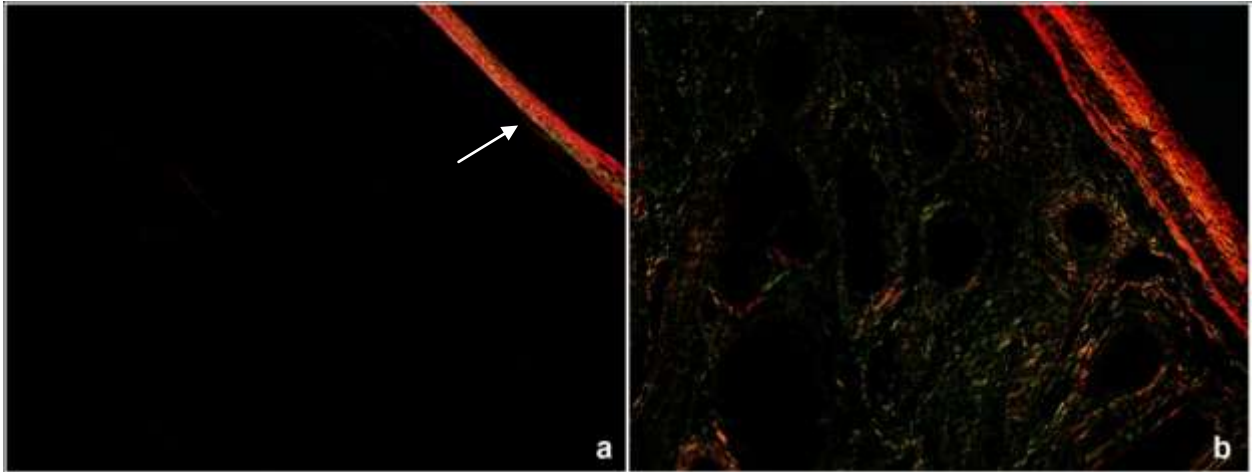
	<b>CTRL9D</b>	<b>TT9D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	312 $\pm$ 12,1a	217 $\pm$ 23,3b	0,0001
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	54,7 $\pm$ 2,63a	0,00 $\pm$ 0,00b	0,0001
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	39,4 $\pm$ 5,86a	0,84 $\pm$ 1,78b	0,0001
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,55 $\pm$ 0,26a	0,00 $\pm$ 0,01b	0,0001
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	5,19 $\pm$ 1,08	3,72 $\pm$ 2,53	0,2070
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,07 $\pm$ 0,03a	0,02 $\pm$ 0,02b	0,0087
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	40,4 $\pm$ 7,32	42,7 $\pm$ 28,5	0,3277
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,53 $\pm$ 0,27	0,31 $\pm$ 0,23	0,1119
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	85,6 $\pm$ 1,76a	47,3 $\pm$ 31,2b	0,0001
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,17 $\pm$ 0,55a	0,34 $\pm$ 0,26b	0,0016
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	14,9 $\pm$ 1,93a	52,6 $\pm$ 31,2b	0,0004
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,20 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,44	0,3165
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	1,10 $\pm$ 0,34a	2,26 $\pm$ 0,75b	0,0039
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,6545
<b>Comprimento tubular (m)</b>	16,1 $\pm$ 7,63	10,4 $\pm$ 7,15	0,1812
<b>Escore de Johnsen</b>	8,24 $\pm$ 0,65a	1,93 $\pm$ 2,00b	0,0001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,7x10 <sup>3</sup> $\pm$ 424a	267 $\pm$ 233b	0,0001
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	401 $\pm$ 191a	828 $\pm$ 219b	0,0050

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

#### 3.2.3.4 Avaliação do colágeno no testículo

Foi verificado aumento do colágeno no interior dos testículos dos três grupos submetidos à TT. Em todos os grupos, o predomínio de fibras birrefringentes em coloração esverdeada foi marcante. Em todos os animais submetidos à cirurgia simulada quantidades mínimas de fibras colágenas foram visualizadas no interior do testículo (Figura 33).

Figura 33 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: a) Testículo controle de um animal do grupo 4 semanas de idade (CTRL4R), em que praticamente não há presença de colágeno. A seta aponta para a túnica albugínea, que é rica em colágeno. b) testículo torcido de um animal do grupo 4 semanas de idade (TT4R) com grande depósito de fibras colágenas com emissão de birrefringência esverdeada.

Nota: Picrosirius red com polarização 200x.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

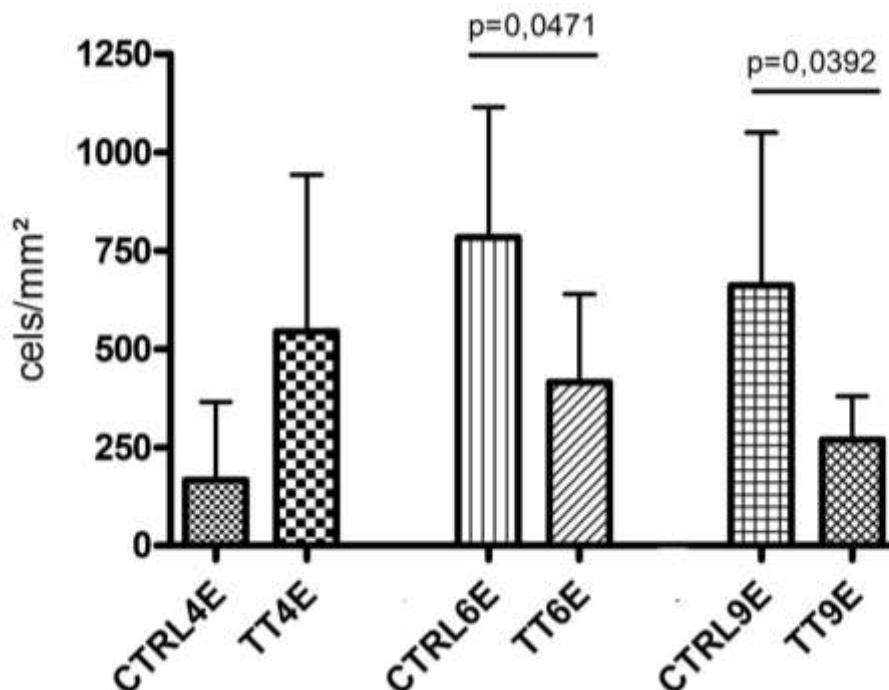
### 3.3 Produção espermática e morfologia de testículos contralaterais (esquerdos) após TT ipsilateral (dos testículos direitos) em diferentes idades.

As análises comparativas entre os órgãos contralaterais ao testículo torcido (TTE) ou submetido à cirurgia simulada (CTRL) mostraram diferença significativa somente com relação à densidade do compartimento tubular, volume absoluto da túnica própria e à proliferação celular no espaço intersticial.

Em relação à densidade do compartimento tubular e ao volume absoluto da túnica própria, houve uma diminuição significativa nos testículos contralaterais dos animais do grupo TT9 em comparação aos seus controles (CTRL9).

Já em relação à proliferação celular no espaço intersticial, foi observada uma diminuição no número de células em proliferação no interstício dos testículos contralaterais aos submetidos à TT em comparação aos seus controles, nos animais operados com 6 e 9 semanas de idade. Esta alteração não foi observada quando analisados os órgãos de animais operados com 4 semanas de idade (Figura 34).

Figura 34 - Proliferação celular do espaço intersticial dos testículos esquerdos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL) ou torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Em todos os outros parâmetros analisados, não foi observada diferença significativa entre os órgãos contralaterais ao testículo torcido (TTE) ou submetido à cirurgia simulada (CTRL4E).

Todos os resultados das análises destes parâmetros estão apresentados nas tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

Tabela 7 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4E e TT4E, respectivamente).

	<b>CTRL4E</b>	<b>TT4E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	1,57 ± 0,06	1,60 ± 0,09	0,41
<b>Volume (mL)</b>	1,51 ± 0,08	1,55 ± 0,08	0,33

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 8 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6E e TT6E, respectivamente)..

	<b>CTRL6E</b>	<b>TT6E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	1,61 ± 0,06	1,61 ± 0,15	0,91
<b>Volume (mL)</b>	1,56 ± 0,17	1,59 ± 0,22	0,72

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 9 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9E e TT9E, respectivamente).

	<b>CTRL9E</b>	<b>TT9E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	1,74 ± 0,13	1,80 ± 0,17	0,41
<b>Volume (mL)</b>	1,68 ± 0,14	1,68 ± 0,14	0,94

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 10 - Resultados numéricos das análises dos parâmetros dos espermatozóides dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4E e TT4E, respectivamente).

	<b>CTRL4E</b>	<b>TT4E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Concentração (eptz/mL)</b>	$5,6 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^6$	0,26
<b>Motilidade (%)</b>	$44,4 \pm 7,01$	$53,9 \pm 15,2$	0,08
<b>Viabilidade (%)</b>	$29,1 \pm 7,87$	$26,1 \pm 6,24$	0,35

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 11 - Resultados numéricos das análises dos parâmetros dos espermatozóides dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6E e TT6E, respectivamente).

	<b>CTRL6E</b>	<b>TT6E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Concentração (eptz/mL)</b>	$4,5 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6 \pm 3,0 \times 10^6$	0,66
<b>Motilidade (%)</b>	$57,1 \pm 16,0$	$50,4 \pm 23,6$	0,47
<b>Viabilidade (%)</b>	$24,6 \pm 11,2$	$21,6 \pm 8,23$	0,52

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 12 - Resultados numéricos das análises dos parâmetros dos espermatozóides dos testículos esquerdos dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9E e TT9E, respectivamente).

	<b>CTRL9E</b>	<b>TT9E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Concentração (eptz/mL)</b>	$8,6 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6 \pm 2,4 \times 10^6$	0,37
<b>Motilidade (%)</b>	$42,1 \pm 10,5$	$47,1 \pm 10,5$	0,31
<b>Viabilidade (%)</b>	$17,5 \pm 3,59$	$18,5 \pm 9,35$	0,75

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 13 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 4 semanas de idade (CTRL4E e TT4E, respectivamente).

	<b>CTRL4E</b>	<b>TT4E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	274 $\pm$ 24,6	269 $\pm$ 20,7	0,6529
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	48,8 $\pm$ 6,17	47,7 $\pm$ 5,26	0,6740
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	39,9 $\pm$ 6,30	39,9 $\pm$ 6,78	0,9988
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,60 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,11	0,7541
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	7,32 $\pm$ 1,90	7,71 $\pm$ 1,82	0,6781
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,12 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,03	0,7140
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	36,6 $\pm$ 9,82	39,7 $\pm$ 7,35	0,4459
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,55 $\pm$ 0,16	0,61 $\pm$ 0,12	0,3966
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	82,4 $\pm$ 12,7	85,8 $\pm$ 6,81	0,4583
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,28 $\pm$ 0,23	1,36 $\pm$ 0,08	0,3352
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	5,83 $\pm$ 1,78	6,19 $\pm$ 2,76	0,6305
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,04	0,6434
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	0,22 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 1,24	0,1230
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	3x10 <sup>-3</sup> $\pm$ 2x10 <sup>-3</sup>	0,01 $\pm$ 0,01	0,1720
<b>Comprimento tubular (m)</b>	22,0 $\pm$ 6,55	23,7 $\pm$ 4,35	0,7959
<b>Escore de Johnsen</b>	8,78 $\pm$ 0,33	8,84 $\pm$ 0,30	0,6794
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,6x10 <sup>3</sup> $\pm$ 359	1,5x10 <sup>3</sup> $\pm$ 293	0,6198
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	292 $\pm$ 221	544 $\pm$ 399	0,2051

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  
 Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 14 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 6 semanas de idade (CTRL6E e TT6E, respectivamente).

	<b>CTRL6E</b>	<b>TT6E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	311 $\pm$ 11,0	307 $\pm$ 17,8	0,4985
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	53,6 $\pm$ 2,79	53,2 $\pm$ 3,50	0,7983
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	46,1 $\pm$ 4,77	45,7 $\pm$ 4,40	0,8543
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,71 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,13	0,8251
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	5,65 $\pm$ 1,54	6,29 $\pm$ 1,17	0,3343
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,7449
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	39,3 $\pm$ 7,35	39,1 $\pm$ 4,81	0,9380
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,61 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,13	0,8745
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	85,8 $\pm$ 6,81	90,6 $\pm$ 2,80	0,0531
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,42 $\pm$ 0,17	1,45 $\pm$ 0,24	0,7944
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	8,84 $\pm$ 2,30	9,36 $\pm$ 2,96	0,6752
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,13 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,03	0,5941
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	1,20 $\pm$ 0,77	0,81 $\pm$ 0,52	0,2928
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,9835
<b>Comprimento tubular (m)</b>	18,4 $\pm$ 3,15	19,3 $\pm$ 3,52	0,5586
<b>Escore de Johnsen</b>	8,88 $\pm$ 0,22	8,82 $\pm$ 0,27	0,6001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,5x10 <sup>3</sup> $\pm$ 365	1,3x10 <sup>3</sup> $\pm$ 190	0,2352
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	784 $\pm$ 330a	415 $\pm$ 223b	0,0471

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  
 Fonte: RIBEIRO, 2013.



Tabela 15 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à cirurgia simulada e torção testicular com 9 semanas de idade (CTRL9E e TT9E, respectivamente).

	<b>CTRL9E</b>	<b>TT9E</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	308 $\pm$ 16,0	299 $\pm$ 10,9	0,1799
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	54,1 $\pm$ 3,21	54,1 $\pm$ 1,29	0,9948
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	39,0 $\pm$ 5,83	40,8 $\pm$ 3,41	0,4539
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,69 $\pm$ 0,09	0,66 $\pm$ 0,09	0,5931
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	5,40 $\pm$ 0,52	5,00 $\pm$ 0,55	0,1851
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,09 $\pm$ 0,00a	0,08 $\pm$ 0,00b	0,0359
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	39,8 $\pm$ 4,96	38,1 $\pm$ 3,15	0,4181
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,68 $\pm$ 0,11	0,64 $\pm$ 0,07	0,4371
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	91,1 $\pm$ 2,30a	84,0 $\pm$ 2,19b	<0,0001
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,43 $\pm$ 0,10	1,41 $\pm$ 0,13	0,7707
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	15,6 $\pm$ 2,69	15,9 $\pm$ 2,19	0,8106
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,26 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,03	0,9838
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	0,87 $\pm$ 0,45	0,84 $\pm$ 0,53	0,9059
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01 $\pm$ 7x10 <sup>-3</sup>	0,01 $\pm$ 8x10 <sup>-3</sup>	0,8776
<b>Comprimento tubular (m)</b>	20,4 $\pm$ 2,39	20,2 $\pm$ 2,84	0,8925
<b>Escore de Johnsen</b>	8,87 $\pm$ 0,17	8,91 $\pm$ 0,12	0,5683
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,6x10 <sup>3</sup> $\pm$ 462	1,4x10 <sup>3</sup> $\pm$ 362	0,3442
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	661 $\pm$ 389a	269 $\pm$ 110b	0,0392

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.4 Influência do momento da indução experimental da TT sobre as alterações da função reprodutiva, produção espermática e morfologia testicular na idade adulta.

#### 3.4.1 Teste de fertilidade

Não houve diferença em nenhum dos parâmetros do teste de fertilidade entre os animais submetidos à TT em diferentes idades. Os dados numéricos dessa análise estão na tabela 16.

Tabela 16 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.

	<b>TT4</b>	<b>TT6</b>	<b>TT9</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,50±0,23	0,33±0,28	0,37±0,30	0,26
<b>Fertilidade</b>	0,77±0,29	0,85±0,19	0,78±0,35	0,84
<b>Fecundidade</b>	0,90±0,31	0,66±0,47	0,60±0,51	0,18
<b>Perda pré-implantação</b>	0,12±0,06	0,17±0,18	0,08±0,08	0,66
<b>Perda pós-implantação</b>	0,05±0,07	0,11±0,11	0,04±0,09	0,36
<b>Fetos por ninhada</b>	11,31±1,62	10,75±2,36	7,77±5,96	0,81
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,38±0,27	2,45±0,07	2,27±0,07	0,78
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,99±0,15	2,92±0,09	2,77±0,03	0,56

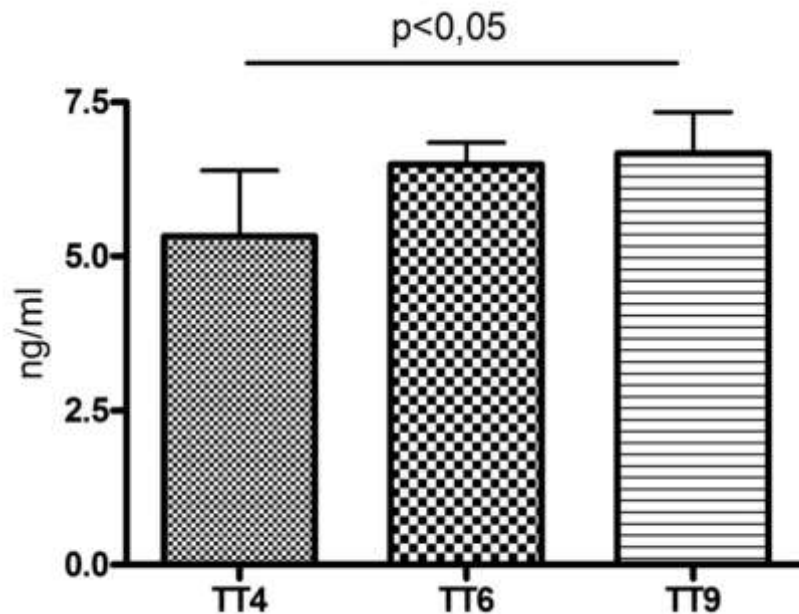
Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

#### 3.4.2 Dosagem da testosterona sérica

A ANOVA mostrou que existe diferença dos níveis de testosterona sérica entre os animais operados em idades diferentes ( $p=0,015$ ). O pós-teste de Bonferroni verificou que o grupo TT9 teve testosterona sérica significativamente maior que o grupo TT4. As demais comparações (TT4 versus TT6 e TT6 versus TT9) não mostraram diferença significativa (Figura 35).

Figura 35 - Testosterona sérica dos ratos adultos submetidos à torção testicular com 4, 6 ou 9 semanas de idade



Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.4.3 Avaliações dos espermatozóides

As avaliações dos espermatozóides (concentração, motilidade e viabilidade) colhidos dos testículos direitos de animais submetidos à TT em diferentes idades (TT4D, TT6D e TT9D) não apresentaram diferença significativa. Os dados numéricos dessas análises estão na tabela 17.

Tabela 17 - Resultados numéricos das avaliações dos espermatozóides dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.

	TT4D	TT6D	TT9D	Valor de p
<b>Concentração</b>	$0,1 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$	$0,00 \pm 0,00$	0,05
<b>Motilidade</b>	$10,6 \pm 18,0$	$18,9 \pm 28,3$	*	0,16
<b>Viabilidade</b>	$3,20 \pm 6,74$	$7,16 \pm 10,0$	*	0,32

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* - O grupo TT9D não apresentou espermatozóides, por isso não foi possível avaliar a motilidade e viabilidade.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.4.4 Avaliação biométrica

As análises do peso e volume dos testículos direitos (TT4D, TT6D e TT9D) não apresentaram diferença entre si. Os dados numéricos dessas análises estão na tabela 18.

Tabela 18 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.

	<b>TT4D</b>	<b>TT6D</b>	<b>TT9D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	0,54 ± 0,55	0,67 ± 0,29	0,74 ± 0,40	0,62
<b>Volume (mL)</b>	0,51 ± 0,54	0,66 ± 0,33	0,74 ± 0,40	0,51

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.4.5 Análises histológicas

A maioria dos parâmetros analisados não revelaram diferença entre os grupos operados com 4, 6 ou 9 semanas de idade. Apenas para o volume absoluto do epitélio e as densidades volumétricas do epitélio, túnica própria e compartimento tubular foram detectadas diferenças estatisticamente significativas.

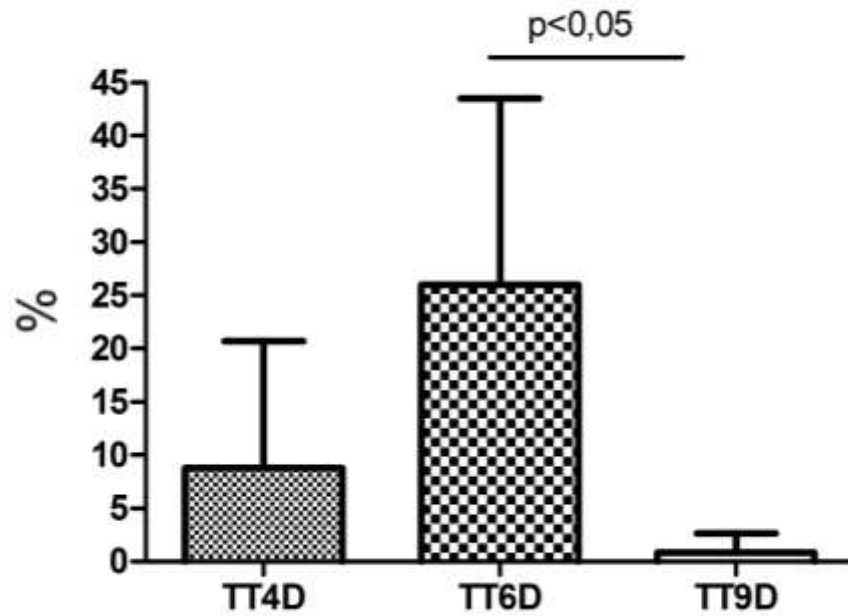
Em relação às densidades volumétricas da túnica própria e do compartimento tubular, a ANOVA mostrou diferença entre os três grupos analisados, contudo na análise grupo versus grupo, o pós teste aplicado não foi capaz de apontar nenhuma diferença.

Tanto a densidade volumétrica quanto o volume absoluto do epitélio, a análise estatística apontou diferença entre os três grupos. No que diz respeito à densidade volumétrica, esta estrutura estava aumentada nos testículos dos animais operados com 6 semanas de idade (TT6D) em relação aos TT9D (Figura 36) As demais comparações do pós teste não revelaram diferenças significativas. Já as análises do volume absoluto desta estrutura mostraram que o grupo TT6D foi significativamente maior que os demais grupos.

Todos os dados numéricos relativos às análises histológicas estão na tabela 19.

As análises qualitativas do padrão de colágeno mostraram um predomínio de fibras colágenas birrefringentes em coloração esverdeada nos testículos torcidos dos grupos de todas as idades, sem qualquer distinção entre os grupos.

Figura 36 - Densidade volumétrica do epitélio seminífero dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à torção testicular (TT) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)  
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 19 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos animais submetidos à torção testicular em diferentes idades.

	<b>TT4D</b>	<b>TT6D</b>	<b>TT9D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	166 $\pm$ 61,0	198 $\pm$ 89,2	217 $\pm$ 23,3	0,2747
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	15,3 $\pm$ 20,7	15,6 $\pm$ 19,8	0,00 $\pm$ 0,00	0,0959
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	8,75 $\pm$ 11,9a,b	25,9 $\pm$ 17,5a	0,84 $\pm$ 1,78b	0,0005
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,07 $\pm$ 0,13a	0,26 $\pm$ 0,24b	0,00 $\pm$ 0,01a	0,0065
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	5,83 $\pm$ 1,83	5,76 $\pm$ 0,93	3,72 $\pm$ 2,53	0,0381
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,02	0,2802
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	33,2 $\pm$ 6,37	38,8 $\pm$ 11,4	42,7 $\pm$ 28,5	0,5097
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,15 $\pm$ 0,14	0,32 $\pm$ 0,18	0,31 $\pm$ 0,23	0,1203
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	47,8 $\pm$ 17,0	73,4 $\pm$ 17,9	47,3 $\pm$ 31,2	0,0246
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	0,25 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,43	0,34 $\pm$ 0,26	0,0651
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	36,5 $\pm$ 20,5	28,8 $\pm$ 17,2	52,6 $\pm$ 31,2	0,1138
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,15 $\pm$ 0,25	0,17 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,44	0,1691
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	4,37 $\pm$ 3,99	3,36 $\pm$ 1,91	2,26 $\pm$ 0,75	0,2669
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,7620
<b>Comprimento tubular (m)</b>	9,29 $\pm$ 7,11	9,63 $\pm$ 7,28	10,4 $\pm$ 7,15	0,9477
<b>Escore de Johnsen</b>	3,09 $\pm$ 2,82	3,56 $\pm$ 2,37	1,93 $\pm$ 2,00	0,3895
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	343 $\pm$ 426	723 $\pm$ 394	267 $\pm$ 233	0,1214
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	601 $\pm$ 291	821 $\pm$ 247	828 $\pm$ 219	0,2463

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.5 Efeito do tratamento pós-operatório com resveratrol como protetor da função reprodutiva, produção espermática e morfologia de testículos em animais submetidos à TT em diferentes idades.

#### 3.5.1 Teste de fertilidade

As análises do teste de fertilidade dos machos submetidos à TT com 4 e 6 semanas de idade mostraram que o tratamento com resveratrol promoveu melhora da potência em 52% e 142%, respectivamente, em comparação com os animais submetidos à TT que não receberam tratamento. Contudo, no grupo RES6, o peso dos fetos apresentou diminuição significativa em comparação ao seu controle.

Nos animais do grupo RES9 o tratamento promoveu uma melhora de 81% na fecundidade em comparação ao grupo TT9. Houve ainda um aumento da circunferência torácica da prole dos animais do grupo RES9 em comparação aos do TT9.

Os dados numéricos estão expressos nas tabelas 20, 21 e 22.

Tabela 20 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 4 semanas de idade (CTRL4, TT4 e RES4 respectivamente).

	<b>CTRL4</b>	<b>TT4</b>	<b>RES4</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,61 ± 0,15a,b	0,50 ± 0,23a	0,76±0,22b	0,02
<b>Fertilidade</b>	0,89 ± 0,15	0,77 ± 0,29	0,93±0,09	0,21
<b>Fecundidade</b>	1,00 ± 0,00	0,90 ± 0,31	1,00±0,00	0,36
<b>Perda pré-implantação</b>	0,10 ± 0,15	0,12 ± 0,06	0,06±0,09	0,53
<b>Perda pós-implantação</b>	0,10 ± 0,14	0,05 ± 0,07	0,05±0,04	0,51
<b>Fetos por ninhada</b>	11,0 ± 2,57	11,31 ± 1,62	11,83±1,44	0,64
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,28 ± 0,21	2,38 ± 0,27	2,36±0,20	0,61
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,91 ± 0,20	2,99 ± 0,15	2,84±0,15	0,20

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 21 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 6 semanas de idade (CTRL6, TT6 e RES6 respectivamente).

	<b>CTRL6</b>	<b>TT6</b>	<b>RES6</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,56 ± 0,31a,b	0,33 ± 0,28a	0,80±0,26b	0,01
<b>Fertilidade</b>	0,83 ± 0,12	0,85 ± 0,19	0,98±0,07	0,08
<b>Fecundidade</b>	0,90 ± 0,31	0,66 ± 0,47	1,00±0,00	0,13
<b>Perda pré-implantação</b>	0,13 ± 0,09	0,17 ± 0,18	0,01±0,07	0,05
<b>Perda pós-implantação</b>	0,21 ± 0,39	0,11 ± 0,11	0,10±0,11	0,67
<b>Fetos por ninhada</b>	10,57 ± 2,27	10,75 ± 2,36	10,94±1,65	0,94
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,54 ± 0,22a	2,45 ± 0,07a,b	2,27±0,08b	0,01
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,96 ± 0,06	2,92 ± 0,09	2,96±0,03	0,56

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 22 - Resultados numéricos das análises estatísticas do teste de fertilidade dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 9 semanas de idade (CTRL9, TT9 e RES9 respectivamente).

	<b>CTRL9</b>	<b>TT9</b>	<b>RES9</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Potência</b>	0,6 ± 0,34	0,37 ± 0,30	0,66±0,27	0,11
<b>Fertilidade</b>	0,89 ± 0,12	0,78 ± 0,35	0,88±0,16	0,56
<b>Fecundidade</b>	0,90 ± 0,31a,b	0,60 ± 0,51a	1,00±0,00b	0,02
<b>Perda pré-implantação</b>	0,12 ± 0,12	0,08 ± 0,08	0,11±0,16	0,86
<b>Perda pós-implantação</b>	0,06 ± 0,08	0,04 ± 0,09	0,03±0,07	0,80
<b>Fetos por ninhada</b>	9,62 ± 3,81	7,77 ± 5,96	10,95±2,71	0,29
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,51 ± 0,18	2,27 ± 0,07	2,36±0,20	0,05
<b>Circunferência torácica dos fetos (cm<sup>2</sup>)</b>	2,84 ± 0,07a,b	2,77 ± 0,03a	2,87±0,08b	0,04

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.



### 3.5.2 Análises dos espermatozóides

Com relação aos parâmetros espermáticos avaliados, o resveratrol foi pouco eficaz em prevenir as alterações causadas pela TT. Em todas as análises, os parâmetros dos grupos tratados foram estatisticamente semelhantes aos dos animais submetidos à TT que não receberam este anti-oxidante, independente da idade em que foi provocada a TT.

Exceção foi notada em relação à viabilidade dos espermatozóides coletados dos epidídimos dos animais submetidos à TT com 6 semanas de idade. Para este parâmetro, o grupo RES6D apresentou valores estatisticamente semelhantes ao grupo CTRL6D, embora sem diferença em relação ao grupo TT6D.

Como não foram observados espermatozóides na solução espermática colhida do epidídimo dos animais do grupo TT9D, não foram realizadas as comparações referentes à motilidade e viabilidade entre as amostras CTRL9D, TT9D e RES9D.

Os dados numéricos estão expressos nas tabelas 23, 24 e 25.

Tabela 23 - Resultados numéricos dos parâmetros dos espermatozóides dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 4 semanas de idade (CTRL4, TT4 e RES4 respectivamente).

	CTRL4	TT4	RES4	Valor de p
<b>Concentração (eptz/mL)</b>	4,6x10 <sup>6</sup> ±2,1x10 <sup>6</sup> a	0,1x10 <sup>6</sup> ±2,1 x10 <sup>5</sup> b	0,6x10 <sup>6</sup> ±1,2 x10 <sup>6</sup> b	<0,001
<b>Motilidade (%)</b>	51,1 ± 16,21a	10,6 ± 18,0b	12,0 ± 18,5b	<0,001
<b>Viabilidade (%)</b>	18,7 ± 5,01a	3,20 ± 6,74b	1,35 ± 2,94b	<0,001

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 24 - Resultados numéricos dos parâmetros dos espermatozóides dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 6 semanas de idade (CTRL6, TT6 e RES6 respectivamente).

	<b>CTRL6</b>	<b>TT6</b>	<b>RES6</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Concentração (eptz/mL)</b>	4,0x10 <sup>6</sup> ±2,1x10 <sup>6</sup> a	1,1x10 <sup>6</sup> ±1,7 x10 <sup>6</sup> b	0,4x10 <sup>6</sup> ±1,0 x10 <sup>6</sup> b	0,004
<b>Motilidade (%)</b>	49,5 ± 15,5a	18,0 ± 28,3b	12,3 ± 23,3b	0,003
<b>Viabilidade (%)</b>	22,7 ± 11,3a	7,16 ± 10,0b	8,75 ± 16,2a,b	0,023

Dados expressos como média ± desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 25 - Resultados numéricos dos parâmetros dos espermatozóides dos animais submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 9 semanas de idade (CTRL9, TT9 e RES9 respectivamente).

	<b>CTRL9</b>	<b>TT9</b>	<b>RES9</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Concentração (eptz/mL)</b>	6,2x10 <sup>6</sup> ±5,6x10 <sup>6</sup> a	0,00±0,00	0,8x10 <sup>6</sup> ±2,3 x10 <sup>6</sup> b	0,001
<b>Motilidade (%)</b>	41,7 ± 20,1a	*	7,1 ± 15,2b	<0,001
<b>Viabilidade (%)</b>	16,5 ± 4,34a	*	5,35 ± 12,4b	0,015

Dados expressos como média ± desvio padrão. \* - O grupo TT9D não apresentou espermatozóides, por isso não foi possível avaliar a motilidade e viabilidade.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

### 3.5.3 Análises biométricas

As avaliações do peso e volume testiculares mostraram que o resveratrol foi capaz de prevenir uma diminuição destes parâmetros nos animais submetidos à TT com 4 semanas de idade. No entanto, nos grupos operados com 6 e 9 semanas de idade, o anti-oxidante não teve efeito sobre o peso e volume testicular (Figuras 37 e 38). Os dados numéricos estão expressos nas tabelas 26, 27 e 28.

Tabela 26 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos ratos submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 4 semanas de idade (CTRL4, TT4 e RES4 respectivamente).

	<b>CTRL4D</b>	<b>TT4D</b>	<b>RES4D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	1,47 ± 0,13a	0,54 ± 0,55b	1,20 ± 0,52a	0,0003
<b>Volume (mL)</b>	1,42 ± 0,13a	0,51 ± 0,54b	1,22 ± 0,50a	0,0002

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 27 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos ratos submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 6 semanas de idade (CTRL6, TT6 e RES6 respectivamente).

	<b>CTRL6D</b>	<b>TT6D</b>	<b>RES6D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	1,49 ± 0,13a	0,67 ± 0,29b	0,84 ± 0,37b	<0,0001
<b>Volume (mL)</b>	1,54 ± 0,14a	0,66 ± 0,33b	0,79 ± 0,39b	<0,0001

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

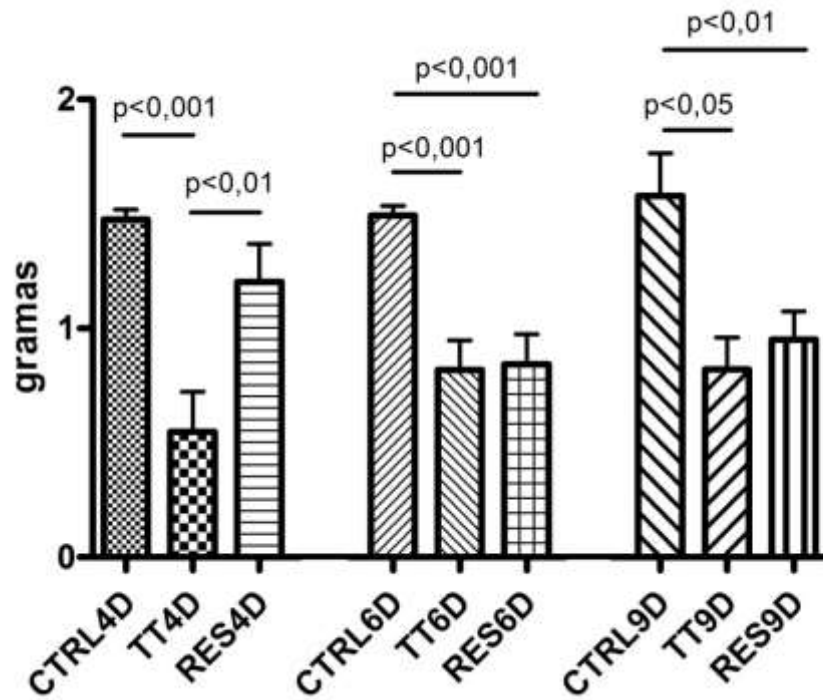
Tabela 28 - Resultados numéricos das análises estatísticas do peso e volume dos testículos dos ratos submetidos à cirurgia simulada, torção testicular, torção testicular e tratados com resveratrol com 9 semanas de idade (CTRL9, TT9 e RES9 respectivamente).

	<b>CTRL9D</b>	<b>TT9D</b>	<b>RES9D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Peso (g)</b>	1,57 ± 0,56a	0,74 ± 0,40b	0,95 ± 0,38b	0,0037
<b>Volume (mL)</b>	1,53 ± 0,51a	0,74 ± 0,40b	0,93 ± 0,36b	0,0014

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 37 - Peso dos testículos direitos

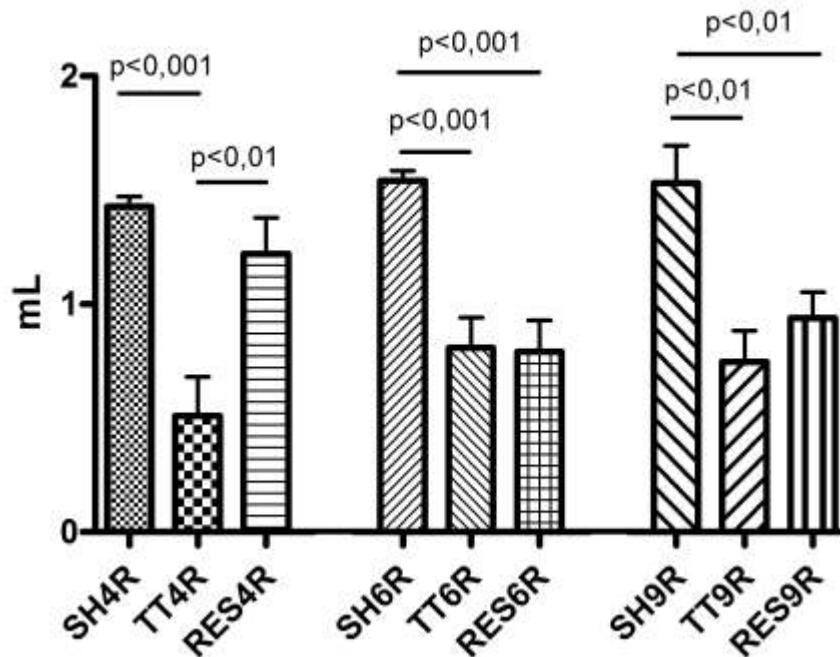


Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 38 - Volume dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

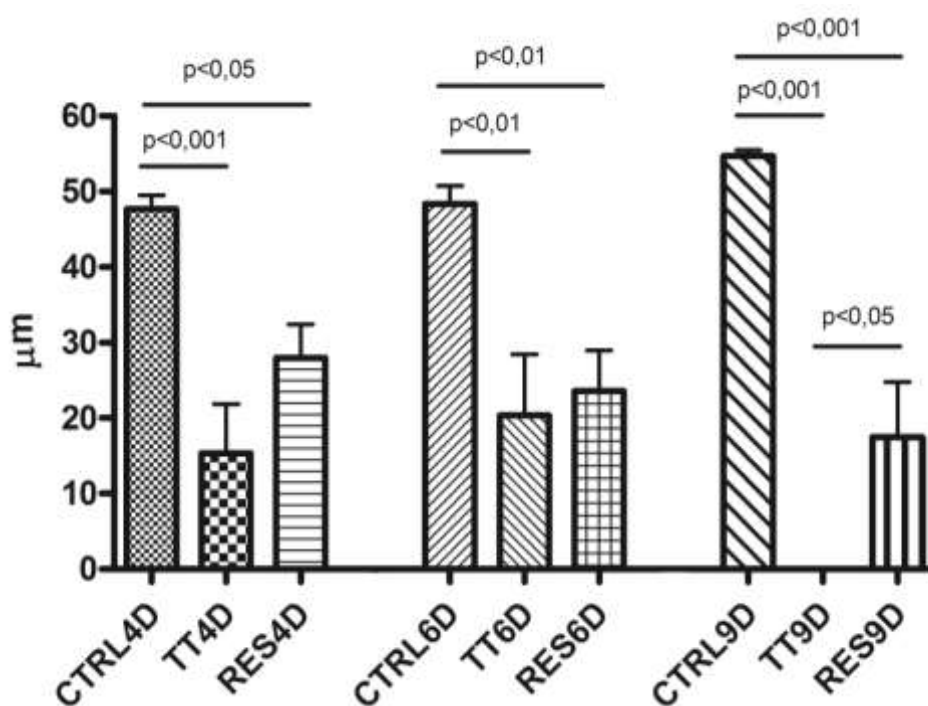
Fonte: RIBEIRO, 2013.

#### 3.5.4 Análises histológicas

O tratamento com resveratrol foi eficaz em prevenir as alterações provocadas pela TT somente em alguns parâmetros.

O dano na altura do epitélio seminífero nos animais submetido à TT com 9 semanas de idade, foi parcialmente prevenido pelo uso do resveratrol (Figuras 39 e 40). O epitélio no grupo RES9D apresentou-se significativamente maior que no grupo TT9D. Contudo o grupo controle ainda apresentou epitélio de maior altura que o grupo RES9D. Nos grupos operados com 4 e 6 semanas, o resveratrol não foi eficaz em prevenir a diminuição altura do epitélio germinativo.

Figura 39 - Altura do epitélio seminífero dos testículos direitos

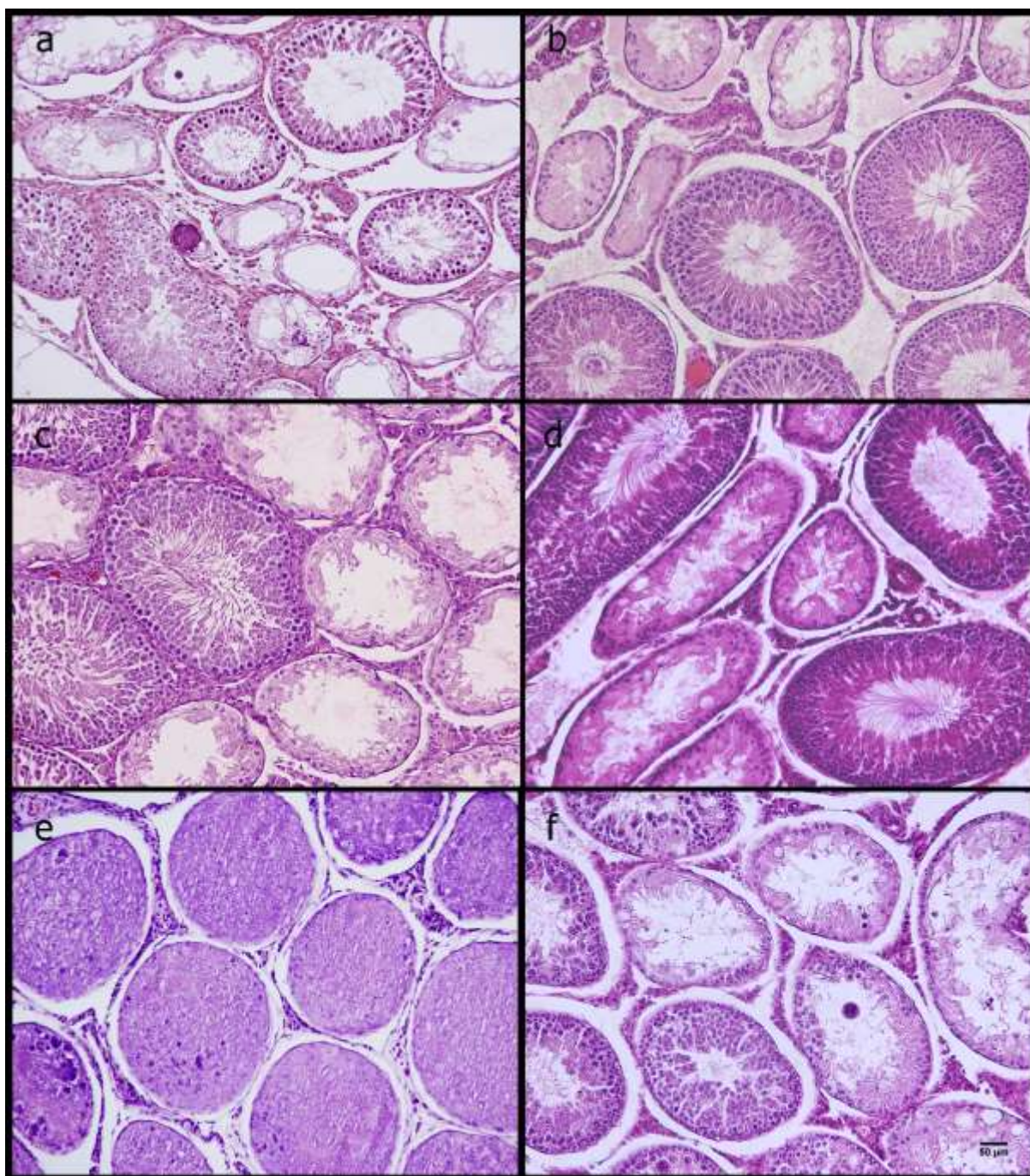


Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 40 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: a, b, c - testículos direitos de animais submetidos à TT dos grupos TT4D, TT6D e TT9D, respectivamente. b, e, f - testículos direitos de animais submetidos à TT e tratados com resveratrol RES4D, RES6D e RES9D, respectivamente.

Nota: HE 200x.

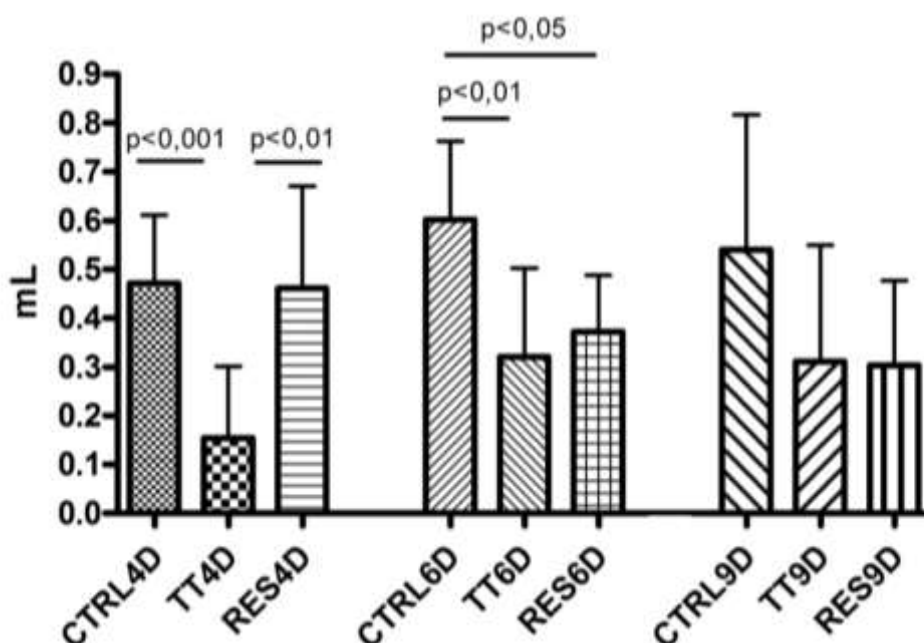
Fonte: RIBEIRO, 2013.

As alterações provocadas pela TT no diâmetro dos túbulos seminíferos, densidade volumétrica e volume absoluto do epitélio seminífero não foram prevenidas pelo tratamento com resveratrol.

Com relação à densidade volumétrica e volume absoluto da túnica própria, não houve diferença ou o resveratrol não protegeu as lesões provocadas pela TT, entre todos os grupos, independente da idade em que foram submetidos à cirurgia.

Nos animais submetidos à TT com 4 semanas de idade, o resveratrol foi eficaz em prevenir as alterações do volume absoluto do lúmen tubular (Figura 41). Os animais do grupo RES4D tiveram valores estatisticamente semelhantes aos do grupo CTRL4D e superiores aos do grupo TT4D. Com relação ao volume absoluto do lúmen tubular dos animais operados com 6 e 9 semanas de idade, não houve diferença ou o resveratrol não protegeu as lesões provocadas pela TT. O mesmo aconteceu com a densidade volumétrica do lúmen tubular entre todos os grupos, independente da idade em que foram submetidos à cirurgia.

Figura 41 - Volume absoluto do lúmen tubular dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

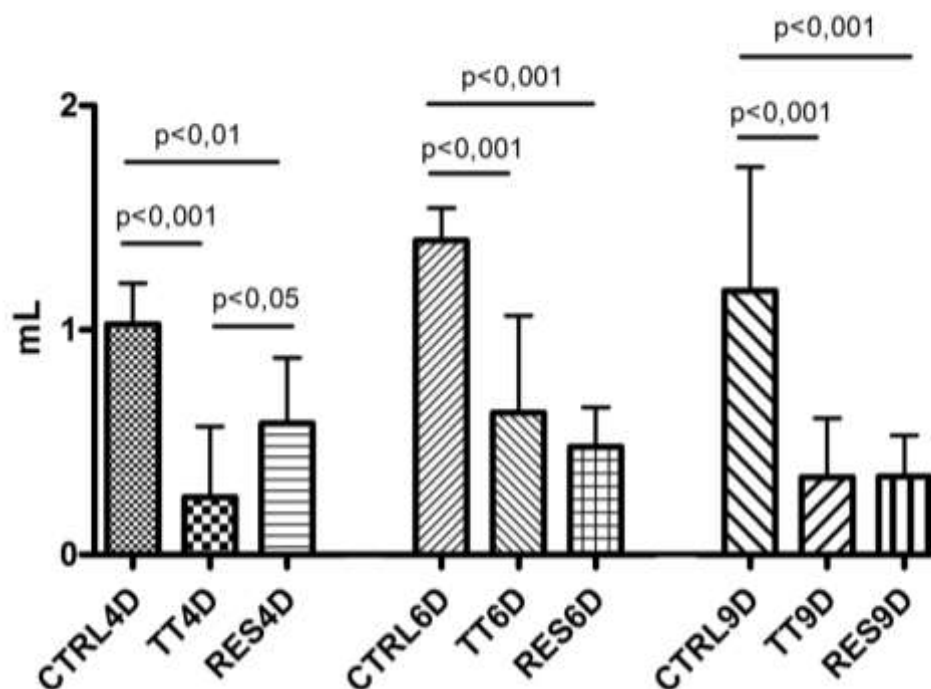
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.



Com relação ao compartimento tubular, de maneira contraditória, o resveratrol piorou as alterações da sua densidade volumétrica em animais operados com 6 semanas, mas protegeu parcialmente as alterações no volume absoluto deste compartimento nos animais operados com 4 semanas (Figura 42).

Figura 42 - Volume absoluto do compartimento tubular dos testículos direitos



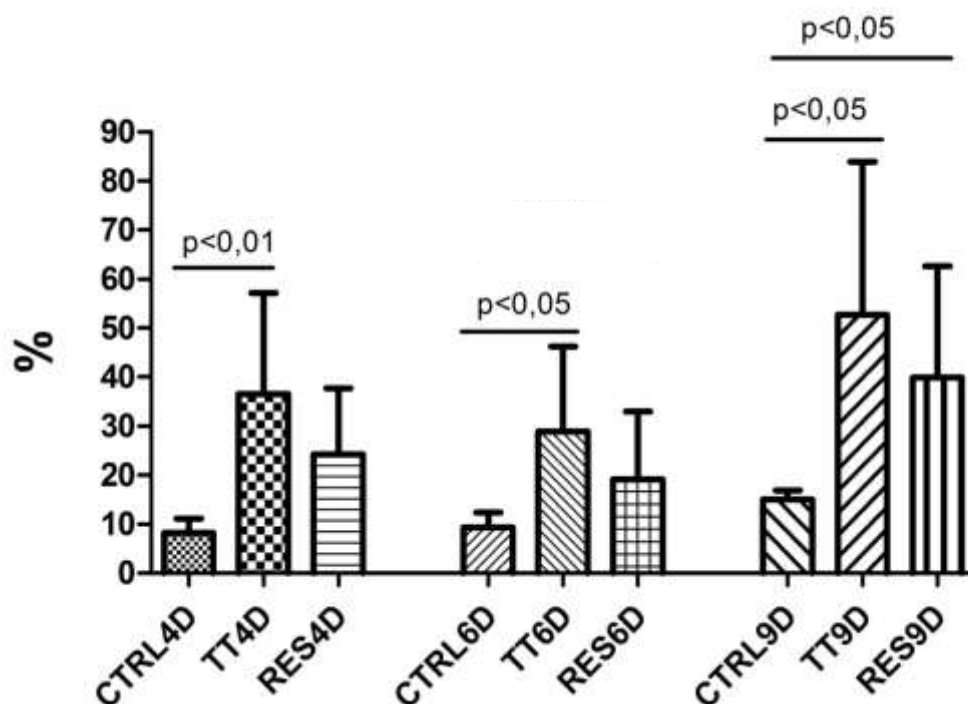
Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Já a densidade volumétrica do compartimento intertubular foi protegido parcialmente pelo tratamento com o resveratrol nos animais operados com 4 e 6 semanas de vida. O mesmo não foi observado nos animais operados com 9 semanas de idade (Figura 43).

Figura 43 - Densidade do compartimento intertubular dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

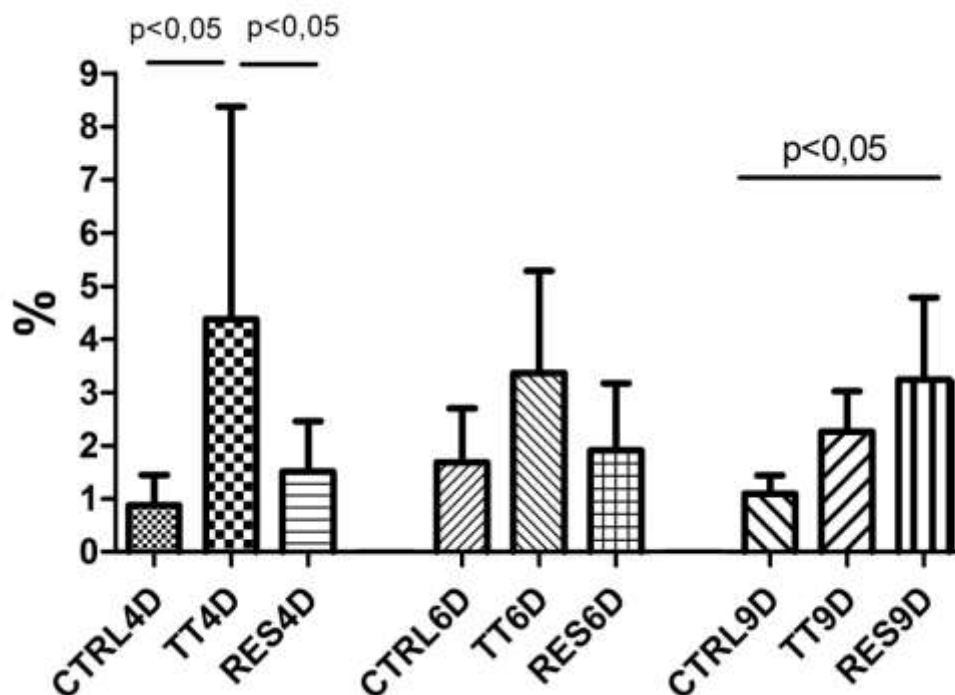
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Com relação ao volume absoluto do compartimento intertubular, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos animais controles e submetidos à TT em qualquer idade.

Sobre a densidade volumétrica dos vasos sanguíneos testiculares, o resveratrol foi eficaz em proteger as alterações nos animais operados com 4 semanas (Figura 44). Nos animais operados em outras idades, e com relação ao volume absoluto dos vasos não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos animais controles e submetidos à TT.

Figura 44 - Densidade volumétrica dos vasos dos testículos direitos



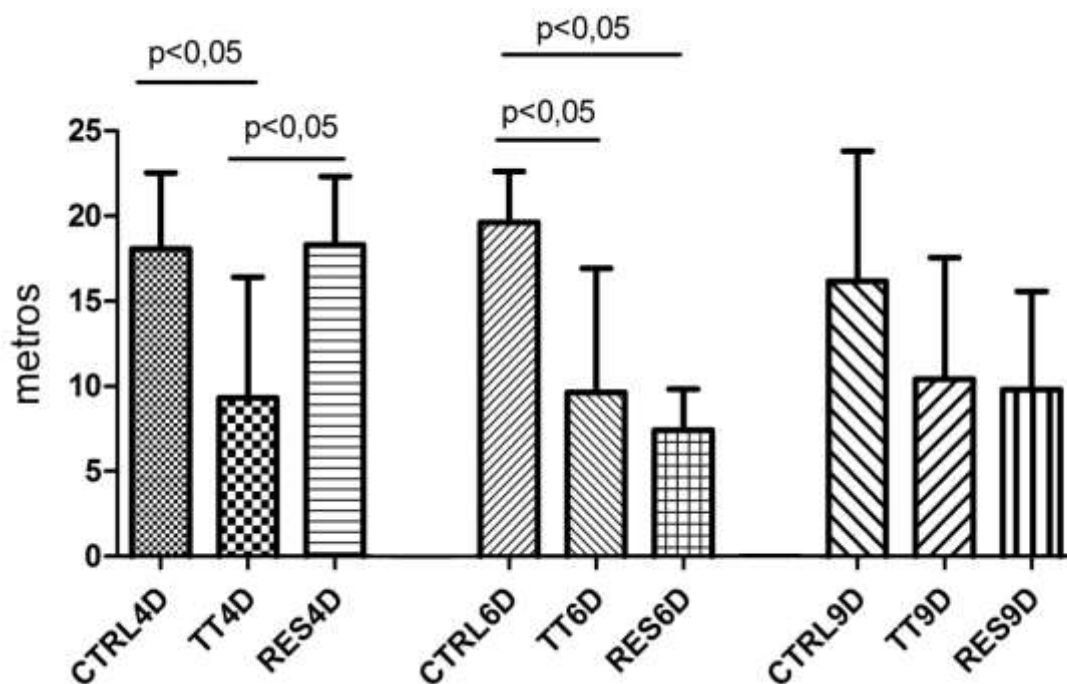
Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Mais uma vez, foi verificado que os animais operados com 4 semanas de idade se beneficiaram do tratamento com o anti-oxidante quando analisados os resultados do comprimento tubular. Nestes animais, o resveratrol foi eficaz em prevenir as alterações deste parâmetro, ao contrário do observado nos ratos operados em outras idades (Figura 45).

Figura 45 - Comprimento dos túbulos seminíferos dos testículos direitos



Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

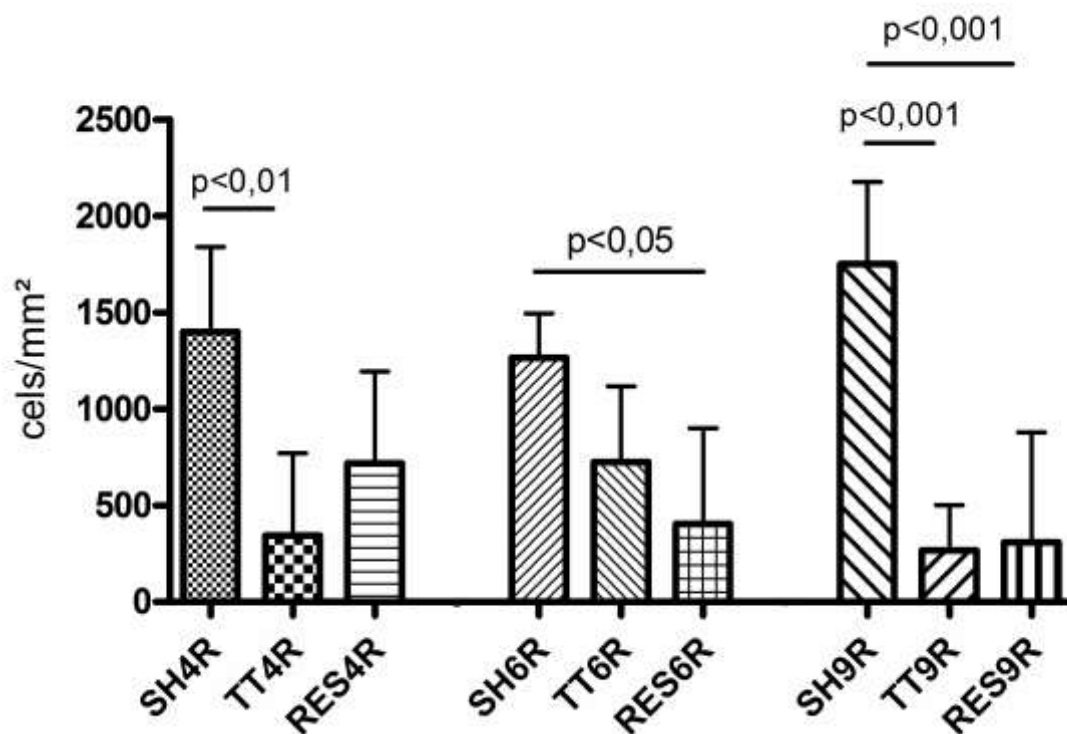
Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Quando se analisa o escore de Johnsen, o tratamento com resveratrol, não pode prevenir as lesões provocadas pela TT, independente da idade em que estas foram provocadas.

Finalmente, com relação à proliferação celular, o resveratrol foi parcialmente eficaz em proteger as alterações no espaço tubular em animais operados com 4 semanas, e proteger totalmente as alterações da proliferação celular no espaço intersticial naqueles operados com 9 semanas. Entre os demais animais não houve diferença ou o resveratrol não protegeu as lesões provocadas pela TT (Figuras 46, 47 e 48).

Figura 46 - Proliferação celular do espaço tubular dos testículos direitos

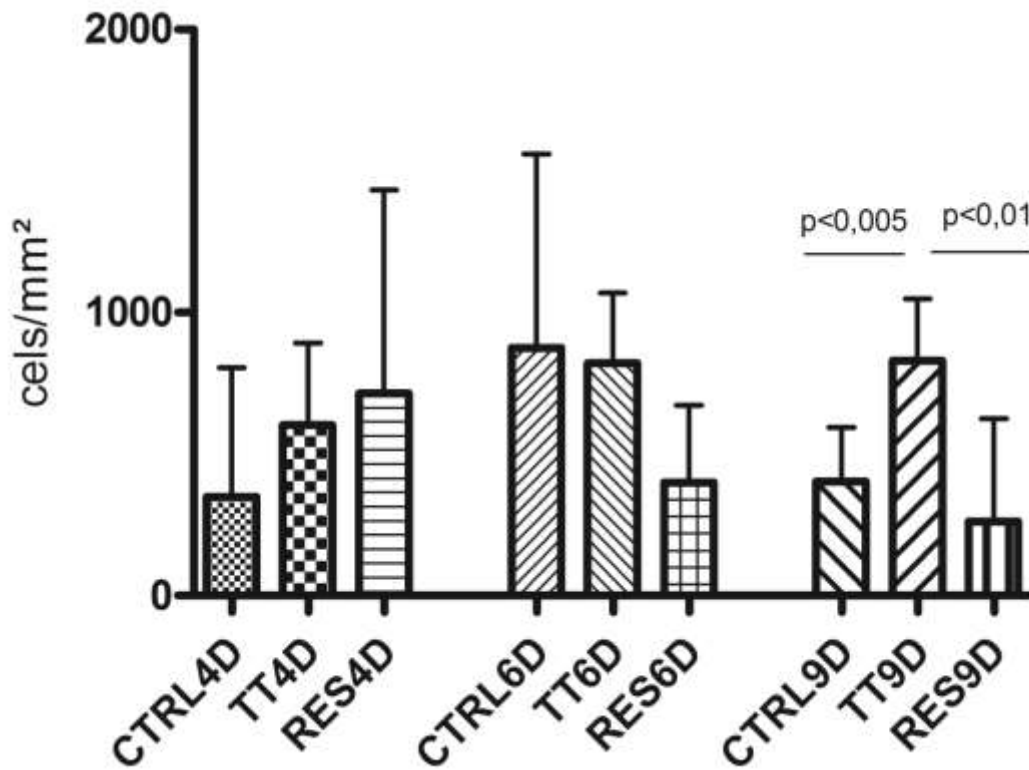


Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 47 - Proliferação celular do espaço intersticial dos testículos direitos

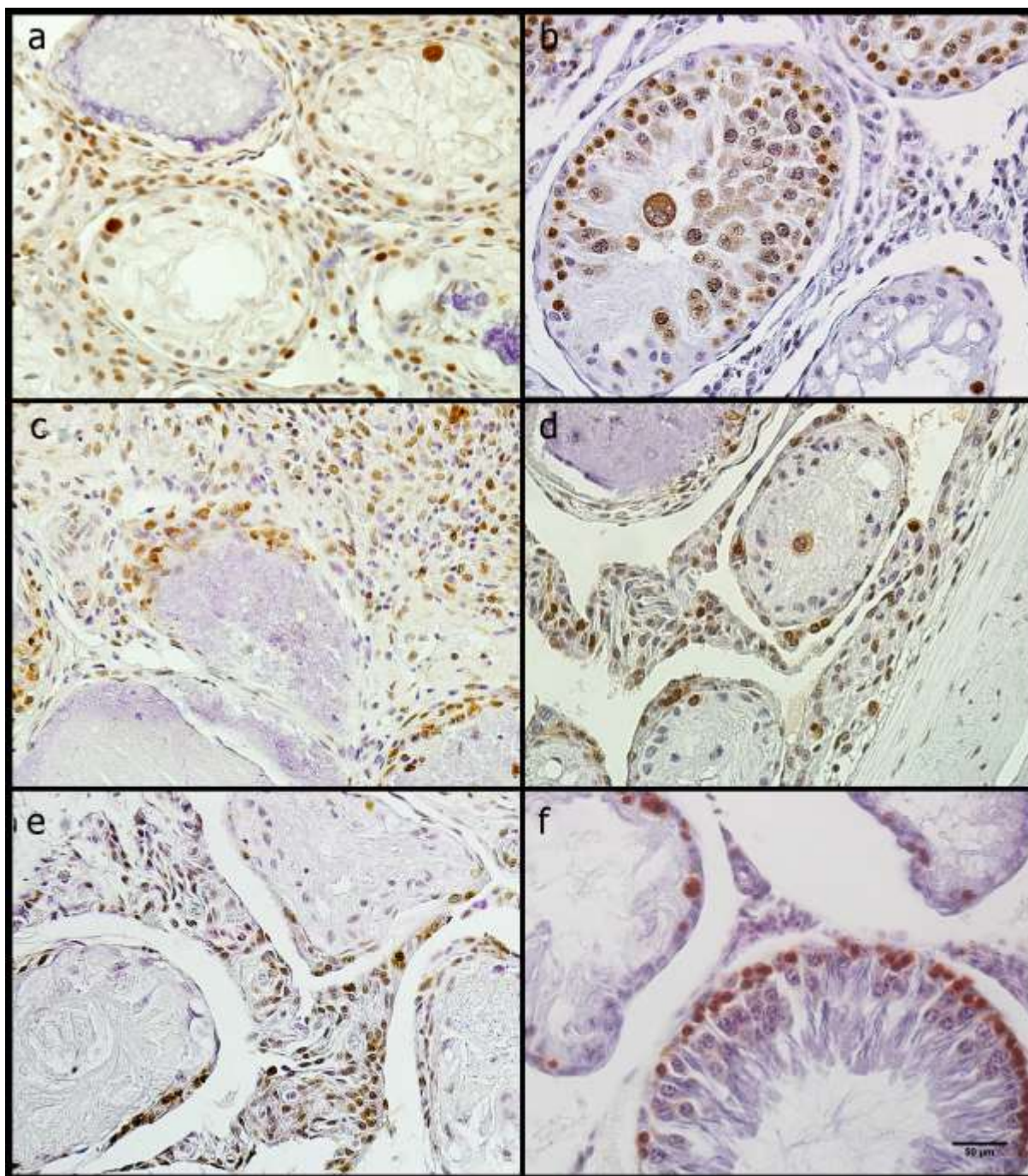


Legenda: ratos submetidos à cirurgia simulada (CTRL), torção testicular (TT) ou à torção testicular tratados com resveratrol (RES) nas diferentes idades (4, 6 e 9 semanas)

Nota: Dados expressos como média e desvio padrão.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Figura 48 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: em marrom são as células imunocoradas pela técnica anti-PCNA mostrando a proliferação celular no espaço tubular e no espaço intersticial. a, c, e - testículos direitos de animais submetidos à TT dos grupos TT4D, TT6D e TT9D, respectivamente. b, d, f - testículos direitos de animais submetidos à TT e tratados com resveratrol RES4D, RES6D e RES9D.

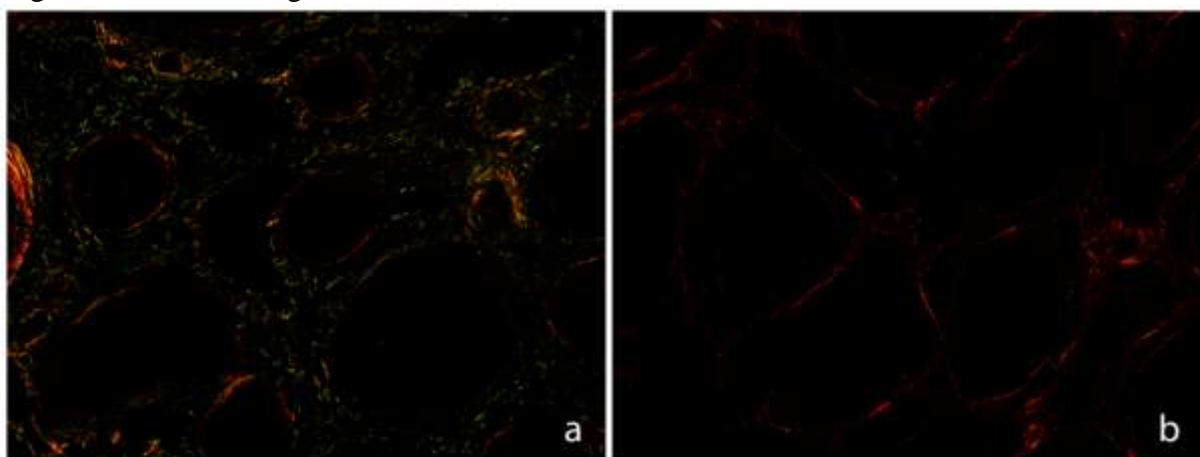
Nota: 400x.

Fonte: RIBEIRO, 2013.

Todos os dados numéricos das análises histológicas estão nas tabelas 29, 30 e 31.

Foi ainda verificada uma alteração no padrão de distribuição das fibras colágenas nos animais operados com 9 semanas e tratados com resveratrol. Ao contrário do observado nos grupos 4 e 6 semanas de idade, onde o tratamento não alterou o predomínio de fibras de birrefringência esverdeada, nos testículos do grupo RES9D, o predomínio foi de fibras colágenas avermelhadas, quando examinadas sob microscopia de polarização (Figura 49).

Figura 49 - Fotomicrografias de corte transversal dos túbulos seminíferos de testículo de rato



Legenda: a) Testículo de um animal de 4 semanas de idade torcido e tratado com resveratrol com predomínio de fibras de birrefringência esverdeada. b) Testículo de um animal de 9 semanas de idade torcido e tratado com resveratrol com predomínio de fibras de birrefringência avermelhada.

Nota: Picrosirius red 200x.

Fonte: RIBEIRO, 2013.



Tabela 29 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos testículos direitos dos animais com 4 semanas de idade submetidos à cirurgia simulada, torção testicular e torção testicular tratados com resveratrol (CTRL4D, TT4D e RES4D, respectivamente).

	<b>CTRL4D</b>	<b>TT4D</b>	<b>RES4D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)</b>	270±17,9a	166±61,0b	182±59,6b	<0,0001
<b>Altura do epitélio seminífero (µm)</b>	47,6±5,81a	15,3±20,7b	27,9±12,4b	0,0002
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	32,3±5,30a	8,75±11,9b	8,97±9,84b	0,0005
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,45±0,06a	0,07±0,13b	0,09±0,10b	<0,0001
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	6,67±2,06a	5,83±1,83a	3,12±0,75b	0,0003
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,09±0,03a	0,03±0,03b	0,03±0,01b	0,0001
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	32,6±7,13	33,2±6,37	35,8±13,3	0,1284
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,47±0,13a	0,15±0,14b	0,46±0,21a	0,0003
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	71,6±7,90a	47,8±17,0b	52,9±9,71b	0,0014
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,02±0,18a	0,25±0,31b	0,58±0,29a,b	<0,0001
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	8,23±2,85a	36,5±20,5b	24,2±13,4a,b	0,0056
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,11±0,03	0,15±0,25	0,29±0,11	0,0967
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	0,87±0,57a	4,37±3,99b	1,51±0,94a	<0,0001
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01±0,00	0,01±0,03	0,01±0,00	0,8220
<b>Comprimento tubular (m)</b>	18,0±4,45	9,29±7,11	18,3±4,01	0,1965
<b>Escore de Johnsen</b>	8,55±0,42a	3,09±2,82b	3,62±2,50b	<0,0001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,3x10 <sup>3</sup> ±439a	343±426b	716±476a,b	0,0033
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	349±454	601±291	714±718	0,4768

Dados expressos como média ± desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 30 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos testículos direitos dos animais com 6 semanas de idade submetidos à cirurgia simulada, torção testicular e torção testicular tratados com resveratrol (CTRL6D, TT6D e RES6D, respectivamente).

	<b>CTRL6D</b>	<b>TT6D</b>	<b>RES6D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)</b>	300±21,8a	198±89,2b	202±15,0b	0,0009
<b>Altura do epitélio seminífero (µm)</b>	48,3±7,56a	15,6±19,8b	23,5±15,3b	0,0002
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	45,3±4,95a	25,9±17,5b	8,56±13,5b	0,0003
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,69±0,06a	0,26±0,24b	0,08±0,11b	<0,0001
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	6,66±1,95a	5,76±0,93a	3,42±0,58b	<0,0001
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,10±0,02a	0,04±0,01b	0,02±0,01b	<0,0001
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	38,6±7,76	38,8±11,4	45,9±8,07	0,1754
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,60±0,16a	0,32±0,18b	0,37±0,11b	0,0014
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	90,6±2,98a	73,4±17,9a	57,9±12,3b	<0,0001
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,39±0,14a	0,63±0,43b	0,47±0,17b	<0,0001
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	9,34±2,98a	28,8±17,2b	19,1±13,8a,b	0,0093
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,14±0,04	0,17±0,05	0,18±0,21	0,7329
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	1,68±1,02	3,36±1,91	1,90±1,26	0,0897
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,02±0,01	0,02±0,00	0,01±0,01	0,1950
<b>Comprimento tubular (m)</b>	19,6±3,01a	9,63±7,28b	7,41±2,41b	0,0038
<b>Escore de Johnsen</b>	7,64±0,85a	3,56±2,37b	2,41±2,42b	<0,0001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,2x10 <sup>3</sup> ±230	723±394	403±498	0,0139
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	874±686	821±247	398±273	0,2162

Dados expressos como média ± desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Tabela 31 - Resultados numéricos das análises estatísticas das avaliações histológicas dos testículos direitos dos animais com 9 semanas de idade submetidos à cirurgia simulada, torção testicular e torção testicular tratados com resveratrol (CTRL9D, TT9D e RES9D, respectivamente).

	<b>CTRL9D</b>	<b>TT9D</b>	<b>RES9D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)</b>	312±12,1a	217±23,3b	232±23,0b	<0,0001
<b>Altura do epitélio seminífero (µm)</b>	54,7±2,63a	0,00±0,00b	17,4±20,5a,b	<0,0001
<b>Vv [epitélio seminífero] (%)</b>	39,4±5,86a	0,84±1,78b	3,68±10,5b	0,0016
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,55±0,26a	0,00±0,01b	0,01±0,04b	<0,0001
<b>Vv [túnica própria] (%)</b>	5,19±1,08	3,72±2,53	3,30±1,53	0,1810
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,07±0,03a	0,02±0,02b	0,02±0,01b	0,0029
<b>Vv [lúmen tubular] (%)</b>	40,4±7,32	42,7±28,5	37,2±15,2	0,3140
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,53±0,27	0,31±0,23	0,30±0,17	0,1285
<b>Vv [compartimento tubular] (%)</b>	85,6±1,76a	47,3±31,2b	44,2±20,8b	<0,0001
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,17±0,55a	0,34±0,26b	0,34±0,26b	0,0001
<b>Vv [compartimento intertubular] (%)</b>	14,9±1,93a	52,6±31,2b	39,8±22,7b	0,0047
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	0,20±0,10	0,40±0,44	0,35±0,19	0,4917
<b>Vv [vasos sanguíneos] (%)</b>	1,10±0,34a	2,26±0,75a,b	3,24±1,53b	0,0039
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,01	0,0199
<b>Comprimento tubular (m)</b>	16,1±7,63	10,4±7,15	9,80±5,77	0,2010
<b>Escore de Johnsen</b>	8,24±0,65a	1,93±2,00b	2,99±2,99b	<0,0001
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	1,7x10 <sup>3</sup> ±424a	267±233b	308±570b	<0,0001
<b>Proliferação celular no espaço intersticial (cels/mm<sup>2</sup>)</b>	401±191a	828±219b	260±364a	0,0063

Dados expressos como média ± desvio padrão.  
Fonte: RIBEIRO, 2013.

Quadro 2 - Resumo dos resultados das avaliações histológicas nas três idades submetidas à TT e tratadas com resveratrol

	<b>RES4</b>	<b>RES6</b>	<b>RES9</b>
<b>Diâmetro dos túbulos seminíferos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	NP	NP	NP
<b>Altura do epitélio seminífero (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	NP	NP	PP
<b>Vv epitélio seminífero (%)</b>	NP	NP	NP
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	NP	NP	NP
<b>Vv túnica própria (%)</b>	P	P	–
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	NP	NP	NP
<b>Vv lúmen tubular (%)</b>	–	–	–
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	PT	NP	–
<b>Vv compartimento tubular (%)</b>	NP	P	NP
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	PP	NP	NP
<b>Vv compartimento intertubular (%)</b>	PP	PP	NP
<b>Volume absoluto compartimento intertubular (mL)</b>	–	–	–
<b>Vv vasos (%)</b>	PT	–	PP
<b>Volume absoluto vasos (mL)</b>	–	–	–
<b>Comprimento tubular (m)</b>	PT	NP	–
<b>Escore de Johnsen</b>	NP	NP	NP
<b>Proliferação celular no espaço tubular (cels/<math>\text{mm}^2</math>)</b>	PP	–	NP
<b>Proliferação espaço intersticial (cels/<math>\text{mm}^2</math>)</b>	–	–	PT

Legenda: as siglas referem-se em qual parâmetro e em qual idade o tratamento foi eficaz ou não.

Nota: NP- Não protegeu

PT- Protegeu totalmente

PP- Protegeu parcialmente

- Grupos CTRL e TT não tiveram diferença estatística entre si. Portanto, o tratamento com resveratrol não incidiu nenhuma melhora, sendo semelhante estatisticamente aos CTRL e TT.

P - Piorou

Fonte: RIBEIRO, 2013.

#### 4 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou em conjunto, pela primeira vez, o efeito da TT no testículo torcido e em seu contralateral, comparando animais em diferentes faixas etárias (pré-púberes, púberes e adultos jovens), com base em parâmetros morfológicos, espermáticos e de fertilidade, bem como o efeito do tratamento com resveratrol. Foi utilizada rotação de 720° do cordão espermático por 4 horas, baseado no trabalho de Becker e Turner (1995) (25), o qual verificou que este grau e duração da torção foram suficientes para promover danos significativos nos testículos de ratos. Corroborando com os resultados destes autores, verificamos que a torção testicular de 720° mantida por 4 horas em ratos de diferentes idades apresentou um dano significativo sobre os parâmetros morfológicos e espermáticos nos testículos torcidos, ao serem analisados na idade adulta. No entanto, praticamente não foi encontrada nenhuma anormalidade nos testículos contralaterais, exceto por apresentar queda significativa da proliferação celular do tecido intersticial nos grupos que sofreram a torção na puberdade e na idade adulta jovem quando comparados aos seus controles. Além disso, o tratamento com resveratrol promoveu melhora em alguns dos parâmetros avaliados.

Vários estudos em modelos de IR em TT animal estudaram o efeito do estresse oxidativo e alterações morfológicas testiculares (22, 31, 41, 42, 44, 46, 71, 72). No entanto, poucos são o que avaliaram os parâmetros qualitativos e quantitativos dos espermatozoides, bem como o reflexo na fertilidade, que é de grande interesse do indivíduo afetado. Ratos que foram induzidos à TT em idade púbera a 720° por 2h, ao serem avaliados na idade adulta tiveram diminuição da concentração de espermatozoides (73). Um interessante trabalho utilizando ratos pré-púberes e adultos avaliou a TT a 360° e a 720° com diferentes períodos de duração, concluindo que a TT por 4 horas à 720 implicou em maiores danos, com redução significativa da concentração de espermatozoides, tanto nos animais pré-púberes quanto nos animais adultos 30 dias após a TT. Ainda, revelou que após 60 dias de TT os testículos torcidos apresentavam-se aspermatogênicos. No entanto, ao avaliarem os testículos contralaterais, observaram que estes não foram afetados (25). Neste presente trabalho, os animais foram avaliados com 14 semanas de idade (adultos). Dessa forma, o tempo entre a realização da TT e a avaliação dos efeitos da TT foi diferente para cada idade. Os animais pré-púberes, púberes e adultos jovens foram avaliados com 10, 8 e 5 semanas após sofrerem TT, respectivamente. Entretanto, o que se pretendeu estudar foi o efeito da ocorrência da TT em diferentes faixas etárias e sua repercussão na idade adulta. Os resultados mostraram que

houve uma redução significativa da concentração espermática em todas as idades. No entanto, os animais que sofreram a TT na idade adulta jovem não apresentaram nenhum espermatozóide (aspermátogênicos) proveniente do testículo torcido. Ainda, ficou demonstrado que os testículos contralaterais não foram afetados. O tratamento com resveratrol não promoveu melhora desse parâmetro, mas chama a atenção, que embora não tenha apresentado diferença estatística, os animais que sofreram a TT na idade adulta jovem e foram tratados com resveratrol apresentaram espermatozóides viáveis no testículo torcido.

Estudo clínico em 24 homens acima de 16 anos, em que parte sofreu orquiectomia e parte orquípexia do testículo afetado, apresentaram valores normais de concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides. No entanto, os que foram submetidos à orquiectomia apresentaram melhor motilidade dos espermatozóides (74). Estes autores ainda avaliaram a presença de anticorpos anti-espermatozóides, mas não houve diferença entre estes grupos operados, tampouco para o grupo controle. Dessa forma, não houve nenhuma correlação entre os níveis de anticorpos anti-espermatozóides para os achados de motilidade.

Em nosso trabalho, os espermatozóides não foram avaliados quanto à sua morfologia. No entanto, a viabilidade dos mesmos foi avaliada e apresentou diminuição em todas as idades, exceto no grupo que sofreu a torção na idade adulta jovem por apresentar-se aspermátogênico. O tratamento com resveratrol não promoveu melhora significativa da viabilidade dos espermatozóides em nenhuma das diferentes idades tratadas, porém o grupo que sofreu a torção na idade adulta jovem apresentou espermatozóides viáveis após o tratamento com o resveratrol.

Em TT, a veias inicialmente são comprimidas levando ao infarto hemorrágico. O infarto vai progredindo com o tempo, e assim o fluxo arterial é perdido, induzindo finalmente à isquemia testicular (75). O quadro de isquemia gera hipóxia tecidual que provoca um distúrbio do equilíbrio celular levando ao estresse oxidativo. Espermatozóides submetidos ao estresse oxidativo sofrem efeitos deletérios tais como peroxidação lipídica da membrana celular, injúria da peça intermediária e das estruturas do axonema, bem como malformação da capacitação e reações acrossomais, e por fim perda da concentração e da motilidade (24, 76). Embora não tenhamos estudado a bioquímica do estresse oxidativo, nem a morfologia dos espermatozóides, sugerimos que tal processo tenha levado às injúrias dos espermatozóides de forma similar. Portanto, pode ser uma das causas que levaram à diminuição de todos os parâmetros espermáticos estudados em todas as idades.

Estudos prévios que avaliaram o grau de injúria da espermatogênese após TT com base nos parâmetros do diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero e escore

de Johnsen mostraram que houve redução em todos estes parâmetros (9, 22, 23, 31, 40, 44, 71, 72). Nossos achados estão de acordo com os resultados destes trabalhos e também demonstrou, pela primeira vez, que o grupo que sofreu a TT com 9 semanas foi o mais afetado, não apresentando mais epitélio nos túbulos seminíferos. Já é bem documentado o uso de antioxidantes em trabalhos experimentais de TT que relatam o sucesso dos tratamentos na recuperação dos danos teciduais. Em um desses estudos, ratos que tiveram seus testículos torcidos à 720 ° por 2 horas, o diâmetro do túbulo seminífero, peso testicular e escore de Johnsen decresceram após TT, mas foram recuperados após tratamento com taurina e carnosina (71). Estes mesmos autores também avaliaram o estresse oxidativo que apresentou níveis elevados nos testículos torcidos, mas houve redução após o tratamento. Esses achados sustentam a correlação direta do estresse oxidativo aos danos morfológicos nos testículos torcidos. Estudos mais recentes que avaliaram os efeitos a longo prazo da TT apresentaram diminuição dos parâmetros morfológicos citados anteriormente, com posterior recuperação após tratamentos com antioxidantes como melatonina (40), rutin (46), taurina e carnosina (71). Diferente desses achados, no presente estudo o tratamento com resveratrol não promoveu melhora significativa desses parâmetros, mesmo no grupo torcido com 4 semanas de idade, que só foi avaliado 10 semanas após a torção.

Primeiramente, a injúria do epitélio seminífero foi avaliada com base na análise da altura do epitélio, que diminuiu nos testículos torcidos dos grupos que sofreram a cirurgia nas três diferentes faixas etárias (pré-púberes, púberes e adulto jovem). Verificamos também a correlação da altura do epitélio com os achados do escore de Johnsen, bem como da densidade do epitélio seminífero, pois todos estes parâmetros apresentaram diminuição nos testículos torcidos. Estas análises pareceram ser mais representativas da lesão testicular do que a avaliação do diâmetro do túbulo. Contudo, a maioria dos trabalhos avaliam o diâmetro correlacionando com o escore de Johnsen (23, 41, 44, 71, 73, 77). Jeong et al. (2010) (78) avaliaram a altura do epitélio seminífero e relataram diminuição após TT e recuperação após o tratamento com ciclosporina. Nossos achados quanto ao resultado da altura do epitélio seminífero após TT estão de acordo com os achados de Jeong et al. (2010) (78). No entanto, não houve recuperação significativa do epitélio seminífero após tratamento com resveratrol em nenhum dos grupos, independente da idade em que os animais foram submetidos à TT.

A densidade volumétrica das diferentes estruturas do compartimento tubular e intertubular fornecem importantes dados que ajudam a reforçar os outros achados morfométricos. Verificamos que a densidade volumétrica do epitélio seminífero e do compartimento tubular como um todo tiveram redução significativa em todas as idades

comparados aos seus controles. Além disso, quando comparamos os grupos que sofreram a TT nas diferentes idades, verificamos que a densidade volumétrica do epitélio seminífero no grupo que foi submetido à TT com 9 semanas de idade, foi significativamente menor em comparação ao grupo que foi submetido à TT com 6 semanas de idade. Não foi encontrado nenhum relato na literatura sobre a densidade volumétrica do compartimento tubular e intertubular em casos de TT. Entretanto, Santana Castro et al. (2010) (79) avaliaram tais parâmetros em testículos de ratos que foram tratados com cis-platinum, uma droga que tem propriedades oxidantes, mostrando uma diminuição da proporção volumétrica de alguns componentes testiculares (epitélio tubular, túnica própria, núcleos das células de Leydig e tecido intersticial), ressaltando que o epitélio seminífero foi o mais afetado. Apesar de não utilizar o modelo de TT, estes resultados estão de acordo com os nossos achados em animais com os testículos torcidos, exceto pela avaliação da túnica própria que só se mostrou reduzida nos animais que sofreram TT com 6 semanas de idade. Isso mostra que os túbulos seminíferos são sensíveis aos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, seja diretamente por uma droga oxidante ou indiretamente pela TT. Como os túbulos seminíferos são os maiores componentes dos testículos de mamíferos (80), a redução dessas estruturas após injúria por TT leva à redução do peso e conseqüentemente do volume testicular, como relatado por (22, 41, 73, 81). Nossos achados sobre o peso e volume testiculares após TT em todas as idades são condizentes com os achados da literatura. Já o comprimento tubular diminuiu nos grupos em que a TT foi induzida nas idades pré-púbere e púbere, e a densidade volumétrica do túbulo seminífero e diâmetro do túbulo seminífero diminuíram em quando a TT foi induzida em todas as idades. O tratamento com resveratrol foi eficaz somente no grupo pré-púbere em relação ao comprimento tubular quando analisado na idade adulta.

A densidade volumétrica do tecido intersticial teve aumento significativo em todas as idades comparadas aos seus controles após TT. No entanto, com base nos dados da proliferação celular do tecido intersticial, somente o grupo que sofreu TT com 9 semanas de idade mostrou aumento significativo, embora o grupo pré-púbere tenha mostrado um aumento não significativo, enquanto o grupo púbere se manteve similar ao grupo controle. Um estudo em TT relatou aumento do recrutamento de neutrófilos para o espaço intersticial e completa fibrose (25). Nossos resultados mostraram que houve um grande depósito de fibras colágenas no espaço intersticial, com predomínio de fibras mais delgadas nos testículos torcidos, independente da idade em que foi realizada a TT. Sugerimos que este fato tenha contribuído para o aumento da densidade volumétrica no espaço intersticial. Contudo, baseando-se também nos achados de proliferação celular, podemos sugerir que uma considerável



proliferação celular no espaço intersticial tenha sido de fibroblastos, e que nos grupos pré-púberes e púberes tenha ocorrido uma diminuição da proliferação celular ao longo do tempo após a TT, enquanto no grupo adulto jovem, devido ao menor espaço de tempo entre a TT e a avaliação do testículo, a proliferação de fibroblastos ainda continuava mais ativa. O tratamento com resveratrol foi benéfico no grupo adulto jovem ao promover de forma significativa a redução da proliferação celular intersticial. Não foram encontrados na literatura outros estudos que tenham realizado a avaliação da proliferação celular no espaço intersticial após TT. Talvez a realização de marcação imunohistoquímica de fibroblastos possa ajudar a elucidar tais achados.

Ao avaliar o volume absoluto de cada uma das estruturas testiculares analisadas na densidade volumétrica, estimado com base no volume do testículo, foi verificado que o compartimento intertubular não apresentou diminuição em nenhuma das idades. Ainda, nos animais submetidos à TT com 6 semanas de idade o volume absoluto dos vasos mostrou-se inalterado, bem como nos animais operados com 9 semanas de idade, sendo que neste grupo o volume absoluto do lúmen tubular também permaneceu inalterado. Estes achados revelaram que embora tenha ocorrido aumento da densidade do compartimento intertubular após TT, este fato não foi retratado em termos de volume absoluto no testículo. Sendo assim, o que ocorreu foi uma desproporção entre as estruturas testiculares, mas o compartimento tubular ainda continuou representando a maior estrutura do testículo em termos de volume absoluto.

Quando avaliamos a proliferação celular do túbulo seminífero, encontramos diminuição significativa em todos os grupos que sofreram TT, independente da idade em que a TT ocorreu. O tratamento com resveratrol não promoveu melhora em nenhuma das idades no que diz respeito às análises da densidade volumétrica do epitélio seminífero, e consequentemente do compartimento tubular. No entanto, quanto à proliferação celular do túbulo seminífero, o grupo operado com 4 semanas de idade e tratado com resveratrol apresentou semelhança estatística ao grupo controle, mas também não se mostrou estatisticamente diferente em relação ao grupo torcido. Sendo assim, isso pode ser considerado uma ação benéfica do resveratrol no grupo que sofreu a TT na idade pré-pubere, mesmo que parcial. Embora neste estudo a apoptose celular não tenha sido avaliada, para indicar quais os tipos celulares mais afetados pela torção, isto seria um resultado interessante para comparar com a proliferação celular. Kanter (2010) (40) avaliou tanto a proliferação e apoptose celular tubular, e mostrou que houve, respectivamente, diminuição e aumento após cinco horas de TT à 720° em ratos. Um trabalho que avaliou o uso do resveratrol em TT em

ratos, mostrou um aumento da apoptose após TT, e uma diminuição significativa após o tratamento com resveratrol (58).

O quadro de hipóxia tecidual, como ocorrido em casos de TT, induz à formação de novos vasos sanguíneos (82). No entanto, apenas o grupo que sofreu a TT com 4 semanas de idade apresentou aumento da densidade volumétrica dos vasos sanguíneos, quando comparado ao controle, embora nos demais grupos tenha ocorrido um aumento não significativo. Como o grupo operado com 4 semanas de idade teve mais tempo de recuperação, acreditamos que este fato seja uma possível explicação para o aumento da densidade dos vasos. Trabalhos futuros podem avaliar a expressão do fator de crescimento endotelial (VGEF) para melhor elucidar tal achado.

Quanto aos efeitos da TT no testículo contralateral, há muita controvérsia sobre o assunto, alguns trabalhos afirmam que a TT pode afetar e outros que não afeta o testículo contralateral. No estudo de Kar et al. (2010) (40), que estudou testículos contralaterais após 4 horas de torção, tanto os que foram retirados e analisados logo após o período de TT, quanto os que foram retirados e analisados após dois meses da realização da TT apresentaram diminuição do score de Johnsen, do diâmetro do túbulo seminífero e aumento de apoptose. De acordo com Schanaider, Aiex e Errico (2011) (28), esse fenômeno de injúria no testículo contralateral pode ser atribuído a mecanismos autoimune, como a presença de IgG depositado na membrana basal do túbulo seminífero. Em humanos, já foram relatados danos no testículo contralateral com presença de apoptose principalmente dos espermatócitos, espermatídes e das células de Sertoli após TT (29). No entanto, outros estudos não confirmam tais achados, demonstrando que os testículos contralaterais permaneceram inalterados (23, 25, 30-32). Nossos resultados mostraram que os testículos contralaterais praticamente não foram afetados após TT unilateral, exceto pelo fato de apresentarem queda significativa da proliferação celular do tecido intersticial nos grupos operados com 6 e 9 semanas de idade, quando comparados aos seus respectivos controles. Contudo, este resultado não afetou os demais parâmetros morfológicos, tampouco os parâmetros espermáticos analisados. Portanto, ficou demonstrado que os testículos contralaterais não sofrem alterações importantes, concordando com os achados que já relataram isso previamente (23, 25, 30-32).

Concentrações séricas de testosterona têm sido avaliadas em estudos experimentais de TT unilateral, e geralmente não têm encontrado alterações significativas (81). Pequenos períodos de isquemia causam perda significativa das células germinativas, e uma isquemia mais prolongada leva à perda primeiro das células de Sertoli, seguida finalmente por perda das células de Leydig (81). No caso de TT por períodos muito longos o resultado é a perda de

todos os tipos celulares e completa fibrose (83). No entanto, as células de Leydig podem permanecer no testículo mesmo após a perda de todas as células germinativas em casos de TT, mas não se sabe se continuam funcionais (83). Além disso, já foi sugerido que as células de Leydig podem estar afuncionais devido à perda da sensibilidade ou da resposta ao estímulo do LH, o que pode contribuir como uma das possíveis causas de falha na espermatogênese em testículos atrofiados (83). Molenaar et al. (1986) (84) após induzirem destruição seletiva das células de Leydig, verificaram que os níveis séricos de testosterona reduziram significativamente. Demonstraram ainda, que 35 dias após este acontecimento, as células de Leydig proliferam-se e retornaram aos valores normais, bem como os valores séricos de testosterona. Eles atribuíram este fato ao recrutamento de novas células de Leydig oriundas de células mesenquimais, suas principais células precursoras. Outro estudo mostrou que os níveis séricos de testosterona diminuíram significativamente em ratos adultos após 9 horas de torção a 1080° (59). Kanter (2010) (40) também encontrou níveis de testosterona reduzidos em ratos submetidos à TT, porém em níveis locais (intratesticular). Os achados do presente estudo mostraram que não houve redução da testosterona sérica nos animais que sofreram TT de 720° por 4 horas em relação aos respectivos controles, independente da faixa etária em que o TT ocorreu. No entanto, quando comparados os níveis séricos de testosterona entre os animais que sofreram TT em diferentes idades, verificou que os animais operados com 4 semanas de idade tiveram níveis séricos de testosterona menores que os animais do grupo operado com 9 semanas de idade, mesmo considerando que o tempo de recuperação para os animais operados com 4 semanas de idade foi bem maior que para o grupo operado com 9 semanas de idade.. Este resultado sugere que o dano nas células de Leydig pode ser maior quando a TT ocorre no período pré-púbere.

Os danos causados pela TT demonstrados neste trabalho podem acarretar em diminuição da fertilidade. Porém, poucos são os trabalhos que avaliaram a fertilidade de animais ou de indivíduos acometidos por TT. Heindel, Pakyz e Cosentino (1990) (59) avaliaram os danos provocados pela TT em ratos desde a fase pré-púbere à adulta, entretanto, o grau e o tempo de torção utilizados foram 1080° por 9 horas, submetendo os animais ao teste de fertilidade com duas fêmeas, no qual os parâmetros considerados para a avaliação foram a taxa de prenhez, o número e o comprimento dos fetos. Os animais púberes tiveram queda significativa em todos os parâmetros, enquanto os animais pré-púberes e adultos não. Em nosso estudo, foram utilizados mais parâmetros para avaliação da fertilidade dos animais e mesmo assim, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos que sofreram TT nas diferentes idades, discordando dos achados nos animais púberes do trabalho de (59). Por

outro lado, nossos achados em ratos que sofreram TT de 720° por 4 horas e não apresentaram diminuição na fertilidade corroboram com os achados de Cosentino et al.(1986) (26), que avaliaram a fertilidade em ratos submetidos à TT antes da puberdade com diferentes períodos de tempo de torção e concluíram que somente torções superiores à 9 horas e com mais de 720° de rotação testicular provocam perda de fertilidade. Entretanto, os autores avaliaram somente quanto à taxa de prenhez. Isto sugere que o grau e o tempo de ocorrência da TT pode influenciar na fertilidade. Apesar da TT não reduzir significativamente a fertilidade dos animais, o tratamento com resveratrol promoveu melhora em alguns dos parâmetros de fertilidade analisados. Nos animais submetidos à TT com 4 e 6 semanas de idade, o resveratrol foi capaz de melhorar a potência desses animais na idade adulta. Já nos animais submetidos à TT com 9 semanas de idade, o tratamento melhorou a fecundidade desses animais na idade adulta.

## CONCLUSÕES

A TT não alterou a fertilidade em ratos adultos submetidos a TT de 720° por 4 horas, independente da idade e que a TT ocorreu.

A TT não alterou os níveis séricos de testosterona em ratos adultos submetidos à TT de 720° por 4 horas, independente da idade e que a TT ocorreu.

A idade de ocorrência da TT não influenciou no dano espermático causado na vida adulta.

A idade de ocorrência da TT não influenciou na redução do volume testicular causado na vida adulta.

A idade de ocorrência da TT não influenciou no dano morfológico testicular causado na vida adulta.

O uso do resveratrol melhorou a morfologia testicular e o grupo mais beneficiado com o tratamento foi o dos animais que foram submetidos à TT com 4 semanas de idade. Entretanto, recuperou o epitélio seminífero no grupo que sofreu a TT com 9 semanas de idade, que não apresentou epitélio em nenhum túbulo após a TT.

O uso do resveratrol melhorou alguns parâmetros de fertilidade, como potência e fecundidade.

O uso do resveratrol não foi capaz de melhorar significativamente os parâmetros espermáticos em ratos que sofreram TT de 720° por 4 horas, independente da idade em que a TT ocorreu. Entretanto, recuperou a produção de espermatozóides no grupo que sofreu a TT com 9 semanas de idade, que ficou azoospérmico com a TT.

## REFERÊNCIAS

1. Junqueira LCU, José Carneiro, editor. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro 2011.
2. Reece WO, editor. *Fisiologia dos animais domésticos* 2006.
3. FH N. *Atlas de Anatomia Humana*. ed, editor. Rio de Janeiro 2011.
4. Russel LE, R.; Sinha, A. & Clegg, E. , editor. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. . Florida 1990.
5. Dombrowicz D, Sente B, Reiter E, Closset J, Hennen G. Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. *J Androl*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996 Nov-Dec;17(6):639-50.
6. Russell LD, de Franca LR, Hess R, Cooke P. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue Cell*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Feb;27(1):105-28.
7. Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H. Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996 Jul;245(3):509-18.
8. Keith L. Moore AFD, editor. *Anatomia orientada para a clínica* 2001.
9. Lee JW, Kim JI, Lee YA, Lee DH, Song CS, Cho YJ, et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Apr;47(4):736-42.
10. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*. [Review]. 1999 Jan;4(1):38-47.
11. Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K. Adult testicular torsion. *J Urol*. 2002 May;167(5):2109-10.
12. Gunther P, Schenk JP, Wunsch R, Holland-Cunz S, Kessler U, Troger J, et al. Acute testicular torsion in children: the role of sonography in the diagnostic workup. *Eur Radiol*. 2006 Nov;16(11):2527-32.
13. Mansbach JM, Forbes P, Peters C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med*. [Comparative Study Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Dec;159(12):1167-71.
14. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician*. [Review]. 2006 Nov 15;74(10):1739-43.

15. Callewaert PR, Van Kerrebroeck P. New insights into perinatal testicular torsion. *Eur J Pediatr*. [Case Reports Review]. 2010 Jun;169(6):705-12.
16. Kapoor S. Testicular torsion: a race against time. *Int J Clin Pract*. [Review]. 2008 May;62(5):821-7.
17. Favorito LA, Cavalcante AG, Costa WS. Anatomic aspects of epididymis and tunica vaginalis in patients with testicular torsion. *Int Braz J Urol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Sep-Oct;30(5):420-4.
18. Sessions AE, Rabinowitz R, Hulbert WC, Goldstein MM, Mevorach RA. Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. *J Urol*. 2003 Feb;169(2):663-5.
19. Davenport M. ABC of general surgery in children. Acute problems of the scrotum. *Bmj*. [Review]. 1996 Feb 17;312(7028):435-7.
20. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004 Feb-Apr;25(1-2):199-210.
21. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*. [Review]. 2008 Oct-Dec;1(1):15-24.
22. Sugiyama A, Chiba M, Nakagami T, Kawano S, Sanada Y, Tajiri T, et al. Beneficial effects of (-)-epigallocatechin gallate on ischemia-reperfusion testicular injury in rats. *J Pediatr Surg*. [Evaluation Studies]. 2012 Jul;47(7):1427-32.
23. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Serbest YA, Oztan O, Yazici M, et al. The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60th day following experimental testicular torsion. *Pediatr Surg Int*. 2007 Mar;23(3):271-5.
24. Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh RC, Aruldas MM, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (alpha-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod Toxicol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Feb;23(2):239-45.
25. Becker EJ, Jr., Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Jul-Aug;16(4):342-51.
26. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1986 Jan-Feb;7(1):23-31.
27. Kar A, Ozden E, Yakupoglu YK, Kefeli M, Sarikaya S, Yilmaz AF. Experimental unilateral spermatic cord torsion: the effect of polypolymerase enzyme inhibitor on histopathological and biochemical changes in the early and late periods in the ipsilateral and contralateral testicles. *Urology*. 2010 Aug;76(2):507 e1-5.

28. Schanaider A, Aiex CA, Errico G. Immunological effects of acute testicular torsion on the contralateral testis in rats. *Eur J Pediatr Surg. [Comparative StudyResearch Support, Non-U.S. Gov't]*. 2011 Dec;21(6):370-4.
29. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *J Urol*. 1998 Sep;160(3 Pt 2):1158-60.
30. Ozkan KU, Boran C, Kilinc M, Garipardic M, Kurutas EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg*. 2004 Jan;39(1):91-5.
31. Dokmeci D, Inan M, Basaran UN, Yalcin O, Aydogdu N, Turan FN, et al. Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct*. 2007 Nov-Dec;25(6):611-8.
32. Lorenzini F, Tambara Filho R, Gomes RP, Martino-Andrade AJ, Erdmann TR, Matias JE. Long-term effects of the testicular torsion on the spermatogenesis of the contralateral testis and the preventive value of the twisted testis orchiepididymectomy. *Acta Cir Bras*. 2012 Jun;27(6):388-95.
33. Pan F, Zhu Z, Li B, Pang Z, Xiao Y, Zeng F. Emergency treatment of testicular torsion and postoperative follow-up: a 71 case report. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2012 Oct;32(5):704-6.
34. Al-Terki A, Al-Qaoud T. Spermatic cord knot: a clinical finding in patients with spermatic cord torsion. *Adv Urol*. 2011;2011:310123.
35. Cos LR, Rabinowitz R. Trauma-induced testicular torsion in children. *J Trauma. [Case Reports]*. 1982 Mar;22(3):244-6.
36. Bolln C, Driver CP, Youngson GG. Operative management of testicular torsion: current practice within the UK and Ireland. *J Pediatr Urol*. 2006 Jun;2(3):190-3.
37. Anderson JB, Williamson RC. Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. *Br J Surg*. 1988 Oct;75(10):988-92.
38. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular aspects of medicine*. 2004 Feb-Apr;25(1-2):199-210.
39. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. *American family physician*. 1991 Sep;44(3):834-40.
40. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol*. 2010 Dec;89(3):314-20.
41. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Curcumin attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Fertil Steril*. 2009 Jan;91(1):271-7.



42. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology*. 2007 Dec;70(6):1237-42.
43. Lin Y, Xue ES, Liang RX, Huang WQ, Yu L, Chen S, et al. [Ultrasonographic appearance of experimental testicular ischemia and protective effect of allopurinol]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Dec;16(12):1083-8.
44. Aktas BK, Bulut S, Baykam MM, Ozden C, Senes M, Yucel D, et al. The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*. 2010 Mar;26(3):293-8.
45. Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2009 Jun;218(2):141-7.
46. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2011 Jul;46(7):1419-24.
47. Uguralp S, Mizrak B, Bay Karabulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*. 2005 Apr;15(2):114-9.
48. Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Mar 31;159(3):993-1002.
49. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. [Review]. 2006 Jun;5(6):493-506.
50. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res*. [Review]. 2008 Jan-Feb;658(1-2):68-94.
51. Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 Nov;28(11):729-37.
52. Das S, Das DK. Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2007 Jun;2(2):133-8.
53. Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Apr;24(4):618-22.
54. Raval AP, Lin HW, Dave KR, Defazio RA, Della Morte D, Kim EJ, et al. Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Curr Med Chem*. [Review]. 2008;15(15):1545-51.
55. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Buyukbayram H. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 14;14(46):7101-6.

56. Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Clot JP, Savouret JF, et al. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl.* 2008 Apr;14(4):451-9.
57. Ozkan OV, Yuzbasioglu MF, Ciralik H, Kurutas EB, Yonden Z, Aydin M, et al. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2009 Jul;218(3):251-8.
58. Uguralp S. UU, MIZrak B. Resveratrol May Reduce Apoptosis of Rat Testicular Germ Cells After Experimental Testicular Torsion. *European journal Pediatric Surgery.* 2005;15(5):333-6.
59. Heindel RM, Pakyz RE, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion. Contralateral testicular degeneration at various ages in the rat. *J Androl.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1990 Nov-Dec;11(6):506-13.
60. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Nov;62(4A):609-14.
61. de Souza DB, Costa WS, Cardoso LE, Benchimol M, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Does prolonged pneumoperitoneum affect the kidney? Oxidative stress, stereological and electron microscopy study in a rat model. *Int Braz J Urol.* 2013 Jan;39(1):30-6.
62. Jeong SJ, Choi WS, Chung JS, Baek M, Hong SK, Choi H. Preventive effects of cyclosporine a combined with prednisolone and melatonin on contralateral testicular damage after ipsilateral torsion-detorsion in pubertal and adult rats. *The Journal of urology.* Aug;184(2):790-6.
63. Motrich RD, Ponce AA, Rivero VE. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertility and sterility.* 2007 Aug;88(2):452-61.
64. Motrich RD PA, Rivero VE Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertil Steril.* 2007;88(2):452-61.
65. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility.* 1984 Jan;70(1):219-28.
66. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970 Jun;26(1):57-60.
67. Silva RC, Costa GM, Andrade LM, Franca LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jan 15;73(2):157-67.
68. Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2000 Mar;62(3):680-90.

69. Silva RC, Costa GM, Andrade LM, Franca LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*. Jan 15;73(2):157-67.
70. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2-25.
71. de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jul-Aug;33(4):735-9.
72. Abbasoglu L, Kalaz EB, Soluk-Tekkesin M, Olgac V, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M. Beneficial effects of taurine and carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatr Surg Int*. 2012 Nov;28(11):1125-31.
73. Altunoluk B, Soylemez H, Bakan V, Ciralik H, Tolun FI. Protective effects of zofenopril on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Urol J*. 2011 Fall;8(4):313-9.
74. Moritoki Y, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Intratesticular pressure after testicular torsion as a predictor of subsequent spermatogenesis: a rat model. *BJU Int*. 2012 Feb;109(3):466-70; discussion 70.
75. Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, et al. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl*. 2007 Jul-Aug;28(4):528-32.
77. Palmer JS, Plzak LF, Cromie WJ. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. *J Urol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1997 Sep;158(3 Pt 2):1138-40.
78. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int*. [Review]. 2005 Mar;95(4):503-7.
79. Dokmeci D, Kanter M, Inan M, Aydogdu N, Basaran UN, Yalcin O, et al. Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol*. 2007 Sep;81(9):655-63.
80. Jeong SJ, Choi WS, Chung JS, Baek M, Hong SK, Choi H. Preventive effects of cyclosporine a combined with prednisolone and melatonin on contralateral testicular damage after ipsilateral torsion-detorsion in pubertal and adult rats. *J Urol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Aug;184(2):790-6.
81. Santana Castro MA, Ferreira U, Glina S, Santana Castro AC, Matheus WE, Reis LO. [Testicular components volume density alteration associated to cis-platinum: can antioxidants offer protection?]. *Actas Urol Esp*. 2010 Mar;34(3):282-7.
82. Kerr JB. Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. [Review]. 1992 Apr;6(2):235-50.

83. Kim YH, Kim GH, Shin JH, Kim KS, Lim JS. Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. *Korean J Urol.* 2010 Nov;51(11):794-9.
84. Uguralp S UU, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg.* 2005;(5)(Oct;15):333-6.
85. Abdulmalek K, Ashur F, Ezer N, Ye F, Magder S, Hussain SN. Differential expression of Tie-2 receptors and angiopoietins in response to in vivo hypoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Sep;281(3):L582-90.
86. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J Androl.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Jan-Feb;16(1):12-7.
87. Molenaar R, de Rooij DG, Rommerts FF, van der Molen HJ. Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* [Comparative Study]. 1986 Jun;118(6):2546-54.

## APÊNDICE – Soluções utilizadas no experimento

### 1 - SOLUÇÃO DE BOUIN

- 70% Ácido pícrico saturado 3000.0 mL
- 25% Formaldeído 1000.0 mL
- 5% Ácido acético glacial 200.0 mL

### 2 - FORMALINA TAMPONADA

Formalina tamponada neutral (pH=7,4) de Lillie

- Formaldeído pa (40%) ..... 100ml
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato de sódio bibásico anidro pa)..... 6,5g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (Fosfato de sódio monobásico, pa)..... 4,0g
- Água destilada..... 900ml

\* Gotejar NaOH ou HCl na solução até conseguir o pH desejado

### 3 - PBS – solução estoque – PH 7,2

- NaCl (Cloreto de sódio) ..... 40,0g
- KCl (cloreto de potássio) ..... 1,0g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1,0g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 5,75g
- Água destilada ..... 1L

\* Diluir 1:10 para solução de trabalho

### 4 - PBS / BSA 0,5%

- 0,5 g de Albumina Sérica Bovina
- 100 ml PBS – Solução trabalho

## 5 -MÉTODO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

### Análise de testosterona sérica

- Os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes do uso.
- Os calibradores, controles e as amostras devem ser testados em duplicata.
- Uma vez que o procedimento tenha sido iniciado, todas as etapas devem ser cumpridas sem interrupção.
- Preparar as soluções de trabalho da testosterona Livre conjugado e tampão de lavagem. Pipetar 50µl de cada amostra de controle, calibrador e amostras nos poços devidamente identificados.
- Pipetar 100µl da solução de conjugado de trabalho em cada poço.
- Agitar suavemente a placa por 10 segundos, e em seguida incubar a placa a 37 ° C durante 1 hora.
- Lavar os poços três vezes com 300µl de tampão de lavagem por poço
- Tocar a placa firmemente contra o papel absorvente, para garantir que ele esteja seco. Pipetar 150µl de substrato de Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (TMB) para cada poço a intervalos de tempo
- Incubar a placa a 37 ° C durante 10-15 minutos (ou até que o calibrador 0 alcança a cor azul).
- Pipetar 50µl de solução de paragem em cada poço com os mesmos intervalos de tempo tal como feito com o substrato TMB.
- Ler a placa num leitor de microplaca a 450 nm dentro de 20 minutos após a adição da solução de paragem.

## **6 -HEMATOXILINA E EOSINA**

- Desparafinar em estufa à 60°C (10 minutos)
- Desparafinar em duas mudas de xilol (10 minutos cada)
- Hidratar em duas mudas de álcool absoluto (5 minutos cada)
- Hidratar em álcool 90%, 80% e 70% (3 minutos cada)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Corar em hematoxilina de Delafeld (3 minutos)
- Lavar em água corrente (3 minutos)
- Corar em solução aquosa de eosina (1 minuto)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Desidratar em álcool 70%, 80% e 90% (1 minuto cada)
- Desidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada)
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Montar com entellan e lamínula

## **7 - ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)**

- Desparafinar em estufa à temperatura de 60°C (10 minutos)
- Desparafinar em 3 banhos de xilol (5 minutos cada)
- Hidratar em etanol de concentrações crescentes (duas mudas de etanol 100% por 2 minutos cada, e em etanol 90%, 80% e 70% por 3 minutos cada)
- Recuperação do sítio antigênico (banho em solução de Tris-EDTA + 0,5ml de tween diluídos em 1000ml de água destilada) - overnight em estufa à temperatura de 60°C
- Banho em PBS (3 minutos)
- Inibição da peroxidase endógena através do banho em solução de peróxido de hidrogênio 30% em metanol na proporção 1:9 (15 minutos)
- 3 banhos em PBS (2 minutos cada)
- Bloqueio proteico com solução de bloqueio (reagente A) por 10 minutos
- Anticorpo anti-PCNA (1:100 em PBS BSA 1%) por 60 minutos em estufa à 37°C
- 3 banhos em PBS (2 minutos cada)

- Anticorpo secundário - anticorpo de largo espectro (reagente B) por 20 minutos
- 3 banhos em PBS (2 minutos cada)
- Complexo protéico de estreptoavidina e peroxidase (reagente C) - se liga as biotinas do anticorpo secundário (10 minutos)
- 3 banhos em PBS (2 minutos cada)
- Diaminobezendina (DAB) - cromógeno que se liga a peroxidase do complexo proteico de estreptoavidina (1 gota de cada reagente D1, D2 e D3 diluídos em 1 ml de água destilada) - 3 minutos protegido da luz
- Lavar em água destilada
- Corar em hematoxilina a 50% (3 minutos)
- Lavar em água destilada (3 minutos)
- Desidratar em etanol 70% e 90% ( 1 minuto cada) e em duas mudas de etanol 100% ( 5 minutos cada)
- Clarificar em duas mudas de xilol ( 5 minutos cada)
- Montar em entellan e lamínula

**Obs:** Tris-EDTA (1,21g de tris, 037g de EDTA)

## **8 - PICROSIRIUS RED**

- Desparafinar em estufa à 60°C por 10 minutos
- Desparafinar em duas mudas de xilol 5% (10 minutos cada),
- Hidratar em etanol de concentrações decrescentes (100%, 90% e 70%) e água destilada (3 minutos cada)
- Corar em solução de Sirius red 0,1% (1 hora)
- Dois banhos de HCL 0,01N (1 minuto cada)
- Lavar em água destilada
- Corar em hematoxilina (3 minutos)
- Lavar em água corrente (2 minutos)



- Desidratar em etanol de concentrações crescentes de 70% e 90% (2 minutos cada) e duas mudas de etanol 100% (3 minutos cada)
- Clarificar em dois banhos de xilol (5 minutos cada)
- Montar em entellan e lamínula

**Obs: com polarização:**

- Birrefringência em espessas fibras de colágeno tipo I – amarelo ou vermelho
- Fraca birrefringência em delgadas fibras de colágeno tipo III – verde

**ANEXO A – Autorizações pela Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais**



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/008/2011** sobre "**Avaliação da função reprodutiva, estrutura e ultra-estrutura testicular de ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade**", sob a responsabilidade de **Waldemar Silva costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **31/03/2011**. Este certificado expira em **31/03/2015**.

Rio de Janeiro, 31 de Março de 2011.

Prof. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

Cristina Lisboa da Silva  
Coordenadora do Deptº de Ciências Fisiológicas  
IBRAG/UERJ - Mat. 34765-B

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Mat. 2887-6

Ass:



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

**ibrag**  
Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/019/2012 sobre “**Avaliação da função reprodutiva, estrutura e ultra-estrutura testicular de ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade**”, sob a responsabilidade de **Waldemar da Silva Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **20/03/2012**. Este certificado expira em **20/03/2016**.

Rio de Janeiro, 20 de Março de 2012.

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva*  
*Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ*  
l.ass *Matricula 34765-8*

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br

**ANEXO B** - Artigo elaborado da dissertação submetido ao The Journal of Urology

**Ribeiro CT**, Lange R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA.,  
TESTICULAR TORSION IN RATS OF DIFFERENT AGES AND THE USE OF ANTI-  
OXIDANTS.



**THE JOURNAL** *of* **UROLOGY**<sup>®</sup>

Official Journal of the American Urological Association

www.jurology.com

Powered by



Role: Author

Username: diogobenchimol

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

### Author's Decision

Thank you for approving "TESTICULAR TORSION IN RATS OF DIFFERENT AGES AND THE USE OF ANTI-OXIDANTS".

**The Journal of Urology**  
**TESTICULAR TORSION IN RATS OF DIFFERENT AGES AND THE USE OF ANTI-  
 OXIDANTS**  
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	TESTICULAR TORSION IN RATS OF DIFFERENT AGES AND THE USE OF ANTI- OXIDANTS
Article Type:	Pediatric Supplement
Keywords:	Testicular torsion, Rats, Puberty, Resveratrol, Arginine
Corresponding Author:	Diogo Benchimol De Souza, Ph.D. State University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	State University of Rio de Janeiro
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Carina T. Ribeiro
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Carina T. Ribeiro Raquel Milhomem Diogo Benchimol De Souza, Ph.D. Waldemar S. Costa Francisco J. B. Sampayo Marco A. Pereira-Sampayo
Order of Authors Secondary information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p><b>Purpose:</b> To assess reproductive function and testicular of adult rats, which underwent testicular torsion (TT) before, during and after puberty and the effect of the treatment with resveratrol and arginine.</p> <p><b>Materials and Methods:</b> Rats were submitted to 720o TT for 4 hours. Age matched animals were also submitted to sham surgery and to TT receiving resveratrol or arginine. At 12 weeks old, all rats were allowed to mate females for obtaining the reproductive function analysis. The males were killed at 14 weeks when spermatozooids were collected from epididymal tail and evaluated for concentration, motility and viability. Sample from testes were collected for morphological analysis.</p> <p><b>Results:</b> The reproductive function analysis showed no difference between animals submitted to testicular torsion and sham rats. Also, the age of torsion occurrence did not influence these parameters. However, resveratrol and arginine improved potency. Concerning the spermatozoid analysis, the twisted testicle samples were inferior for all parameters in relation to sham and contralateral samples. This was especially important in animals submitted to TT at adulthood, which presented azoospermia. Resveratrol and arginine were not able of improving the spermatozoid parameters in the twisted testis; however the contralateral samples had higher spermatozoid concentration or viability in prepubertal and adult twisted animals in comparison to untreated animals.</p> <p><b>Conclusions:</b> Testicular morphology is less affected in animals submitted to TT during puberty. The treatment with antioxidants improves contralateral testicles and some fertility parameters. Both antioxidants also ameliorate testicular morphology after TT. Prepubertal animals were the most benefited after both antioxidants treatment.</p>

ANEXO C - Artigo elaborado e publicado durante o Mestrado

**Ribeiro CT, De Souza DB, Medeiros JL Jr, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ.**  
Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle.

The image shows a screenshot of a PubMed search result page. At the top, there is a navigation bar with 'NCEM Resources' and 'How To' links, and a 'Sign in to NCEM' button. Below this is the PubMed logo and a search bar with 'PubMed' selected. The main content area displays the article title 'Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle' by Ribeiro CT, De Souza DB, Medeiros JL Jr, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. The abstract is visible, detailing the purpose, methods, results, and conclusion of the study. On the right side, there are options to 'Save items', 'Related citations in PubMed', and 'Recent activity'. The PMID is listed as 23743678.

Display Settings:  Abstract

Acta Cir Bras, 2013 Jun;28(6):419-22.

**Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle.**

Ribeiro CT, De Souza DB, Medeiros JL Jr, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ.

**Abstract**

**PURPOSE:** To investigate the seminiferous tubule histological morphology after an 8 mmHg pneumoperitoneum in the rat model.

**METHODS:** Fourteen rats were divided into two groups: a Sham group submitted to anesthesia and a pneumoperitoneum (Pp) group submitted to abdominal insufflation at 8 mmHg during three hours, followed by desufflation. All rats were killed after six weeks, testicles were collected and evaluated for the tubule diameter, germinal epithelium height and Johnsen's score. Means were compared by using the Student's-t-test.

**RESULTS:** The seminiferous tubule diameter was diminished by 11.3% in the group submitted to pneumoperitoneum ( $p < 0.05$ ). No significant difference was found among the groups when analyzing the epithelium height and Johnsen's score.

**CONCLUSION:** In the rat model, the seminiferous tubules present structural alterations when subjected to pneumoperitoneum of 8 mmHg during three hours.

PMID: 23743678 [PubMed - in process]

[LinkOut - more resources](#)

Save items

Related citations in PubMed

Recent activity

Acta Cir Bras. 2013 Jun;28(6):419-22.

DOI: 10.1590/S0102-86502013000600003

**3 – ORIGINAL ARTICLE EXPERIMENTAL UROLOGY****Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle**

**Carina Teixeira Ribeiro<sup>I</sup>, Diogo Benchimol De Souza<sup>II</sup>, Jorge Luiz Medeiros Jr.<sup>III</sup>, Waldemar Silva Costa<sup>IV</sup>, Marco Aurélio Pereira-Sampaio<sup>V</sup>, Francisco José Barcellos Sampaio<sup>VI</sup>**

I Fellow Master degree, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation. II PhD, Postdoctoral Fellow, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil. Main author. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript writing. III Master, Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil. Acquisition of data, manuscript preparation. IV PhD, Visiting Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil. Conception and design of the study, critical revision. VPhD, Associate Professor, Department of Morphology, Fluminense Federal University. Postdoctoral Fellow, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript writing. VI PhD, Full Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil. Conception and design of the study, critical revision.

**ABSTRACT**

**PURPOSE:** To investigate the seminiferous tubule histological morphology after an 8 mmHg pneumoperitoneum in the rat model.

**METHODS:** Fourteen rats were divided into two groups: a Sham group submitted to anesthesia and a pneumoperitoneum (Pp) group submitted to abdominal insufflation at 8 mmHg during three hours, followed by desufflation. All rats were killed after six weeks,

testicles were collected and evaluated for the tubule diameter, germinative epithelium height and Johnsen's score. Means were compared by using the Student's-t-test.

**RESULTS:** The seminiferous tubule diameter was diminished by 11.3% in the group submitted to pneumoperitoneum ( $p < 0.05$ ). No significant difference was found among the groups when analyzing the epithelium height and Johnsen's score.

**CONCLUSION:** In the rat model, the seminiferous tubules present structural alterations when subjected to pneumoperitoneum of 8 mmHg during three hours.

**Key words:** Pneumoperitoneum. Testis. Histology. Rats.

### **Introduction**

The widespread use of laparoscopic surgical procedures has aroused great interest in experimental studies, especially concerning the organ damage caused by the increasing intraabdominal pressure<sup>1-3</sup>. The pneumoperitoneum used in laparoscopy promotes an increased intra-abdominal pressure, which compresses the vessels, compromising the drainage of abdominal organs. Although the normal venous drainage is reestablished after abdominal desuflation in the end of the laparoscopic procedure, deleterious lesions have been shown in different organs<sup>4-6</sup>. However, few articles have focused on how the pneumoperitoneum affects the testicles. Despite the extraabdominal localization of the testicles, its arteries and veins are branches from the abdominal aorta and tributaries of the inferior vena cava. Thereby, the increased intra abdominal pressure could affect the blood supply and the venous drainage of this organ. It was previously reported that a 20mmHg pneumoperitoneum increased apoptosis of germinal cells in pig testicles<sup>7</sup> and a 10 or 20mmHg pneumoperitoneum resulted in a decreased blood flow with augmented oxidative stress and histologic damage in testicles of a rat model<sup>8</sup>. Thus, these studies demonstrated that the testicles can be affected by pneumoperitoneum. On the other hand, surgeons commonly use pneumoperitoneum pressures of up to 15 mmHg in humans, what may corresponds to an 8 mmHg in rats<sup>9</sup>. So, the intra abdominal pressure used in the animal studies seems to be higher than those normally used in clinical settings. Therefore, the aim of this study was to investigate, by objective methods, the seminiferous tubule histological morphology after an 8 mmHg pneumoperitoneum in the rat model.



## Methods

Fourteen male Wistar rats, four to six months old and weighing 250 to 360 g were used in this study. The rats were kept in a room with controlled temperature ( $25 \pm 1$  C) and with an artificial dark–light cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm). They were fed with standard rat food and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the Brazilian laws for scientific use of animals, and the project was approved by the institutional ethical committee. The rats were randomly divided into two groups: a Sham group (n = 7), which was submitted only to anesthesia for 210 minutes, and a pneumoperitoneum (Pp) group (n = 7) which underwent to a 180 minutes of Pp at 8 mmHg followed by 30 minutes of desufflation, under the same anesthetic protocol of the Sham group<sup>10</sup>. All rats were killed six weeks after the procedure and their testes were used for seminiferous tubule diameter, seminiferous tubule epithelium height analyses and Johnsen's score. All analyses were blindly performed.

### *Pneumoperitoneum*

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg; Cetamin 10%, Syntec do Brasil, Cotia-SP, Brazil) and xylazine (10 mg/kg; Xilazin 20%, Syntec do Brasil, Cotia-SP, Brazil) and kept with spontaneous breathing during the experiment. In the Pp group, a 21-gauge needle was inserted into the abdominal cavity and a Pp at 8 mmHg was established with CO<sub>2</sub> by using a laparoscopic insufflator (Eletronic Endoflator 264305 20, Karl Storz, Tuttlingen, Germany). After 180 minutes of Pp, the abdominal cavity was desufflated, and the animals remained anesthetized for 30 minutes.

### *Histologic evaluation*

The tests were fixed in 10% formaldehyde and then routinely processed for paraffin embedding. Serial 5- $\mu$ m sections of the entire testicle were obtained and stained with hematoxylin and eosin (HE). Images were randomly captured by a digital camera (DP 70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to the microscope (BX 51, Olympus, Tokyo, Japan) under x100 or x200 magnification for diameter and epithelium height, respectively. The diameter of the seminiferous tubules and seminiferous epithelium height were measured using ImageJ software. For this purpose, five tubules in five fields of five sections in each

testis were used, summing 125 measures per animal for each parameter. The epithelium height was measured with the “straight line” plugin and considered as the distance from the tunica propria to the inner germinal cell, excluding the spermatozoids. The tubular diameter was measured in the most circular tubules with the same “straight line” plugin passing in the center of the tubule, from tunica propria to tunica propria<sup>11,12</sup>.

### *Johnsen's score*

It was evaluated fifty randomly selected tubules per testis under x400 magnification and the germinal epithelium were scored according to Johnsen's criteria<sup>13</sup>. A 1-10 score was given to each tubule according to the maturation of germ cells: ten to the complete spermatogenesis, sperm with many germinal epithelium and arranged with regular thickness leaving an open lumen; nine for many sperm, but the epithelium disorganized, germ scaly or obliteration of the lumen, eight for only a few sperm; seven for no sperm but many spermatids; six for no sperm and only a few spermatids (less than 5 - 10), five for no sperm and spermatids, but several spermatocytes; four for only a few spermatocytes (less than 5) and no spermatid and sperm, three for only spermatogonia and germ cells; two for no germ cells but presence of Sertoli cells; one for an absence of cells in the section tubular.

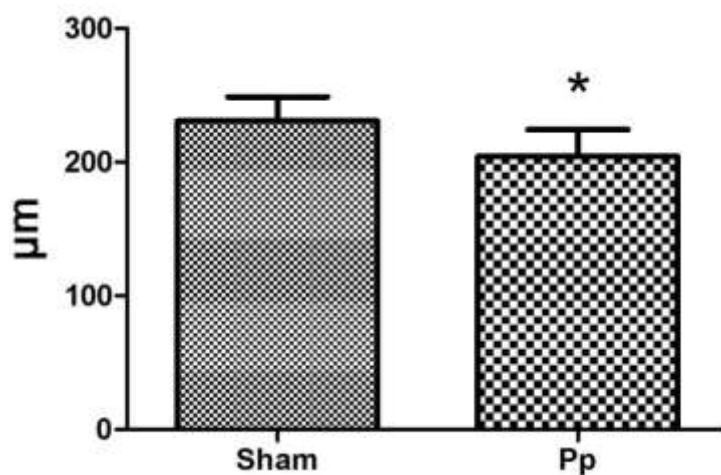
### *Statistical analysis*

The two-tailed Student's t test was used for all mean comparisons. Significance was set at a probability value of less than 0.05. Analyses were performed using GraphPad Prism software.

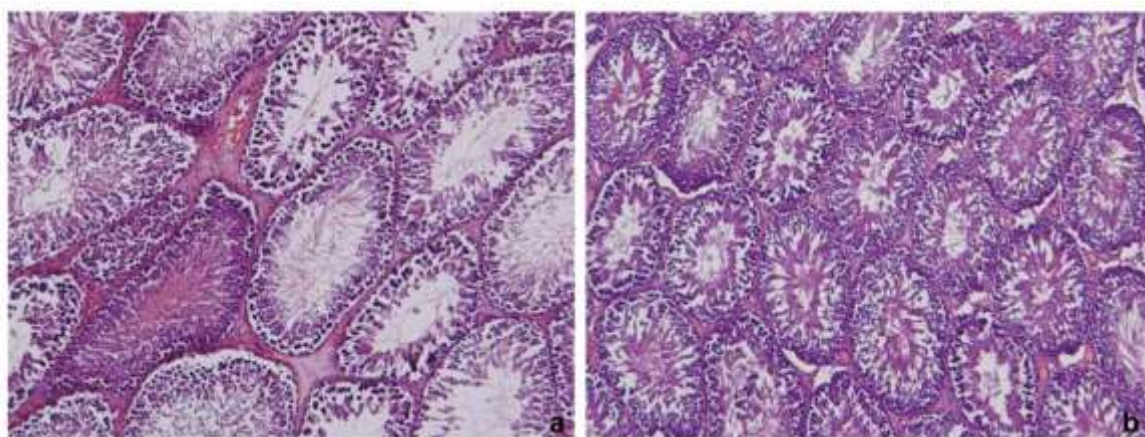
## **Results**

The results of the seminiferous epithelium height and the Johnsen's score showed that there was no difference between the seminiferous epithelium of controls and rats submitted to the 8mmHg pneumoperitoneum ( $p>0.05$ ). The epithelium height of control animals was  $28.7\pm 6.1$  and  $28.7\pm 5.1$  in Pp animals. Johnsen's score was  $8.2\pm 0.45$  in controls and  $8.4\pm 0.43$  in Pp animals. However, regarding the seminiferous tubule

diameter, it was found a 11.3% decrease ( $p<0.05$ ) in the Pp group compared to the sham group (Figure 1). This difference can be observed in Figure 2.



**FIGURE 1** - Seminiferous tubule diameter from rats of Sham group and Pp group. Data are expressed as mean and standard deviation ( $p<0.05$ ).



**FIGURE 2** - Photomicrography of transverse section of the testicle, showing the reduced seminiferous tubule diameter in Pp group. **a.** Sham group. **b.** Pp group (H&E, x100).

### Discussion

This work proposes to study the morphology of the seminiferous tubule of rats subjected to a 8 mmHg pneumoperitoneum during three hours. There are few experimental studies upon this topic, moreover they investigated the effects of intra-abdominal pressures in

pigs<sup>7,8</sup> and rats<sup>7,8</sup> using higher pressures than what corresponds to clinical practice in humans, since the 8mmHg was established for rats as the pressure what corresponds to higher routinely used pressures in humans<sup>9</sup>. Thus, this is the first study that investigates whether a pneumoperitoneum of 8 mmHg can cause morphological changes in the seminiferous tubules. Most experiments that investigate morphological alterations after pneumoperitoneum focused on intra-abdominal organs. Intra-abdominal pressures of 15 mmHg for 60 minutes in rats increased the oxidative stress in intestinal tissue<sup>14</sup>. Another study evaluated the effect of insufflations at 4, 8, or 12 mmHg over the kidney and liver blood flow. It was found a decrease in renal blood flow during inflation with CO<sub>2</sub>, but this decrease was only significant in the group that was inflated to 8 and 12 mmHg. Also, these pressures did not induce changes in hepatic arterial flow<sup>5</sup>. Regarding the hepatic portal blood flow, a pneumoperitoneum of 14 mmHg was sufficient to cause a significant decrease<sup>15</sup>. Previous studies demonstrated that a 15 mmHg pneumoperitoneum increases the inferior vena cava pressure, while the venous flow is kept constant, as the cardiac output was not affected by this intra-abdominal pressure. However, there is a peripheral blood stasis in vessels of the lower limbs<sup>4</sup>. Based on this report, the effects of pneumoperitoneum on the testicles could be explained. Just as the lower limbs, the testicles are located outside the abdominal cavity but its vascular irrigation and drainage passes thru the abdominal cavity and thus, may be influenced by modifications in inferior vena cava and abdominal aorta pressures. It has been supposed that, as the pampiniform plexus does not have a valve system and are more compressible than arteries, it might be more compressed by increased abdominal pressure than other venous and arterial systems. The testicles are very sensitive to blood supply changes. This aspect have been thoroughly studied in experimental testicular torsion, in which there is impaired blood flow that causes major damage to the germ cells<sup>16</sup>. Similarly, it was demonstrated that during pneumoperitoneum the increased abdominal pressure caused a decreased testicular blood flow with increased oxidative stress in a rat model<sup>8</sup>. It is possible that the pressure that decreases testicular blood flow increases reactive oxygen species further leading to seminiferous tubule morphological alterations as seen in the present study. In a porcine model submitted to a 20 mmHg pneumoperitoneum for four hours, there was an increased cell apoptosis and eNOS and iNOS positive cells in the testicles. However, no difference was observed in relation to the Johnsen's score<sup>7</sup>, which corroborates to our findings. Further information about the reproductive function of animals submitted to

pneumoperitoneum would be of especial interest to investigate the sperm production after these alterations. Also, long term analysis would help informing if and when normal testicle morphology is restored.

### **Conclusion**

In rat model, the seminiferous tubules present structural alterations when subjected to pneumoperitoneum of 8 mmHg during three hours.

### **References**

1. Demyttenaere S, Feldman LS, Fried GM. Effect of pneumoperitoneum on renal perfusion and function: a systematic review. *Surg Endosc.* 2007;21(2):152-60.
2. Guven S, Muci E, Unsal MA, Yulug E, Alver A, Kadioglu Duman M, Mentese A. The effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on ovarian blood flow, oxidative stress markers, and morphology during laparoscopy: a rabbit model. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1327-32.
3. Avraamidou A, Marinis A, Asonitis S, Perrea D, Polymeneas G, Voros D, Argyra E. The impact of ischemic preconditioning on hemodynamic, biochemical and inflammatory alterations induced by intra-abdominal hypertension: an experimental study in a porcine model. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397(8):1333-41.
4. Lindberg F, Bergqvist D, Rasmussen I, Haglund U. Hemodynamic changes in the inferior caval vein during pneumoperitoneum. An experimental study in pigs. *Surg Endosc.* 1997;11(5):431-7.
5. Brundell SM, Tsopelas C, Chatterton B, Touloumtzoglou J, Hewett PJ. Experimental study of peritoneal blood flow and insufflations pressure during laparoscopy. *Br J Surg.* 2002;89(5):617-22.
6. Lindstrom P, Wadstrom J, Ollerstam A, Johnsson C, Persson AE. Effects of increased intra-abdominal pressure and volume expansion on renal function in the rat. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(11):2269-77.
7. Istanbuluoglu MO, Piskin M, Zor M, Celik A, Ozgok A, Ates M, Ustun H, Ozgok Y. The acute effects of increased intra-abdominal pressure on testicular tissue: an experimental study in pigs. *Urology.* 2011;77(2):510 e12-6.

8. Imamoglu M, Cay A, Unsal MA, Aydin S, Ozdemir O, Karahan C, Sari A, Sarihan H. The effects of increased intraabdominal pressure on testicular blood flow, oxidative stress markers, and morphology. *J Pediatr Surg.* 2006;41(6):1118-24.
9. Avital S, Itah R, Szomstein S, Rosenthal R, Inbar R, Sckornik Y, Weinbroum A. Correlation of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneal pressures between rodents and humans. *Surg Endosc.* 2009;23(1):50-4.
10. de Souza DB, Costa WS, Cardoso LE, Benchimol M, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJB. Does prolonged pneumoperitoneum affect the kidney? Oxidative stress, stereological and electron microscopy study in a rat model. *Int Braz J Urol.* 2013;39(1):30-6.
11. Gallo CB, Miranda AF, Felix-Patricio B, Ramos CF, Cardoso LE, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of castration and hormone replacement in the urinary bladder of rats: structural, ultrastructural, and biochemical analysis. *J Androl.* 2012;33(4):684-90.
12. Mirhoseini M, Mohamadpour M, Khorsandi L. Toxic effects of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) extract on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(5):457-61.
13. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
14. Bulbuloglu E, Yildiz H, Senoglu N, Coskuner I, Yuzbasioglu MF, Kilinc M, Dogan Z, Deniz C, Oksuz H, Kantarceken B, Atli Y. Protective effects of zinc, pentoxifylline, and N-acetylcysteine in an animal model of laparoscopy-induced ischemia/reperfusion injury of the small intestine. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2011;21(10):947-51.
15. Tunon MJ, Gonzalez P, Jorquera F, Llorente A, Gonzalo-Orden M, Gonzalez-Gallego J. Liver blood flow changes during laparoscopic surgery in pigs. A study of hepatic indocyanine green removal. *Surg Endosc.* 1999;13(7):668-72.
16. Altunoluk B, Soylemez H, Bakan V, Ciralik H, Tolun FI. Protective effects of zofenopril on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Urol J.* 2011;8(4):313-9.

**Correspondence:**

Diogo Benchimol De Souza

Avenida 28 de Setembro, 87, Fundos

20562-030 Rio de Janeiro - RJ Brasil

Tel/Fax: (55 21)2868-8399

diogobenchimol@gmail.com

Received: February 14, 2013

Review: April 12, 2013

Accepted: May 10, 2013

Conflict of interest: none

Financial sources: National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Rio de Janeiro Research Foundation (FAPERJ) and Coordination of Improvement of Higher Academic Staff (CAPES), Brazil  
1Research performed at Urogenital Research Unit, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.