



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Guilherme Damian Tostes

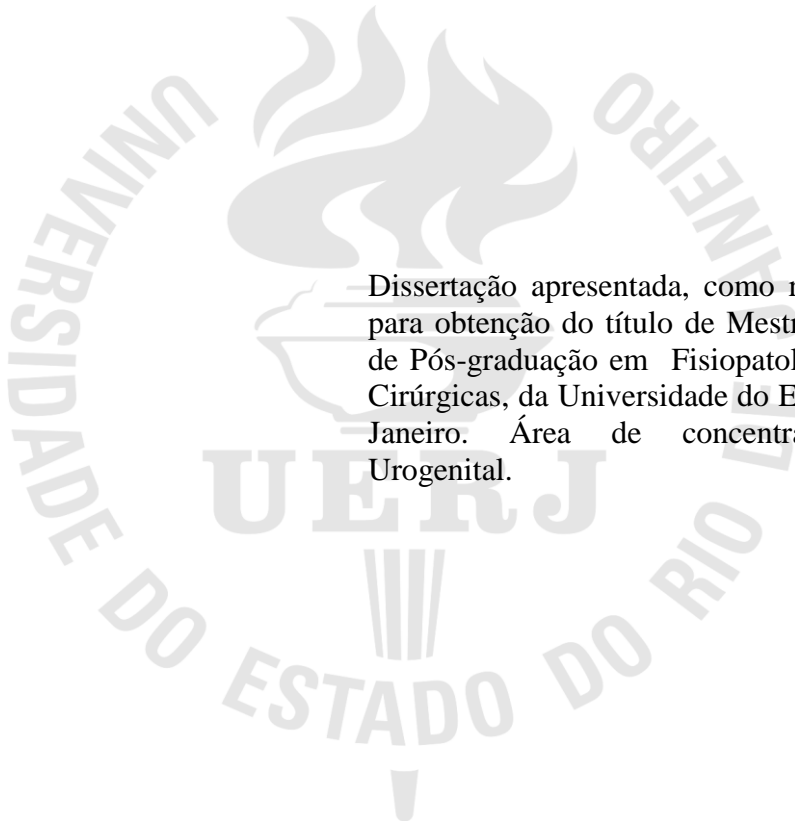
Análise estrutural dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia

Rio de Janeiro

2012

Guilherme Damian Tostes

Análise estrutural dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia



- 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. Luciano Alves Favorito

Rio de Janeiro

2012

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

T716 Tostes, Guilherme Damian.
Análise estrutural dos apêndices testiculares em pacientes com
criptorquia / Guilherme Damian Tostes. – 2012.
56f.

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

1. Criptorquidismo. 2. Testículos – Anomalias e deformidades –
Teses. 3. Epididimite. 4. Doenças testiculares. I. Favorito, Luciano
Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.681-007.41

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

Assinatura

Data

Guilherme Damian Tostes

Análise estrutural dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia

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

Aprovada em 16 de maio de 2012.

Orientador :

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira-Sampaio
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Alfredo Félix Canalini
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Universidade Federal Rural Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Sampaio coordenador geral da Pós Graduação por manter um laboratório de excelência em pesquisa no Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr. Luciano Alves Favorito, que me orientou de forma brilhante, entendendo as minhas dificuldades.

Ao amigo João Carvalho, peça importante para esse trabalho.

A colega Suelen Freitas que não mediu esforços para me ajudar.

RESUMO

TOSTES, Guilherme Damian. *Análise estrutural dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia*. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas)- Faculdade de Ciências Médicas – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo deste trabalho é estudar a incidência, a estrutura dos apêndices testiculares (AT) em pacientes com criptorquia, comparando a sua incidência com as anomalias epididimárias e a patência do processo vaginal. Estudamos 55 pacientes (72 testículos) portadores de criptorquia e 8 testículos como controle (6 hidroceles e 2 torções). Analisamos as relações entre o testículo e o epidídimo, a patência do processo vaginal e a incidência e histologia dos ATs. Fibras musculares lisas (SMC), tecido conectivo (CT) e fibras do sistema elástico (ESF) foram estudados por métodos imuno-histoquímicos. Dos 72 testículos com criptorquia 20 (27.77%) apresentavam anomalias epididimárias, 41(56.9%) tinham processo vaginal patente e 44 (61.1%) tinham apêndices testiculares. Dos 44 testículos portadores de criptorquia com apêndices, 30 (68.18%) apresentavam o processo vaginal patente e 11 (25%) apresentavam anomalias epididimárias. O epitélio não apresentou alteração aparente nos apêndices de pacientes com criptorquia e no grupo controle. Análise estereológica documentou a prevalência de ESF (média de 1.48%); prevalência de vasos (média de 10,11%) e uma diminuição ($p=0.14$) da SMC nos AT de pacientes com criptorquia (média = 4.93%). O colágeno III prevaleceu nos AT de pacientes com criptorquia. Não houve alteração na incidência de anomalias anatômicas associadas aos testículos portadores de AT. Os apêndices testiculares apresentaram uma alteração estrutural significativa nos pacientes com criptorquia, o que indica que os AT apresentam uma remodelação estrutural significativa nos pacientes com criptorquia

Palavras-chave: Apêndice testicular. Criptorquidia. Morfologia. Anomalia epididimária.

ABSTRACT

This work reports the incidence and structure of testicular appendices (TAs) in patients with cryptorchidism, comparing their incidence with epididymal anomalies and patency of the vaginal process. We studied 55 patients (72 testes) with cryptorchidism and 8 testes as controls (6 with hydroceles and 2 with torsion). We analyzed the relations among the testis, epididymis and patency of the vaginal process and prevalence and histology of the TAs. Smooth muscle cells (SMCs), connective tissue (CT) and elastic system fibers (ESFs) were studied by histochemical and immunolabeling methods. Of the 72 testes with cryptorchidism, 20 (27.77%) presented epididymal anomalies, 41 (56.9%) had patent vaginal processes and 44 (61.1%) had TAs. Of the 44 testes with cryptorchidism and appendices, 30 (68.18%) presented patent vaginal processes and 11 (25%) presented epididymal anomalies. There was no apparent alteration of the epithelium in the appendices of patients with cryptorchidism and in the control group. Stereological analysis documented the prevalence of ESFs (mean of 1.48%), prevalence of veins (mean of 10.11%) and decrease ($p=0.14$) of SMCs in the TAs of patients with cryptorchidism (mean = 4.93%). Collagen III prevailed in the TAs of patients with cryptorchidism. There was no alteration in the incidence of anatomical anomalies associated with the testes with TAs. The testicular appendices presented significant structural alteration in the patients with cryptorchidism, indicating that TAs present a significant structural remodeling in patients with cryptorchidism.

Keywords: Testicular appendices. Cryptorchidism. Morphology. Epididymal anomalies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema mostrando o desenvolvimento embriológico do testículo	12
Figura 2 –	Esquema dos ductos mesonéfricos em processo de diferenciação para vias espermáticas	13
Figura 3 –	Esquema evidenciando as localizações mais comuns dos apêndices testiculares e epididimários	14
Figura 4 –	Desenho esquemático evidenciando a classificação anatômica das relações entre o testículo e o epidídimo	18
Figura 5 –	Desenho esquemático demonstrando o processo vaginal patente e ocluso	19
Figura 6 –	Exemplos dos tipos apêndices testiculares e epididimários encontrados durante a intervenção cirúrgica	20
Figura 7 –	Fotomicrografia demonstrando a análise morfométrica do apêndices testicular	22
Figura 8 –	Análise do epitélio dos apêndices testiculares.....	29
Figura 9 –	Análise das fibras do sistema elástico dos apêndices testiculares	30
Figura 10 –	Análise dos vasos dos apêndices testiculares	31
Figura 11 –	Análise das fibras musculares lisas dos apêndices testiculares	32
Figura 12 –	Análise qualitativa do colágeno dos apêndices testiculares	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados dos pacientes com criptorquia estudados. Estão relacionados a idade, o lado estudado, a posição testicular a relação entre o testículo e o epidídimo, a patência ou não do processo vaginal e o número e tipo de apêndices	23
Tabela 2 –	Dados dos pacientes do grupo controle estudados. Estão relacionados a idade, o lado estudado, a posição testicular a relação entre o testículo e o epidídimo, a patência ou não do processo vaginal e o número e tipo de apêndices.....	25
Tabela 3 –	Incidência dos apêndices paratesticulares estudados em relação a posição dos testículos com criptorquia e no grupo controle	26
Tabela 4 –	Relação entre o tipo de apêndice paratesticular encontrado e a patência do processo vaginal e presença de anomalia epididimária	27

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	OBJETIVOS	15
2	MATERIAL E MÉTODOS	16
3	RESULTADOS	22
3.1	Epitélio	26
3.2	Sistema de Fibras Elástico	26
3.3	Vasos	27
3.4	Músculo liso	27
3.5	Colágeno	27
4	DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICE A – Structural analysis of testicular appendices in patients with cryptorchidism	38
	ANEXO A – Submissão do artigo	54
	ANEXO B - Comitê de ética em pesquisa	55
	ANEXO C – Termo de consentimento	56

INTRODUÇÃO

A primeira indicação de desenvolvimento gonadal ocorre na quinta semana de gestação, quando surge um espessamento do epitélio celomático na região medial do mesonefro, a crista genital. Neste local, cordões epiteliais (cordões sexuais primários) crescem para o interior do mesênquima subjacente, iniciando a formação da gônada indiferenciada (1,2). (Figura 1)

As extremidades superiores dos ductos paramesonéfricos seriam responsáveis pela formação das hidátides sésseis de Morgagni, identificadas nos pólos superiores do testículo e atualmente denominadas de apêndices testiculares ou hidátide séssil de Morgagni (3). A parte do ducto mesonéfrico, cranial ao testículo pode formar a hidátide pediculada de Morgagni, atualmente conhecida como apêndice epididimário. (Figura 2)

Outras estruturas vestigiais derivadas desta porção do ducto mesonéfrico são os “órgãos de Haller”, localizados na fissura entre o testículo e o epidídimo, que são um grupo de vasos aberrantes superiores e inferiores, e o “órgão de Giraldes”, chamado de paradídimo ou corpo inominado, e localizado na porção distal do cordão espermático (4). (Figura 3)

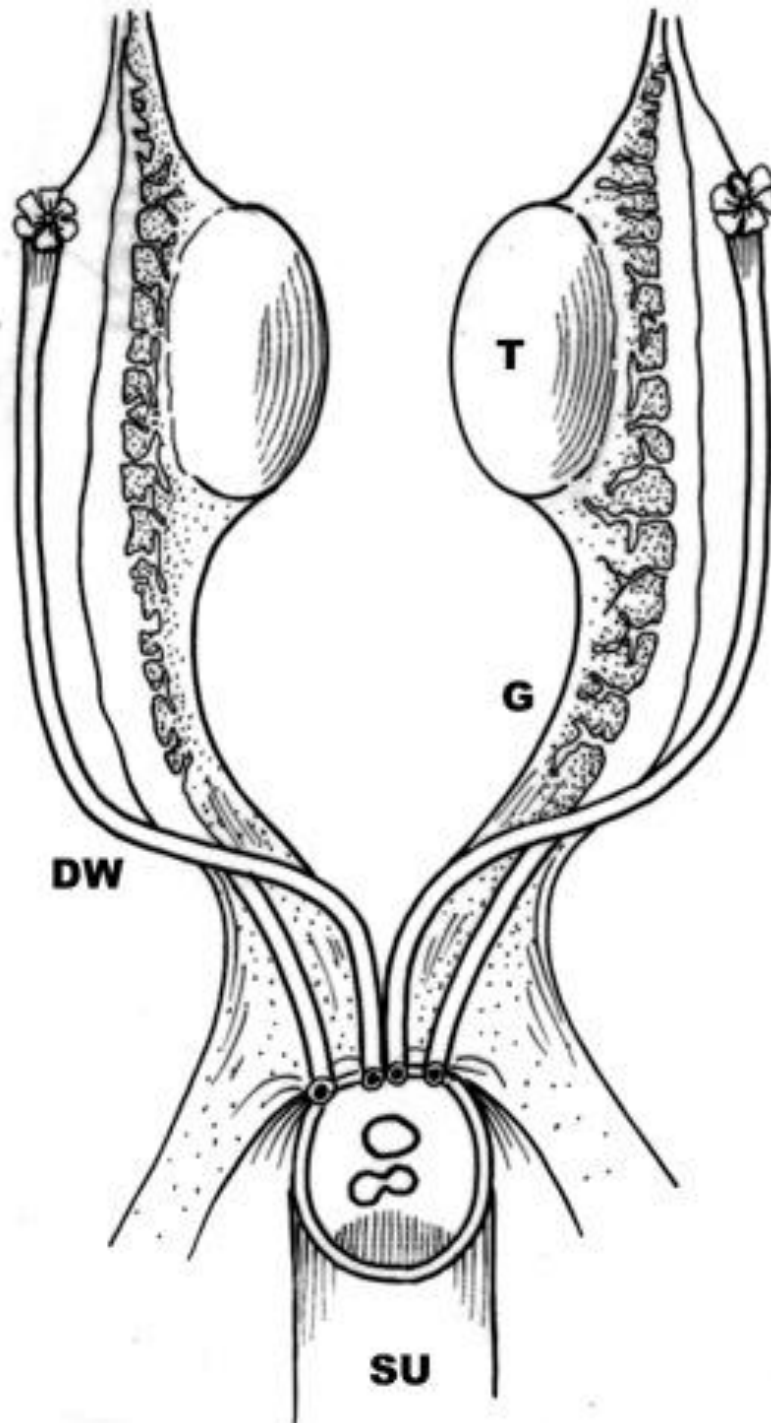


Figura 1: Esquema mostrando o desenvolvimento embriológico do testículo (baseado no trabalho de Netter, 1978).

Legenda: T = Testículo; G = Gubernáculo; SU = Seio Urogenital e DW = Ducto de Wolff.

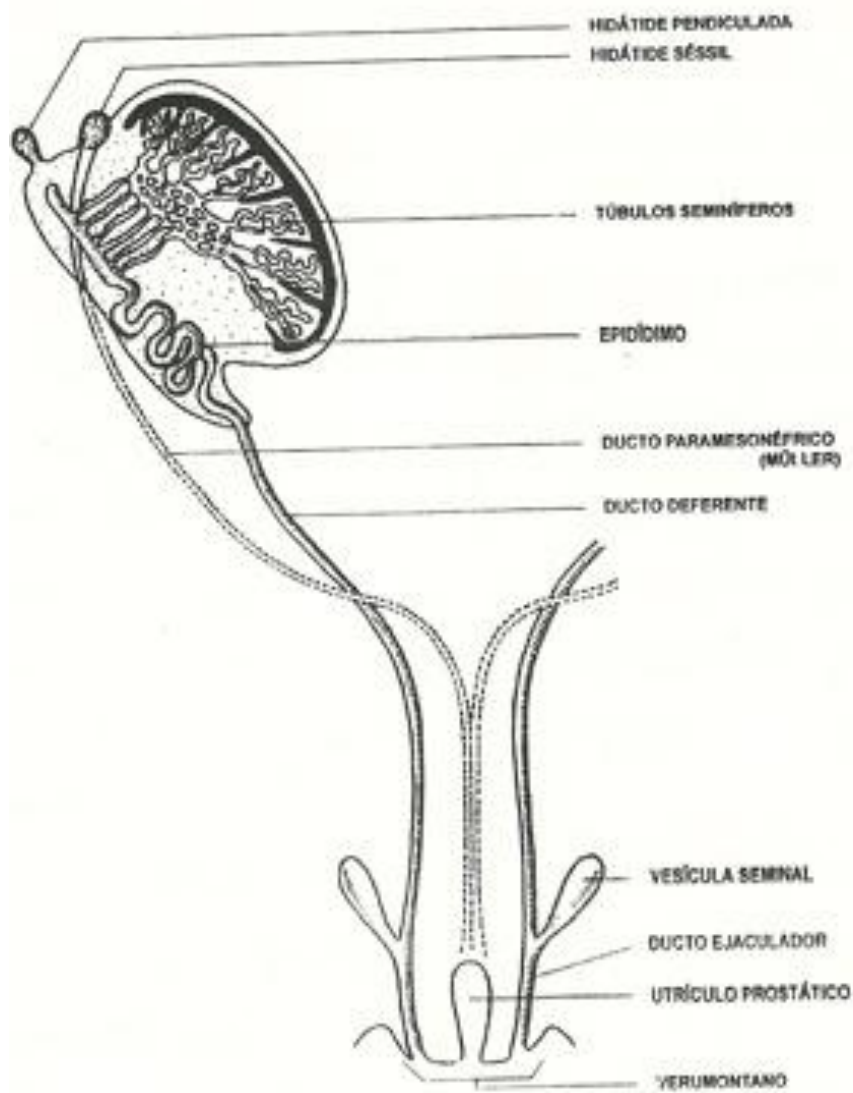


Figura 2: Esquema dos ductos mesonéricos em processo de diferenciação para vias espermáticas, baseado no trabalho de Queiroz e Silva – 1997.

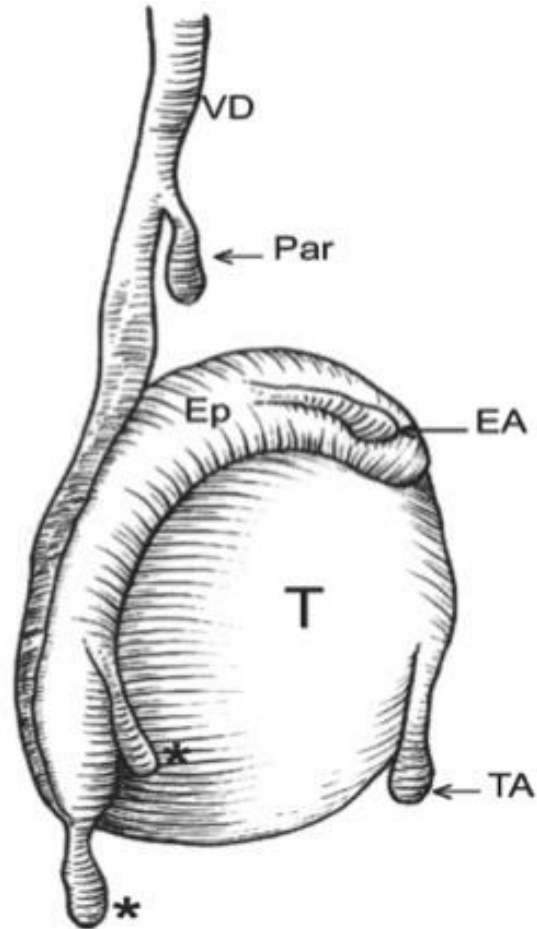


Figura 3 : Esquema evidenciando as localizações mais comuns dos apêndices testiculares e epididimários. (Ilustração baseada em Rolnick D - 1968.)

Legenda: TA = apêndice testicular, EA = apêndice epididimário, Ep = epidídimo, Par = paradídimo , VD = ducto deferente, Asteriscos = “órgãos de Haller”., T = testículo

Os apêndices testiculares e epididimários já foram considerados anomalias anatômicas (5), no entanto, alguns estudos relatam que essas estruturas estão presentes na maioria dos indivíduos normais (4). Esses apêndices, quando são muito longos e de formato pediculado, podem torcer sobre o próprio eixo causando muita dor e simulando torção do cordão espermático (6,7). Existem também relatos de tumores originados nestas estruturas (8).

As funções dos apêndices testiculares são controversas: podem controlar a quantidade de líquido seroso no espaço da túnica vaginal (9). Outra hipótese sugerida é que a superfície do epitélio, os capilares subepiteliais e os vasos linfáticos formam um unidade funcional (10).

Existem estudos que analisam a embriologia e a estrutura dos apêndices testiculares e epididimários na literatura (4,8). O estudo da incidência dessas estruturas em pacientes com criptorquia e a comparação destes achados com indivíduos sem anomalias de posição testicular são raros (9). A análise estrutural dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia são raras na literatura.

1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar a incidência dos apêndices testiculares e epididimários em pacientes com criptorquia.

Correlacionar a sua incidência com as anomalias epididimárias e a patência do processo vaginal.

Analisar se há alteração da estrutura dos apêndices testiculares na criptorquia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da UERJ e realizado em conformidade com os padrões éticos do comitê institucional de experimentação humana. (Anexo B)

Foram analisados 72 testículos provenientes de 55 pacientes portadores de criptorquia, sendo que 17 apresentaram criptorquia bilateral. Estudamos como grupo controle 8 testículos provenientes de 6 pacientes com hidrocele e 2 pacientes com torção testicular. Os pacientes com criptorquia tinham idade entre 1 e 13 anos (média de 6 anos) e os do grupo controle 1 e 34 anos (média de 14 anos). Analisamos nos dois grupos as relações entre o testículo e o epidídimo, a patência do processo vaginal, a incidência e a histologia dos apêndices testiculares.

Para análise das relações entre o testículo e o epidídimo durante a cirurgia, utilizamos a classificação de Scorer e Farrington (1971) modificada (13,14) (Figura 4). Segundo essa classificação, existem seis tipos de relação entre o testículo e o epidídimo: Tipo I - epidídimo unido ao testículo pela cabeça e pela cauda; Tipo II - epidídimo totalmente unido ao testículo; Tipo III - epidídimo unido ao testículo apenas pela cabeça; Tipo IV - epidídimo unido ao testículo apenas pela cauda; Tipo V - disjunção total entre o testículo e o epidídimo; Tipo VI - atresia epididimária. As relações do tipo I e II são consideradas normais e as classificações do tipo III, IV, V e VI são consideradas anomalias anatômicas (15).

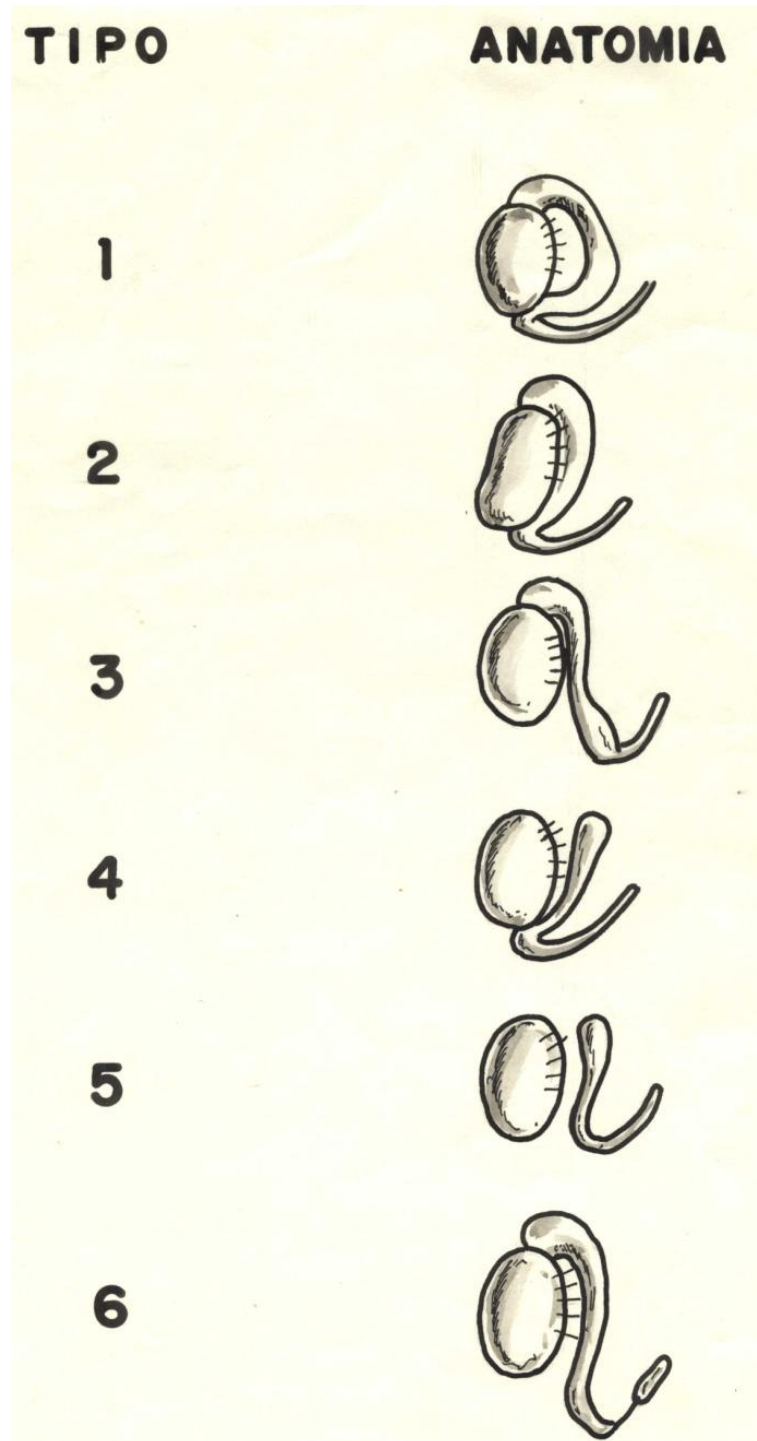


Figura 4 : Desenho esquemático evidenciando a classificação anatômica das relações entre o testículo e o epidídimo, onde o tipo I mostra o epidídimo unido ao testículo pela cabeça e pela cauda; o tipo II evidencia o epidídimo totalmente unido ao testículo; o tipo III evidencia o epidídimo unido ao testículo apenas pela cabeça; o tipo IV mostra o epidídimo unido ao testículo apenas pela cauda; o tipo V demonstra a existência de disjunção total entre o testículo e o epidídimo e o tipo VI evidencia a presença de atresia epididimária. Baseado no trabalho de Turek (14).

Para analisar a estrutura do processo vaginal consideramos duas situações: (a) patência do processo vaginal entre o anel inguinal interno e o pólo superior do testículo e (b) obliteração completa do processo vaginal.(Figura 5)

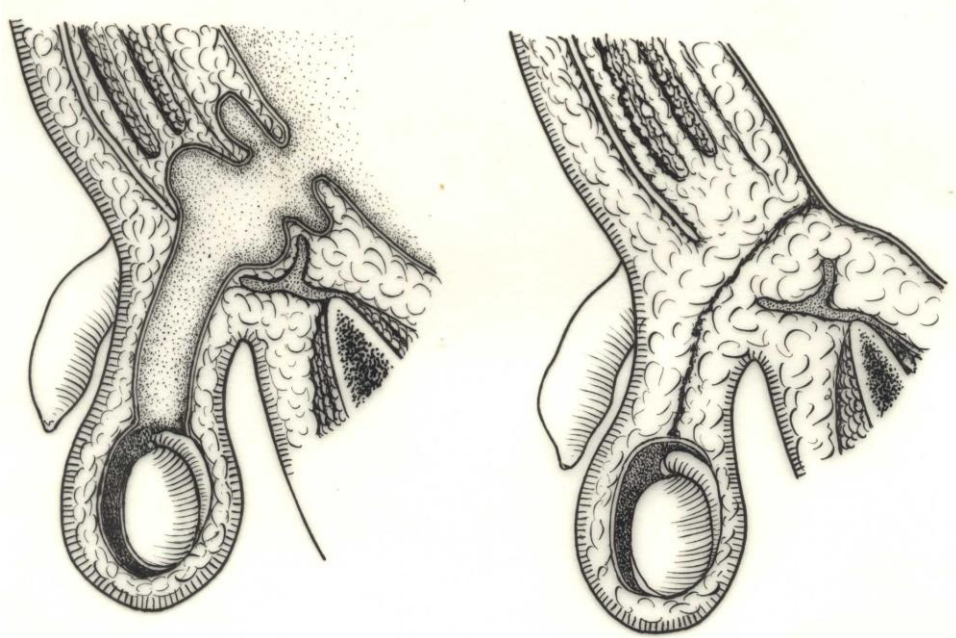


Figura 5 : Desenho esquemático demonstrando o processo vaginal patente (esquerda) e ocluído (direita). Baseado em Testut e Latarjet.

Em relação aos apêndices testiculares, analisamos as situações a seguir nos 2 grupos durante as cirurgias: I) ausência de apêndices testicular e do epidídimo, II) apenas presença de apêndice testicular, III) apenas presença de apêndice do epidídimo, IV) presença de apêndice testicular e do epidídimo, V) presença de 2 apêndices epididimários e um apêndice testicular, VI) presença de paraepidídimo ou vas aberrans de Haller. (Figura 6)



Figura A

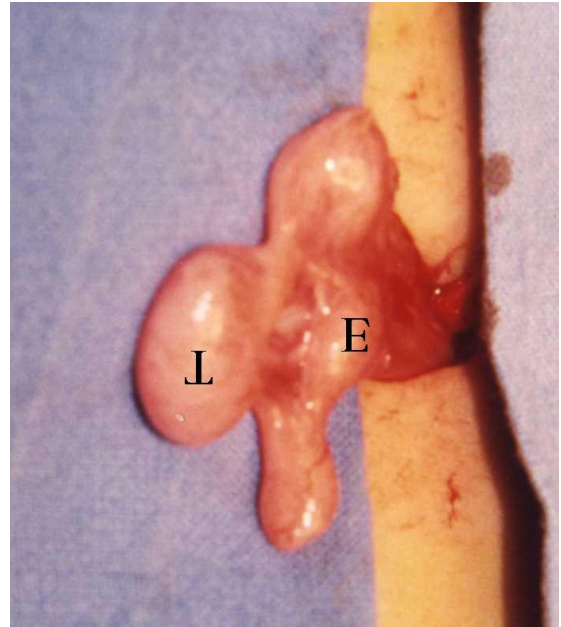


Figura B



Figura C

Figura 6: Fotomacrografias :exemplos dos tipos de apêndices testiculares e epididimários encontrados durante a intervenção cirúrgica.

Legenda: A) Paciente de 3 anos de idade com a presença de apêndice epididimário. B) Paciente de 1 ano de idade apresentando disjunção entre o testículo e o epidídimo sem a presença de apêndices. C) Paciente de 3 anos de idade com a presença de apêndice testicular.

* = apêndice epididimário, □ = apêndice testicular

Os apêndices foram separados das outras estruturas, fixados em formol tamponado a 10%, processados para inclusão em parafina, e foram obtidos cortes com 5µm de espessura em intervalos de 200µm. Células musculares lisas, tecido conjuntivo e fibras do sistema elástico foram estudados por métodos histoquímicos e imunomarcção.

Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para avaliar a integridade do tecido. Foi realizada a coloração seguinte: Masson, a fim de quantificar o tecido conjuntivo e músculo liso e Weigert resorcina fucsina com oxidação prévia, a fim de observar as fibras do sistema elástico. Tecido conjuntivo, células musculares lisas e fibras do sistema elástico foram quantificados por um método digital (17). Cinco seções por amostra foram coradas e cinco campos de cada seção foram selecionados. Todos os campos selecionados foram fotografados com uma câmera Olympus DP70 acoplada a um microscópio Olympus BX51. As imagens foram processadas e salvas com o software Pro Image. O tecido foi quantificado usando o software Image J para determinar a densidade de área (Ad) de cada componente (17). (Figura 7)

Imunomarcção foi realizada para confirmar os resultados. Para as células musculares lisas (SMC) foi utilizado o marcador Monoclonal Antibody Alfa Actina 08-0106 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, Estados Unidos). Para confirmar os resultados para fibras elásticas (FE) foi utilizado Anticorpo Monoclonal Elastina ab 9519 (Abcam Laboratories, Cambridge, MA, Estados Unidos).

Os resultados foram organizados em tabelas utilizando o Excel para realização das análises estatísticas. As médias e o desvio padrão foram estatisticamente comparadas usando o teste t não pareado e a regressão linear foi realizada quando aplicável. Relevância estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

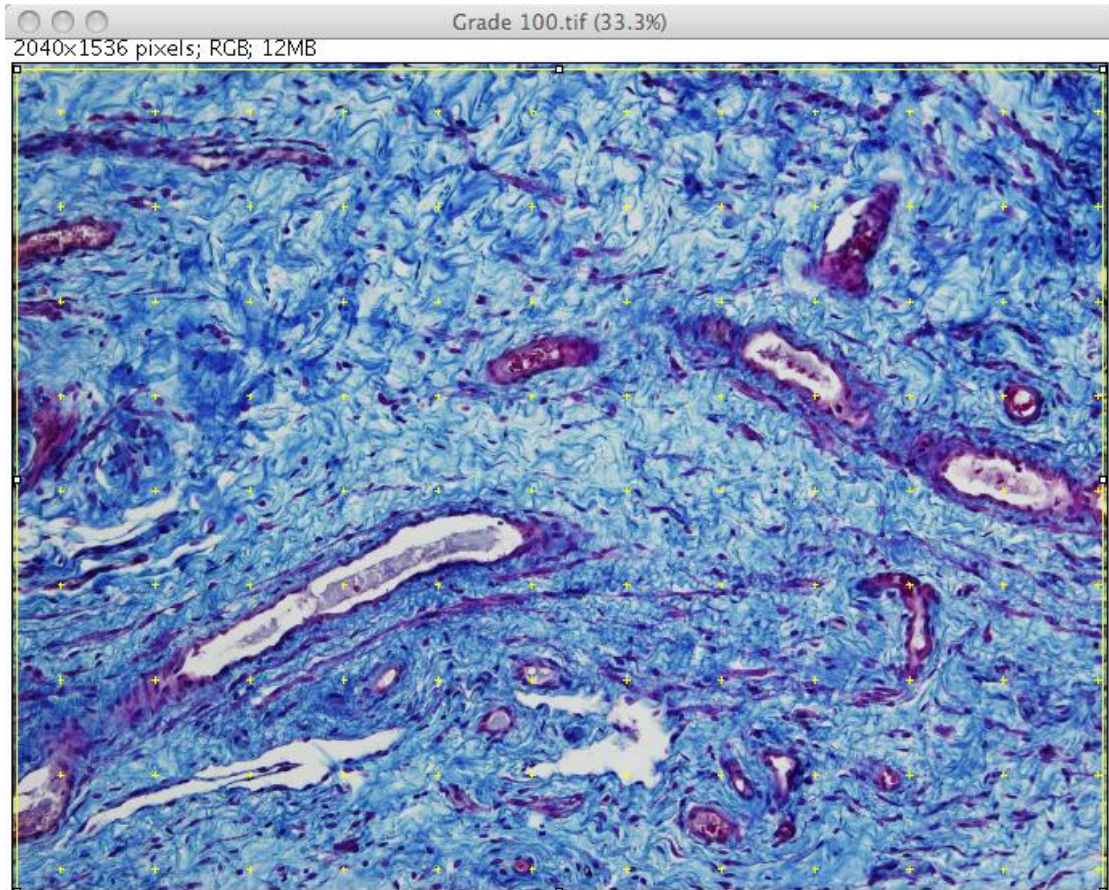


Figura 7 : Fotomicrografia demonstrando a análise morfométrica do apêndice testicular. Quantificação das células musculares lisas do apêndice testicular de um paciente com criptorquia de 3 anos de idade usando o software Image J Test grid. Tricrômico de Masson x400.

3 RESULTADOS

Os dados de todos os pacientes estudados podem ser vistos nas tabelas 1 e 2. As tabelas evidenciam a idade, o lado estudado, a posição testicular, a relação entre o testículo e o epidídimo, a patência ou não do processo vaginal e o número e tipo de apêndices.

Tabela 1: A tabela evidencia os dados dos pacientes estudados com criptorquia. Estão relacionados a idade, o lado estudado, a posição testicular, a relação entre o testículo e o epidídimo, a patência ou não do processo vaginal e o número e tipo de apêndices.

Idade	Lado	Posição Testicular	Relação Test/Epid.	Patência P.Vaginal	Apêndices	Patologia
3	Esquerdo	Abdominal	II	Sim	1 tes/1 epid	Criptorquia
3	Direito	Abdominal	III	Sim	1 epid	Criptorquia
6	Esquerdo	Abdominal	I	Sim	0	Criptorquia
9	Direito	Abdominal	IV	Sim	1 epid	Criptorquia
1	Direita	Abdominal	II	Sim	0	Criptorquia
11	Esquerdo	Abdominal	II	Sim	1 test	Criptorquia
5	Direito	Abdominal	I	Sim	0	Criptorquia
1	Esquerdo	Canal inguinal	V	Sim	0	Criptorquia
2	Esquerdo	Canal inguinal	III	Sim	0	Criptorquia
2	Direito	Canal inguinal	I	Sim	1 tes/1 epid	Criptorquia
2	Direito	Canal inguinal	II	Não	0	Criptorquia
3	Direito	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
3	Direito	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
3	Esquerdo	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia
4	Esquerdo	Canal inguinal	III	Sim	1 test	Criptorquia
4	Esquerdo	Canal inguinal	III	Sim	0	Criptorquia
5	Esquerdo	Canal inguinal	II	Sim	0	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	III	Sim	1 epid	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	II	Não	0	Criptorquia
6	Direito	Canal inguinal	II	Não	0	Criptorquia
8	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
8	Esquerdo	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia
9	Direito	Canal inguinal	III	Sim	1 tes/1 epid	Criptorquia

(Continua)

(Continuação)						
9	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 epid	Criptorquia
9	Direito	Canal inguinal	III	Não	0	Criptorquia
10	Esquerdo	Canal inguinal	IV	Sim	1 tes/1 epid	Criptorquia
11	Direito	Canal inguinal	II	Sim	0	Criptorquia
12	Esquerdo	Canal inguinal	II	Não	0	Criptorquia
13	Esquerdo	Canal inguinal	II	Sim	0	Criptorquia
13	Esquerdo	Canal inguinal	II	Não	1 test	Criptorquia
2	Direito	Canal inguinal	IV	Não	0	Criptorquia
7	Direito	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia
13	Esquerdo	Canal inguinal	III	Sim	1 test	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	III	Não	1 epid	Criptorquia
4	Direito	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
4	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
4	Direito	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
4	Esquerdo	Canal inguinal	IV	Sim	1 test	Criptorquia
6	Direito	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
6	Direito	Canal inguinal	V	Não	0	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	V	Sim	0	Criptorquia
1	Direito	Canal inguinal	I	Sim	0	Criptorquia
1	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	0	Criptorquia
6	Direito	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia
8	Direito	Canal inguinal	III	Não	0	Criptorquia
8	Esquerdo	Canal inguinal	III	Não	0	Criptorquia
9	Direito	Canal inguinal	IV	Não	0	Criptorquia
9	Esquerdo	Canal inguinal	I	Não	0	Criptorquia
9	Direito	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia
9	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
9	Direito	Canal inguinal	V	Não	1 test	Criptorquia
9	Esquerdo	Canal inguinal	II	Sim	1 tes/1 epid	Criptorquia
3	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
5	Esquerdo	Canal inguinal	IV	Não	0	Criptorquia
1	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 test	Criptorquia
1	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	1 epid	Criptorquia
12	Direito	Canal inguinal	I	Não	0	Criptorquia
6	Esquerdo	Canal inguinal	I	Não	1 test	Criptorquia

						(Conclusão)
3	Esquerdo	Canal inguinal	I	Sim	0	Criptorquia
4	Esquerdo	Supra escrotal	V	Sim	1 test	Criptorquia
2	Direito	Supra escrotal	I	Não	1 tes/1 epid	Criptorquia
2	Esquerdo	Supra escrotal	I	Não	1 tes/1 epid	Criptorquia
3	Direito	Supra escrotal	II	Não	1 test	Criptorquia
1	Direito	Supra escrotal	I	Sim	1 test	Criptorquia
1	Direito	Supra escrotal	I	Sim	1 test	Criptorquia
12	Esquerdo	Supra escrotal	II	Não	0	Criptorquia
9	Direito	Supra escrotal	I	Sim	1 test	Criptorquia
9	Esquerdo	Supra escrotal	I	Sim	1 test	Criptorquia
6	Direito	Supra escrotal	I	Não	1 test	Criptorquia
3	Direito	Supra escrotal	I	Não	0	Criptorquia

Tabela 2: A tabela evidencia os dados dos pacientes do grupo controle estudados. Estão relacionados a idade, o lado estudado, a posição testicular, a relação entre o testículo e o epidídimo, a patência ou não do processo vaginal e o número e tipo de apêndices.

Idade	Lado	Posição Testicular	Relação Test/Epid.	Patência P.Vaginal	Apêndices	Patologia
29	Direito	Bolsa escrotal	II	Não	1 test	Hidrocele
2	Direito	Bolsa escrotal	I	Não	1 test	Hidrocele
15	Direito	Bolsa escrotal	II	Não	0	Hidrocele
11	Esquerdo	Bolsa escrotal	II	Não	1 epid	Hidrocele
34	Esquerdo	Bolsa escrotal	I	Não	1 epid	Hidrocele
1	Esquerdo	Bolsa escrotal	I	Não	1 test	Hidrocele
14	Esquerdo	Bolsa escrotal	IV	Não	1 tes/1 epid	Torção
13	Direito	Bolsa escrotal	I	Sim	1 test	Torção

Dos 72 testículos com criptorquia, 7 eram abdominais (9,7%), 54 (75%) estavam localizados no canal inguinal e 11 (15,3%) eram supra-escrotais. Dos testículos com criptorquia, 22 (30,5%) apresentaram anomalias epididimárias, 43 (59,7%) tinham processo vaginal patente e 44 (61,1%) tinham apêndices testiculares. A incidência dos apêndices testiculares nos testículos com criptorquia e sua relação com a posição testicular está evidenciada na Tabela 3. Não houve diferença estatística significativa em relação a localização dos apêndices ($p=0.0652$).

Tabela 3 – A tabela evidencia a incidência dos apêndices paratesticulares estudados em relação a posição dos testículos com criptorquia e no grupo controle.

Apêndices	ABDOME	CANAL	SUPRA- ESCROTAL	CONTROLE
Sem apêndice	03 (42%)	23(42%)	02 (18%)	01 (12%)
Ap. Testicular	01 (15%)	23(42%)	07 (64%)	04 (50%)
AP. Epididimário	02 (28%)	04 (16%)	0 (0%)	02 (25%)
AP. Testicular e Epididimário	01 (15%)	04 (16%)	02 (18%)	01 (12%)
Total	07	54	11	08

Dos 7 testículos abdominais, todos tinham o processo vaginal patente e 4 (57%) tinham apêndices testiculares e epididimários. Dos 54 testículos localizados no canal, 31 (57%) tinham apêndices, sendo que destes, 21 (38,8%) apresentaram o processo vaginal patente e 19 (35,8%) eram portadores de anomalias epididimárias. Dos 11 casos de testículos supra-escrotais, 9 tinham apêndices (82%), 5 (55,5%) apresentaram patência do processo vaginal e 1 (11,1%) apresentou anomalia epididimária. Dos 8 casos do grupo controle, 7 tinham apêndices (87,5%), 1 (14,3%) apresentou anomalia epididimária e 1 (14,3%) tinha o processo vaginal patente .

Dos 44 testículos portadores de criptorquia com apêndices, 30 (68,2%) apresentaram o processo vaginal patente e 11 (25%) tinham anomalias epididimárias. A relação entre o tipo de apêndice testicular encontrado com a patência do processo vaginal e a presença de anomalias epididimárias está evidenciada na Tabela 4. Dos 55 pacientes, 17 tinham criptorquia bilateral, totalizando 34 testículos. Destes, 1 era abdominal, 24 estavam localizados no canal e 9 eram supra-escrotais. Dos 34 testículos deste grupo, 25 (73,5%) eram portadores de apêndices testiculares, sendo 13 no testículo direito e 12 no testículo esquerdo, sem significância estatística.

Tabela 4 – A tabela evidencia a relação entre o tipo de apêndice paratesticular encontrado e a patência do processo vaginal e presença de anomalia epididimária.

Apêndices	Vaginal patente	Anomalia epididimaria
Testicular (31)	20 (68%)	05 (46%)
Epididimário (06)	05 (16%)	04 (36%)
Testicular e Epididimário (07)	05 (16%)	02 (18%)
Total	30	11

3.1 Epitélio

Nos apêndices testiculares corados com Masson foi demonstrado um estroma vascular revestido por epitélio pseudocolunar. O estroma consistia de tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sangüíneos, fibroblastos e números variados de ácidos (*gland-like structures*), que foram revestidos por epitélio colunar não ciliado (Figura 8A). Os apêndices epididimários eram vistos como estruturas vesiculares. A cavidade da vesícula foi revestida por epitélio colunar pseudoestratificado (Figura 8B). Como podemos observar, o epitélio não apresentou alteração aparente nos apêndices de pacientes com criptorquia e no grupo controle. (Figura 8C) .

3.2 Sistema de fibras elástico

A análise estereológica mostrou o aumento de fibras elásticas nos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia (média de 1,48%) quando comparado com os apêndices dos pacientes com hidrocele (média de 0,29%), sem diferença estatística ($p=0.22$). Na figura 9, observamos os apêndices testiculares dos pacientes com criptorquia e do grupo controle corados com Resorcina-Fucsina de Weigert com oxidação. Podemos observar uma maior quantidade de fibras do sistema elástico nos pacientes com criptorquia.

3.3 Vasos

A análise estereológica mostrou o aumento de vasos nos apêndices testiculares dos pacientes com criptorquia (média de 10,11% e desvio padrão de 6,88) em relação aos pacientes do grupo controle (média de 4,77% e desvio padrão 1,9), com prevalência estatística ($p < 0.001$). Na figura 10, observamos os apêndices testiculares dos pacientes com criptorquia e do grupo controle corados com Masson. Podemos observar uma maior quantidade de vasos nos pacientes com criptorquia.

3.4 Músculo liso

A análise estereológica documentou uma diminuição ($p = 0,14$) do músculo liso nos apêndices de pacientes com criptorquia (média = 4,93%) em relação ao normal (média = 9,03%). Na figura 11, podemos observar fotomicrografias onde se compara o arranjo do músculo liso no criptorquia e os apêndices grupo controle.

3.5 Colágeno

A análise qualitativa do colágeno tipo III foi observado nos dois grupos e este prevaleceu nos apêndices testiculares de pacientes com criptorquia. Observamos uma prevalência do colágeno tipo I em pacientes do grupo controle. Na figura 12, podemos observar exemplos dos dois grupos corado pelo Picrosirius Red com luz polarizada. A fotomicrografia mostrou uma grande diferença de cores entre os dois grupos. Essa diferença sugere mudança na organização do colágeno.

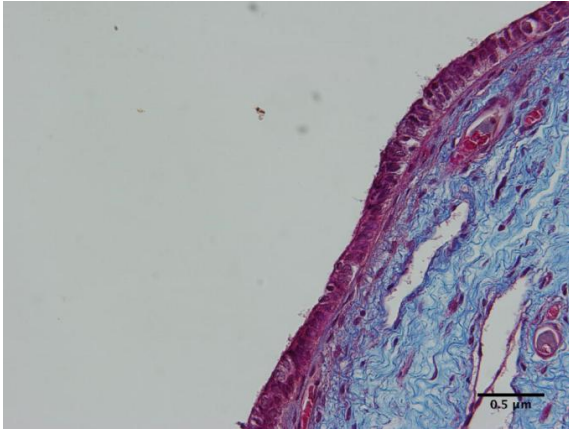


Figura A

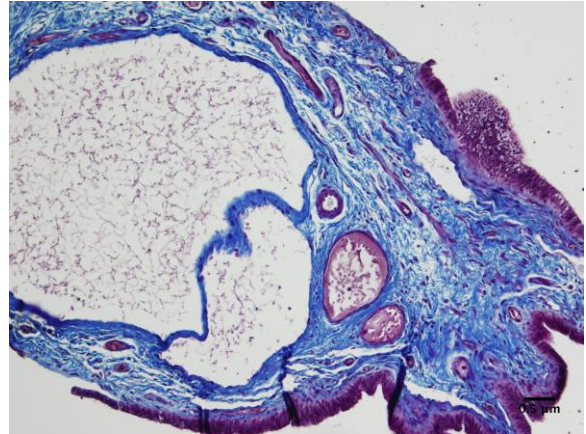


Figura B

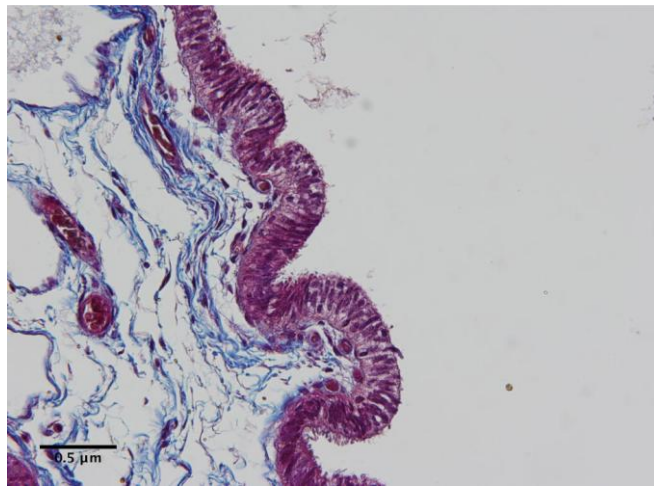


Figura C

Figura 8: Fotomicrografia com análise do epitélio dos apêndices testiculares.

Legenda: A) Paciente 13 anos de idade com criptorquia, podemos observar o epitélio pseudoestratificado do apêndice testicular íntegro. Tricrômico de Masson x200. B) Paciente 13 anos de idade com torção, podemos observar o apêndice epididimário com uma cavitação revestida por epitélio em seu interior pseudoestratificado. Tricrômico de Masson x200. C) Paciente 13 anos de idade com hidrocele, podemos observar o epitélio pseudoestratificado do apêndice testicular íntegro. Tricrômico de Masson x200.

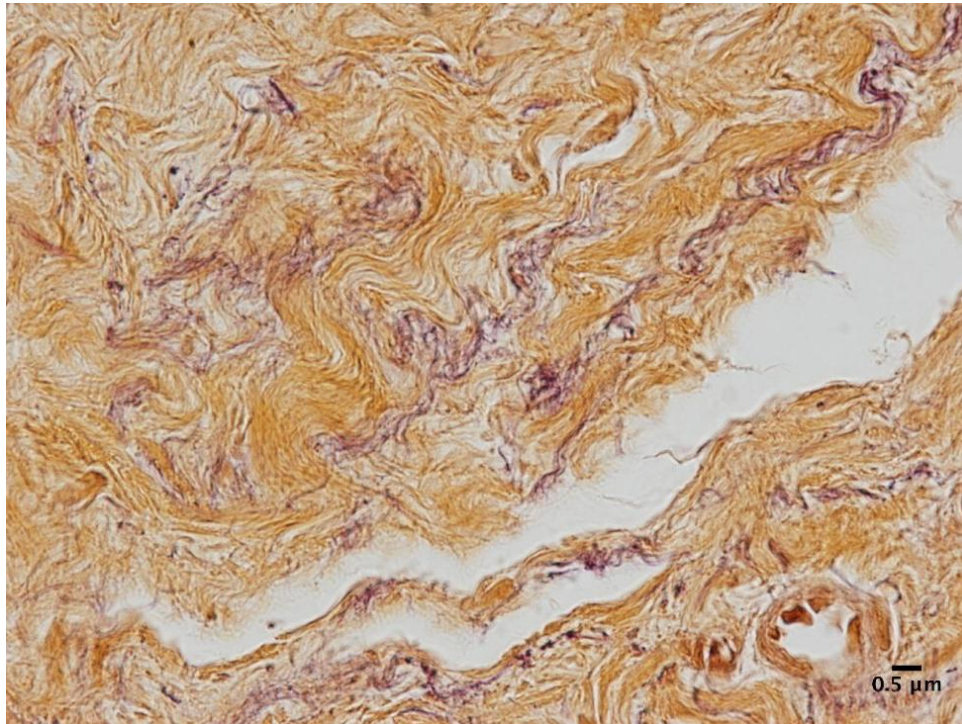


Figura A

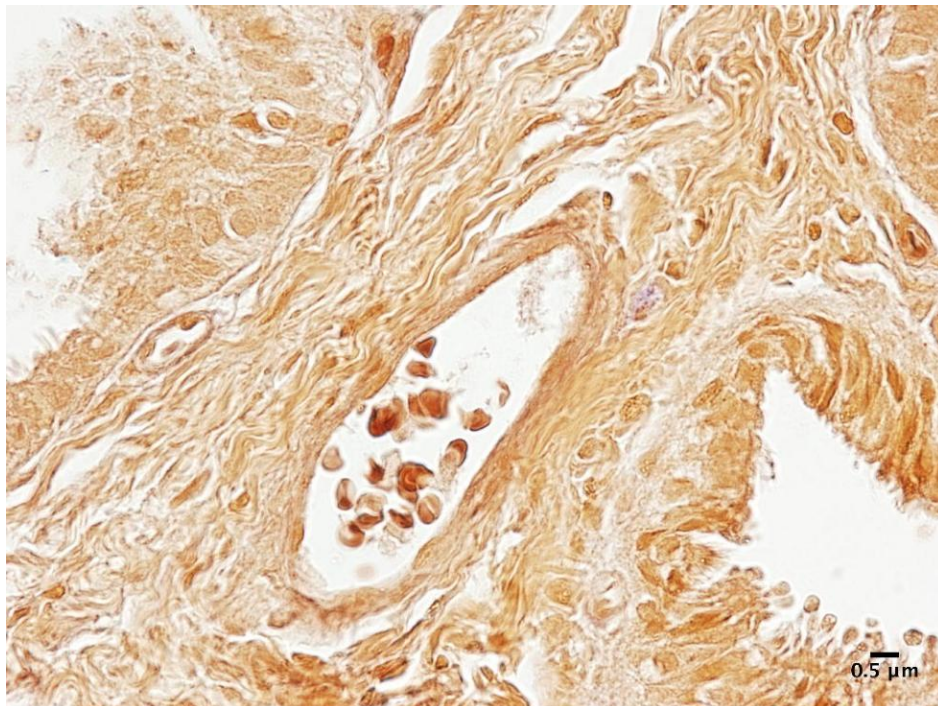


Figura B

Figura 9 : Fotomicrografia para análise das fibras do sistema elástico dos apêndices testiculares.

Legenda: A) Apêndice testicular de paciente com 13 anos apresentando criptorquia. Weigert x400. B) Apêndice testicular de paciente com 13 anos do grupo controle. Weigert x400. Nota-se aumento acentuado das fibras elásticas (marrom) no paciente com criptorquia, quando comparado ao grupo controle.

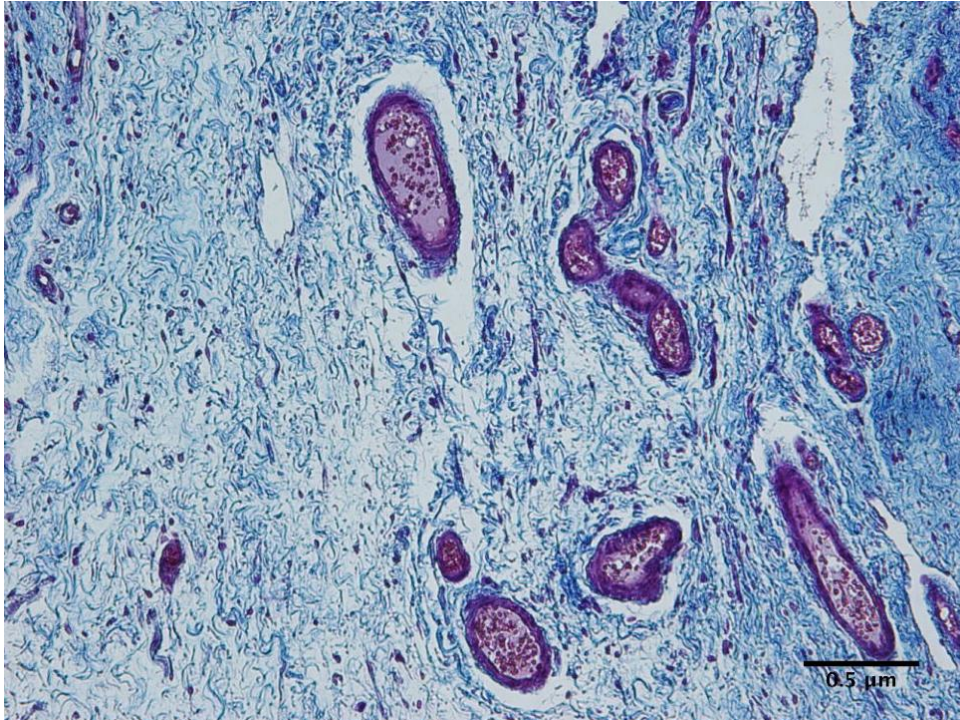


Figura A

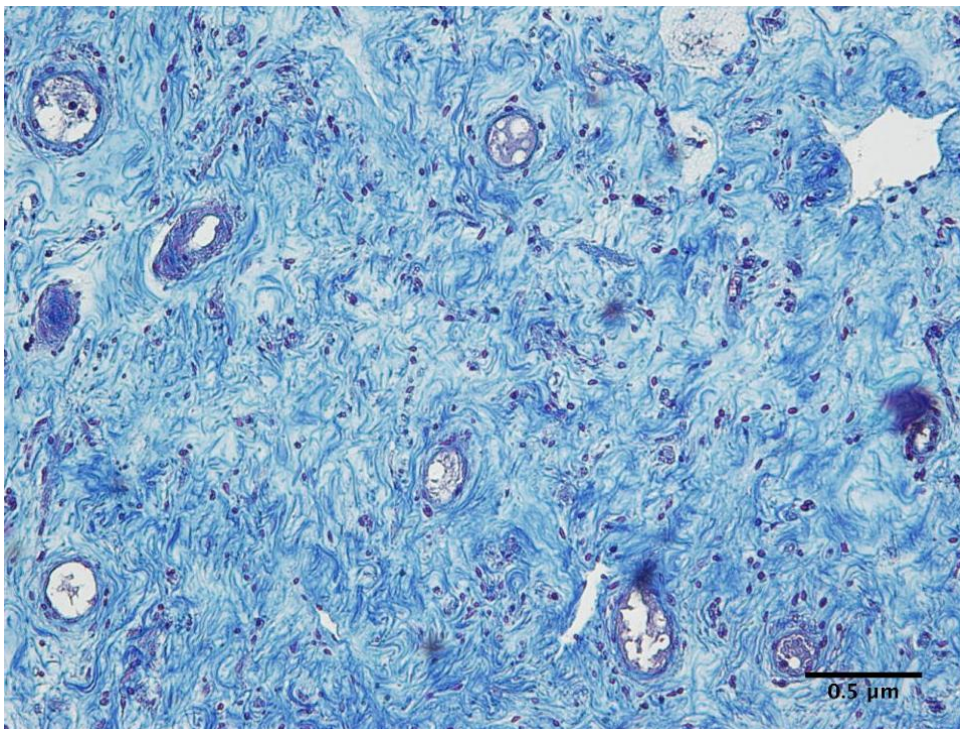


Figura B

Figura 10 : Fotomicrografia para análise dos vasos dos apêndices testiculares.

Legenda: A) Apêndice testicular do paciente com criptorquia com 2 anos de idade. Tricrômico de Masson X200.
B) Apêndice testicular de pacientes do grupo controle com 1 ano de idade. Tricrômico de Masson X200.
Podemos notar o aumento acentuado de vasos no apêndice do paciente com criptorquia.

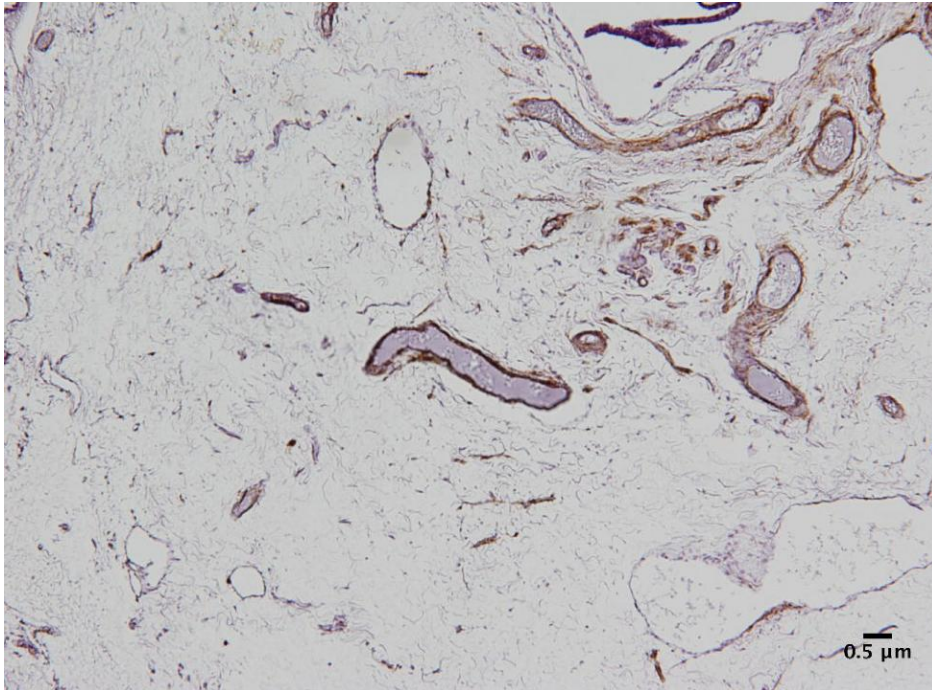


Figura A

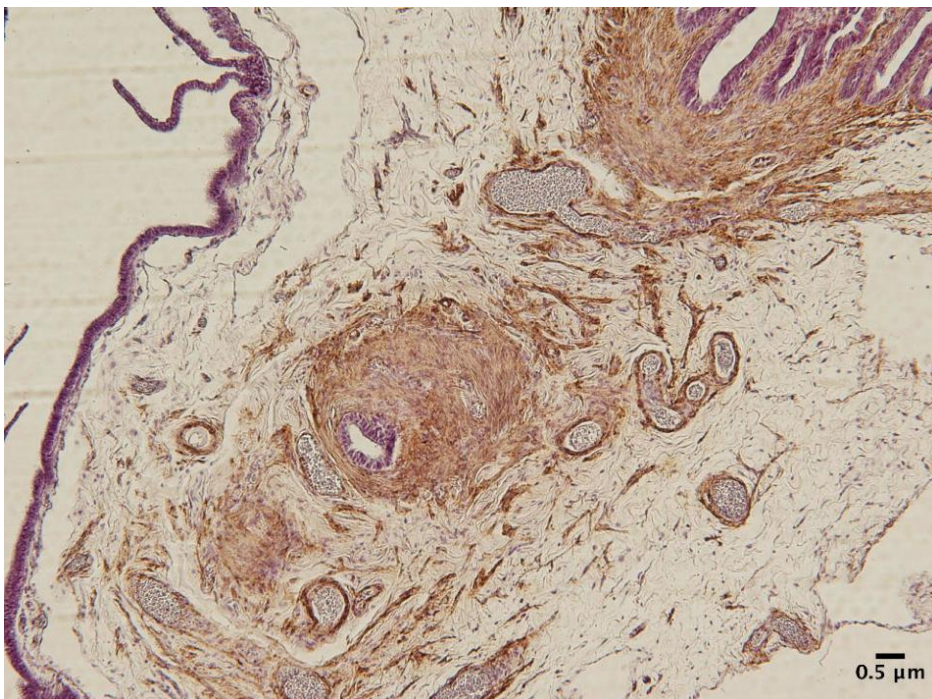


Figura B

Figura 11: Fotomicrografia para análise das fibras musculares lisas dos apêndices testiculares. Legenda: A) Apêndice testicular de paciente com criptorquia com 3 anos de idade. Imuno-histoquímica de alfa actina X200. B) Apêndice testicular de paciente do grupo controle com 11 anos. Imuno-histoquímica de alfa actina X200. Nota-se aumento acentuado da SMC no apêndice do grupo controle quando comparado ao paciente com criptorquia.

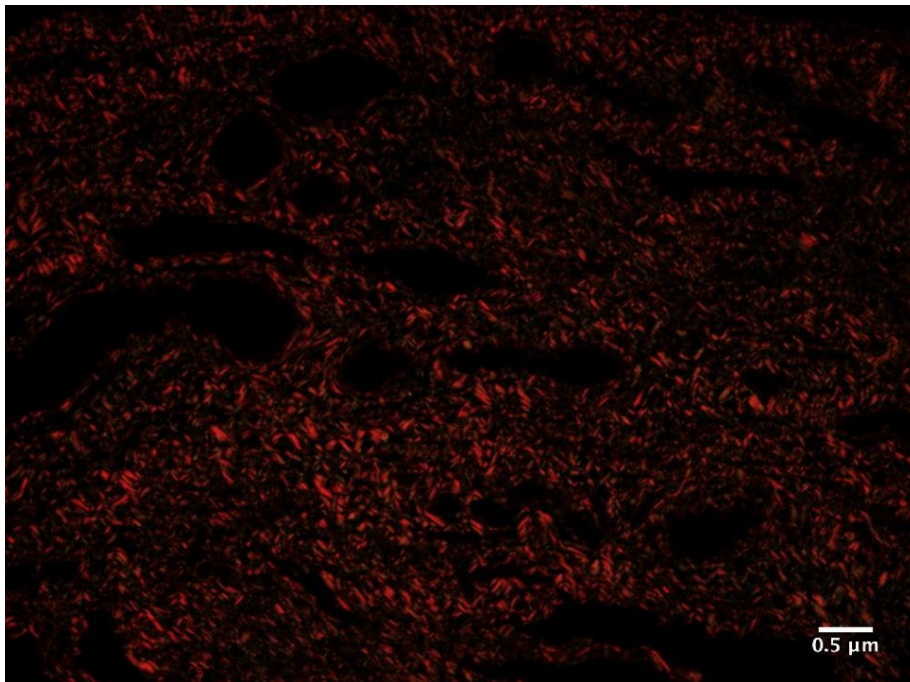


Figura A

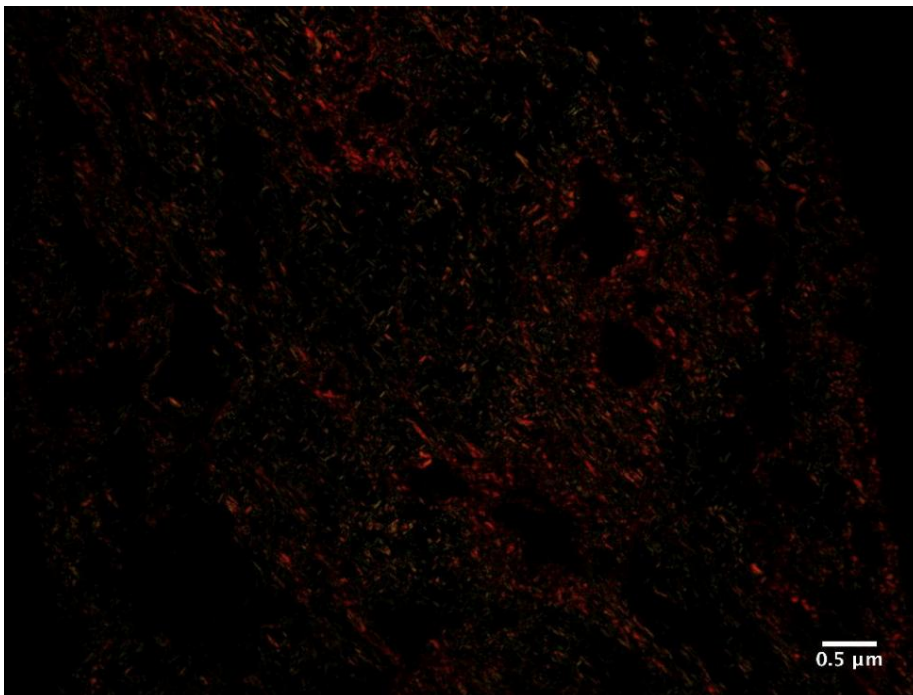


Figura B

Figura 12 : Análise qualitativa do colágeno dos apêndices testiculares.

Legenda: A) Apêndice testicular do paciente com criptorquia com 3 anos de idade, mostrando uma prevalência da cor laranja. Picrosirius red com luz polarizada X400. B) Apêndice testicular de paciente do grupo controle com 11 anos de idade, mostrando uma prevalência de cor esverdeada. Picrosirius red com luz polarizada X400.

4 DISCUSSÃO

O conhecimento da presença, da forma e da localização dos apêndices testiculares e epididimários apresenta importância na prática clínica, em virtude da possibilidade de torção dessas estruturas, da associação com anomalias anatômicas e da incidência de tumores (4, 8, 18).

A criptorquia é uma das patologias congênitas mais comuns no sexo masculino, com uma incidência de 2 a 5% nos nascimentos a termo, que pode chegar a 30% nos nascimentos prematuros (19). A incidência e a análise da estrutura dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia e sua relação com as anomalias epididimárias e a patência do processo vaginal são pouco estudadas na literatura (13).

Estudos prévios demonstraram que os apêndices testiculares apresentam uma incidência significativamente menor nos pacientes portadores de criptorquia, o que poderia indicar um possível papel dos apêndices testiculares no processo de migração testicular (22). Em nosso estudo, 61,1% dos testículos com criptorquia apresentaram apêndices testiculares, um número bem maior do que os 24% relatados por Józsa (22). Não encontramos diferença significativa no número de apêndices nos testículos com criptorquia em relação ao grupo controle, nem na incidência de apêndices em relação à posição testicular nos pacientes com criptorquia.

A criptorquia pode estar associada a anomalias anatômicas e as mais frequentes são as anomalias epididimárias e a patência do processo vaginal (23). As anomalias epididimárias estão associadas à criptorquia com uma incidência que varia de 36 a 79% (24). Em nosso estudo encontramos 27,7% dos testículos com criptorquia portadores de anomalias epididimárias e 56,9% com processo vaginal patente. Dos 44 testículos com apêndices testiculares, 68,18% tinham o processo vaginal patente e 25% apresentaram anomalias epididimárias. Ao compararmos a incidência de anomalias epididimárias ou patência do processo vaginal nos pacientes com criptorquia e portadores de apêndices com os pacientes com criptorquia sem apêndices, observamos que não houve uma diferença significativa na incidência de anomalias anatômicas nos dois grupos.

Estudos prévios demonstraram que os apêndices testiculares de pacientes com criptorquia apresentaram alterações significativas nos receptores de estrogênio e androgênio (25). Pacientes portadores de hidrocele também apresentaram alteração na expressão dos receptores de androgênio e destruição epitelial nos apêndices testiculares (9). Essas alterações estariam associadas ao aumento da pressão hidrostática escrotal nos pacientes com

hidrocele (26). Os relatos sobre alterações estruturais e ultra-estruturais dos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia são escassos (9,12).

Em nosso estudo observamos que o epitélio dos apêndices testiculares e epididimários não sofreu alterações nos pacientes com criptorquia e no grupo controle, onde a maioria dos casos era composto por pacientes portadores de hidrocele. Encontramos uma grande quantidade de vasos e tecido conjuntivo tanto nos apêndices testiculares como nos epididimários. Esses achados estão de acordo com estudos prévios (12) e podem confirmar a teoria de que a camada epitelial dos apêndices junto com os capilares subepiteliais e vasos linfáticos formariam uma unidade funcional (10).

Em nossas amostras foram observadas a presença de fibras elásticas nos apêndices de pacientes com criptorquia. Um aumento da síntese de fibras elásticas pode estar associado com a distensão excessiva de um órgão (27). Observamos também a diminuição da quantidade de músculo liso e a predominância de colágeno III nos pacientes com criptorquia

Podemos especular que a redução da musculatura lisa deve ser o evento primário na formação de tecido fibrótico. Este evento é provavelmente relacionado a um processo de hidrodistensão. Foi demonstrado que uma mudança no sentido de cor esverdeada no método de coloração com Picrosirius red com luz polarizada está associada com colágeno menos organizado e/ou degradado (28). Esta mudança de cor também pode ocorrer em fases mais precoces da remodelação e reparação de tecidos conjuntivos, quando a síntese de colágeno tipo III é reforçada (29). Assim, com base nesses achados, os resultados do método Picrosirius com polarização sugerem que a matriz de colágeno nos apêndices testiculares em pacientes com criptorquia é interrompida ou degradada, ao invés da fibrose, que é consistente com o aumento da pressão hidrostática.

Esses achados podem nos levar a especulação de que nos testículos que não tiveram a migração completa, os apêndices testiculares poderiam apresentar essas alterações histológicas, em virtude do aumento da pressão intra-abdominal a que estariam expostos.

5 CONCLUSÃO

Não encontramos diferença na incidência de apêndices testiculares em relação à posição testicular nos pacientes com criptorquia. Não houve maior incidência de anomalias anatômicas associadas aos testículos portadores de apêndices. Os apêndices testiculares apresentaram uma alteração estrutural significativa nos pacientes com criptorquia apesar do epitélio não se alterar. Os apêndices testiculares dos pacientes com criptorquia apresentaram uma maior quantidade de fibras elásticas, uma diminuição na quantidade de músculo liso e a predominância de colágeno III, o que indica que esses apêndices sofrem uma remodelação estrutural significativa nos pacientes com criptorquia.

REFERÊNCIAS

1. Moore KL: The Developing Human. Clinically Oriented Embryology. Philadelphia, WB Saunders, 1977.
2. Netter F: Reproductive System. New Jersey: Ciba, 1978. v.2
3. Noske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W: Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. J Urol. 1998; 159: 13-6.
4. Rolnick D, Kawanoue S, Szanto P, Bush IM: Anatomical incidence of testicular appendages. J Urol. 1968; 100: 755-6.
5. Johansen TEB: Anatomy of the testis and epididymis in cryptorchidism. Androl, 1987; 19: 565-9.
6. Vermeulen CW, Hagerty CS: Torsion of the appendix testis (Hydatid of Morgagni): report of two cases with a study of the microscopic anatomy. J Urol, 1945 54: 459- 65.
7. Krukowsky ZH, Auld CD: Torsion of the appendix epididymis in a maldescendent testis. Br J Urol, 1983; 160: 755-56.
8. Kernohan NM, Coutts AG, Best PV: Cystoadenocarcinoma of appendix testis. Histopathology, 1990; 17: 147- 54.
9. Józsa T, Dienes B, Telek A, Hargitai Z, Por A, Kiss C: Differential expression of androgen and estrogen receptor of appendix testis in patients with descended and undescended testes. Int J Urol, 2008; 15: 171-4.
10. Posinovec J: Is the unstalked hydatid a functioning organ? Verb Anat Ges, 1969; 63: 751- 9.
11. Jacob M, Barteczko K: Contribution to the origin and development of the appendices of the testis and epididymis in humans. Anat Embryol, 2005; 209: 287-302.
12. Sahni D, Jit I, Joshi K, Sanjeev: Incidence and structure of the appendices of the testis and epididymis. J Anat, 1996; 189: 341-8.
13. Favorito LA, Cavalcante AG, Babinski MA: Study on the incidence of testicular and epididymal appendages in patients with cryptorchidism.. Int Braz J Urol, 2004; 30: 49-52.
14. Turek PJ, Ewalt DH, Snyder, III H, Duckett JW: Normal epididymal anatomy in boys. J Urol, 1994 151: 726-7.
15. Favorito LA, Sampaio FJB: Anatomical relationships between testis and epididymis during the fetal period in humans (10 to 36 weeks postconception). Eur Urol, 1998; 33: 121-3.

16. L. Testut / A. Latarjet. Editorial Salvat: Anatomía Humana (Tomos I, II, III) : 9ª ed: 1978
17. Mandarim-de-Lacerda, CA, Fernandes-Santos, C, Aguila, MB. Images Analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol*,2010; 611: 211-25.
18. Sundarasivarao D: The Müllerian vestiges and benign epithelial tumours of the epididymis. *J Path Bact*, 1953; 66: 417-32.
19. Kogan S, Hadziselimovic F, Howards SS, Snyder III HM, Huff D: Pediatric andrology. In: *Adult and pediatric urology*, 3rd ed. St Louis: Mosby Year Book, 1996.
20. Gill B, Kogan S: Cryptorchidism. Current concepts. *Ped Clin N Amer*,1997; 44: 1211-27.
21. Cendron M, Huff DS, Keating MA, Snyder, III HM, Duckett JW. Anatomical, morphological and volumetric analysis: A review of 759 cases of testicular maldescent. *J Urol*,1993; 149: 570- 3.
22. Józsa T, Csízy I, Kutasy B, Cserni T, Flaskó T. Decreased incidence of appendix testis in cryptorchidism with intraoperative survey. *Urol Int*,2008; 80 : 317- 20.
23. Marshall FF: Anomalies associated with cryptorchidism. *Urol Clin N Amer*,1982 9: 339-47.
24. Mollaeian M, Mehrabi V, Elahi B: Significance of epididymal and ductal anomalies associated with undescended testis: Study in 652 cases. *Urology*.1994; 43: 857-60.
25. Barthold JS, Redman JR: Association of epididymal anomalies with patent processus vaginalis in hernia, hydrocele and cryptorchidism. *J Urol*,1996 156: 2054-6.
26. Samnakay N, Cohen RJ, Orford J, King PA, Davies RJ. Androgen and oestrogen receptor status of the human appendix testis. *Pediatr Surg Int*,2003; 19: 520-4.
27. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, et al: Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol*,1981; 53: 134-7.
28. Ushiki T: Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol*,2002; 65: 109-26.
29. Hirshberg A, Lib M, Kozlovsky A, et al: The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*,2007 43: 278-82.

APÊNDICE : Structural analysis of testicular appendices in patients with cryptorchidism

Guilherme D. Tostes, Suelen F. Costa, João P. de Carvalho, Waldemar S. Costa, Francisco J.B. Sampaio, Luciano A. Favorito

Urogenital Research Unit, Rio de Janeiro State University – Brazil

Running head: Analysis of testicular appendices in cryptorchidism

Correspondence Address

Luciano Alves Favorito MD, Ph.D.

Rua Professor Gabizo 104/201 - Tijuca - Rio de Janeiro -RJ - Brazil

CEP: 20271-062

Telephone number: 55(21) 25876499

Fax number: 55(21) 38728802/25876121

E-mail: lufavorito@yahoo.com.br

Supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ – Brazil) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ), Brazil.

Abstract

Objectives: Report the incidence and structure of testicular appendices (TAs) in patients with cryptorchidism, comparing their incidence with epididymal anomalies (EA) and pascency of the vaginal process (PVP) and analyzes the structure of TAs.

Material and Methods: We studied 72 testes of patients with cryptorchidism (average of 6 years), and 8 testes from patients with hydroceles (average of 9 years). We analyzed the relations among the testis, epididymis and PVP and prevalence and histology of the TAs. The appendices of 10 patients with cryptorchidism and 8 with hydrocele were dissected and embedded in paraffin and stained with Masson trichrome; Weigert and Picro-Sirius Red with polarization and immunohistochemistry analysis of the collagen type III fibers to observe collagen. The stereological analysis was done with the software Image Pro and Image J, using a grid to determine volumetric densities (Vv). Means were statistically compared using the ANOVA and unpaired T test ($p < 0.05$).

Results: Of the 72 testes with cryptorchidism, 20 (27.77%) presented EA, 41 (56.9%) had PVP and 44 (61.1%) had TAs. Of the 44 testes with cryptorchidism and appendices, 30 (68.18%) presented PVP and 11 (25%) presented EA. There was no alteration of the epithelium in the appendices of patients in both groups. Stereological analysis documented the prevalence of ESFs (mean of 1.48%), prevalence of veins (mean of 10.11%) and decrease ($p = 0.14$) of SMCs in the TAs of patients with cryptorchidism (mean = 4.93%). Collagen III prevailed in the TAs of patients with cryptorchidism.

Conclusion: The testicular appendices presented significant structural alteration in the patients with cryptorchidism, indicating that TAs present a structural remodeling.

Key words: Testicular appendices, cryptorchidism, morphology, epididymal anomalies .

INTRODUCTION

Testicular and epididymal appendices have been considered anatomical anomalies (Johansen, 1987), but some studies report that these structures are present in the majority of normal individuals (Rolnick et al, 1968). These appendices, when very long and pedunculated, can twist around their axis, causing very painful symptoms similar to those of torsion of the spermatic cord (Vermeulen and Gagerty, 1945; Krukowsky and Auld, 1983). There are also reports of tumors originating in these structures (Kernohan et al, 1990). The testicular appendix, also known as the sessile hydatid of Morgagni, derives from the upper portion of the paramesonephric duct (Noske et al, 1998). The portion of the mesonephric duct that is cranial to the testis can form the pedunculated hydatid of Morgagni, currently more commonly known as epididymal appendix. Other vestigial structures derived from this portion of the mesonephric duct are the Haller's organs, located in the fissure between the testis and epididymis, consisting of a group of aberrant superior and inferior veins, and the Giraldes' organ, also called the paradidymis or innominate body, located in the distal part of the spermatic cord (Rolnick et al, 1968; Noske et al, 1998).

The functions of testicular appendices are controversial, but they may control the amount of serous fluid within the space of the tunica vaginalis (Josza et al, 2008). Another hypothesis suggests that the surface epithelium, subepithelial capillaries and lymphatic vessels of testicular appendices form a functional unit (Posinovec, 1969). Some studies have analyzed the embryology (Jacob and Barteczko, 2005) and structure of the testicular and epididymal appendices (Rolnick et al, 1968; Sahni et al, 1996). Studies of the incidence of these structures in patients with cryptorchidism and comparison with individuals without testicular position anomalies are rare in the literature (Favorito et al, 2004). There are no published studies analyzing the structure of testicular appendices in patients with cryptorchidism. This work reports the incidence and structure of testicular appendices (TAs) in patients with cryptorchidism, comparing their incidence with epididymal anomalies and patency of the vaginal process and analyzes the structure of testicular appendices to assess whether their architecture is altered when cryptorchidism is present.

METHODS

The present work received institutional review committee and parent approval, has been carried out in accordance to the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation.

We analyzed 72 testes from 55 patients with cryptorchidism (17 with bilateral cryptorchidism) and compared them with a control group of 8 testis from 6 patients with hydroceles and 2 patients with testicular torsion. The patients with cryptorchidism had ages from 1 to 13 years (average of 6 years), while those in the control group ranged from 1 to 18 years old (average of 14 years). In the two groups, we analyzed the relations among the testis, epididymis and patency of the vaginal process and the incidence and histology of the testicular appendices. To analyze the relations between the testis and epididymis during surgery, we used a previous classification (Turek et al, 1994; Favorito and Sampaio, 1998). By this classification, there are six types of relations between the testis and epididymis: Type I - epididymis attached to the testis at the head and tail; Type II - epididymis totally attached to the testis; Type III - epididymis attached to the testis only at the head; Type IV -epididymis attached to the testis only at the tail; Type V – no visible connection between the testis and epididymis; and Type VI – epididymal atresia. Type I and II relations are considered normal while the other types are considered to be anatomical anomalies (Turek et al, 1994). To analyze the structure of the vaginal process we considered two situations: (a) complete obliteration of the vaginal process between the internal inguinal ring and the superior pole of the testis; and (b) complete patency of the vaginal process.

In relation to the testicular appendices, we analyzed the following situations in the two groups during the surgeries: I) absence of testicular and epididymal appendices; II) presence of testicular appendix only; III) presence of epididymal appendix only; IV) presence of testicular and epididymal appendices; V) presence of two epididymal appendices and one testicular appendix; and VI) presence of paradidymis or vas aberrans of Haller. The appendices were separated from the other structures and fixed in 10% buffered formalin, and routinely processed for paraffin embedding. Then 5µm thick sections were obtained at 200µm- intervals. Smooth muscle cells, connective tissue and elastic system fibers were studied by histochemical and immunolabeling methods.

The sections were stained with hematoxylin-eosin to assess the integrity of the tissue. We performed the following staining: Masson's trichrome, in order to quantify connective tissue and smooth muscle, and Weigert resorcin fuchsin with previous oxidation in order to observe elastic system fibers. Connective tissue, smooth muscle cells and elastic system fibers were quantified by a digital method (Mandarim-de-Lacerda et al, 2010). Five sections per specimen were stained, and five fields of each section were selected. All selected fields were photographed with an Olympus DP70 camera coupled to an Olympus BX51 microscope. The images were processed and saved with the Image Pro software. The tissue

was quantified using the Image J software to determine the area density (Ad) of each component (Mandarim-de-Lacerda et al, 2010). Immunolabeling was performed to confirm the results. For smooth muscle cells (SMCs), Monoclonal Alfa Actin Antibody 08-0106 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, United States) was used. To confirm the results for elastic fibers (EF), Monoclonal Elastin Antibody ab 9519 (Abcam Laboratories, Cambridge, MA, United States) was used. Means were statistically compared using the unpaired t-test and linear regression was performed when applicable. Statistical relevance was accepted if $p < 0.05$.

RESULTS

Of the 72 testes with cryptorchidism, 7 were abdominal (9.7%), 54 (75%) were located in the inguinal canal and 11 (15.3%) were supra-scrotal. Of the testis with cryptorchidism, 20 (27.77%) presented epididymal anomalies, 41 (56.9%) had patent vaginal process and 44 (61.1%) had testicular appendices. The prevalence of the testicular appendices in the testis with cryptorchidism and their relation with the testicular position are reported in Table 1. There was no statistically significant difference in relation to the location of the appendices ($p=0.0652$).

Of the 7 abdominal testes, all had patent vaginal process and 4 (57%) had testicular appendices. Of the 54 testes located in the canal, 31 (57%) had appendices, and of these, 21 (38,8%) presented patent vaginal process and 19 (35.8%) had epididymal anomalies. Of the 11 cases of supra-scrotal testes, 9 (82%) had appendices, 5 (55.5%) had patency of the vaginal process and 1 (11.1%) presented epididymal anomaly. Finally, of the 8 cases in the control group, 7 had appendices (87.5%), 1 (14.28%) had epididymal anomaly and 1 (14.28%) had patent vaginal process. Of the 44 testes with cryptorchidism and appendices, 30 (68.18%) presented patent vaginal process and 11 (25%) showed epididymal anomalies. The relation between the type of testicular appendix found and the patency of the vaginal process and the presence of epididymal anomalies is shown in Table 2. Of the 55 patients, 17 had bilateral cryptorchidism, for a total of 34 testes. Of these, 1 was abdominal, 24 were located in the canal and 9 were supra-scrotal. Of the 34 testes of this group, 25 (73.5%) had testicular appendices, with 13 being right testes and 12 left ones, with no statistical difference.

Epithelium

Sections stained with Masson's trichrome from the testicular appendix

demonstrated a vascular stroma lined with pseudocolumnar epithelium. The stroma consisted of loose connective tissue containing blood vessels, fibroblasts and varying numbers of acini (gland-like structures), which were lined with a non-ciliated columnar epithelium (Figure 1A). The epididymal appendices were vesicular structures. The cavity of the vesicle was lined with a pseudostratified columnar epithelium (Figure 1B). There was no apparent alteration between the epithelium in the appendices of patients with cryptorchidism and in the control group, as seen in Figures 1A and 1C.

Elastic System Fibers

Stereological analysis documented a greater prevalence of elastic fibers in the testicular appendices of the patients with cryptorchidism (mean of 1.48%) in comparison to the appendices of the patients with a hydrocele testis (mean of 0.29%), a result that was statistically different ($p=0.22$). Figure 2 shows the testicular appendices in patients with cryptorchidism and in the control group stained by Weigert's resorcin-fuchsin with oxidation. The testes of the patients with cryptorchidism contain a larger quantity of elastic fibers.

Vessels

Stereological analysis also showed a greater incidence of vessels in the testicular appendices of the patients with cryptorchidism (mean of 10.11%, standard deviation of 6.88) in relation to the control group (mean of 4.77%, standard deviation of 1.9). This difference was statistically significant ($p < 0.001$). Figure 3 shows the testicular appendices in patients with cryptorchidism and those of the control group, stained by Masson's trichrome. A greater number of vessels can be observed in the testes of patients with cryptorchidism.

Smooth muscle cells:

Stereology analysis showed a statistically significant decrease ($p=0.14$) of smooth muscle cells in the appendices of patients with cryptorchidism (mean = 4.93%) in comparison with the control group (mean=9.032%). Figure 4 contains photomicrographs comparing the smooth muscle arrangement in the cryptorchidism and the control group appendices.

Collagen

In the qualitative analysis, type III collagen was observed in both groups, although type III collagen was prevalent in the testicular appendices of patients with cryptorchidism

and type I was prevalent in the patients of the control group. Figure 5 shows examples of the two groups stained with Picro Sirius Red with polarization. The photomicrographs presented a large difference in colors between the groups. This difference can suggest changes in the collagen fiber organization.

DISCUSSION

Knowledge of the presence, form and location of testicular and epididymal appendices is important in clinical practice because of the possibility of torsion of these structures, their association with anatomical anomalies and the higher incidence of tumors (Rolnick, 1968; Kernohan et al, 1990; Sundarasivarao, 1953). Cryptorchidism is one of the most common congenital anomalies among males, with a rate between 2 and 5% of full-term births, a rate that can reach 30% in premature babies (Kogan et al, 1996; Gill and Kogan, 1997; Cendron et al, 1993). There are few studies in the literature on the incidence and analysis of the structure of testicular appendices in patients with cryptorchidism and their relation with epididymal anomalies and patency of the vaginal process (Favorito et al, 2004).

Previous studies have shown that testicular appendices occur significantly less often in patients with cryptorchidism. This can indicate a possible role of testicular appendices in the testicular migration process (Jozsa et al, 2008). In the present study, 61.1% of the testes with cryptorchidism presented testicular appendices, a much higher rate than the 24% reported by Jozsa (Jozsa et al, 2008). We did not find a significant difference in the number of appendices in the testes with cryptorchidism in relation to those of the control group, and also did not find a significant difference in the incidence of appendices in relation to the testicular position in the patients with cryptorchidism.

Cryptorchidism can be associated with various anatomical anomalies, but epididymal anomalies and patency of the vaginal process are among the most frequent (Marshall, 1982; Mollaeian et al, 1994; Barthold and Redman, 1996). Epididymal anomalies are associated with cryptorchidism, with prevalence that ranges from 36 to 79% (Marshall, 1982; Mollaeian et al, 1994). In this study we found 27.7% of the testes with cryptorchidism also had epididymal anomalies and 56.9% had patency of the vaginal process. Of the 44 testes with appendices, 68.18% had patency of the vaginal process and 25% presented epididymal anomalies. There was no significant difference between the incidence of epididymal anomalies or patency of the vaginal process in the patients with cryptorchidism with and without appendices.

Previous studies have shown that the testicular appendices of patients with cryptorchidism show significant alterations in the estrogen and androgen receptors (Josza et al, 2008; Samnakay et al, 2003). Patients with hydroceles also present alteration in the expression of androgen receptors and epithelial destruction in the testicular appendices (Josza et al, 2008). These alterations are argued to be associated with increased hydrostatic pressure in the scrotum of patients with hydroceles (Josza et al, 2008; Samnakay et al, 2003).

Reports of structural and ultrastructural changes in the testicular appendices of patients with cryptorchidism are rare (Josza et al, 2008; Sahni et al, 1996). In this study we did not observe any alterations in the epithelium of the testicular and epididymal appendices between the patients with cryptorchidism and those in the control group, where the majority of cases were made up of patients with hydroceles. We found a large quantity of veins and connective tissue in both the testicular and epididymal appendices. These findings are in agreement with those of (Sahni et al, 1996) and can confirm the theory that the epithelial layer of the appendices along with the subepithelial capillaries and lymphatic vessels form a functional unit (Josza et al, 2008; Posinoved, 1969).

In our samples, we observed the presence of elastic fibers in the appendices, more so in those of patients with cryptorchidism. The increased synthesis of elastic fibers may be associated with excessive distension of an organ (Cortivo et al, 1981). We also observed a decrease in the quantity of smooth muscle fibers and predominance of type III collagen in the patients with cryptorchidism. We can speculate that the smooth muscle fiber reduction is the primary event in fibrotic tissue formation. This event is probably correlated to a hydrodistension process. It has been variously shown that a shift towards greenish color in the Picrosirius polarization method is associated with less organized and/or degraded collagen (Ushiki, 2002). This color change can also occur in earlier phases of the remodeling and repair of connective tissues, when the synthesis of type III collagen is enhanced (Hirshbert et al, 2007). Thus, based on these findings, the results of the Picrosirius-polarization method suggest that collagen matrix at the testicular appendices in patients with cryptorchidism is disrupted or degraded, rather than fibrotic, which is consistent with higher hydrostatic pressure. These findings lead us to suggest that in testes without complete migration, testicular appendices may result from the higher intra- abdominal pressure to which these testes are exposed.

In conclusion we did not find a difference in the incidence of testicular appendices in relation to the testicular position in the patients with cryptorchidism. There also was no increased incidence of anatomical anomalies associated with the testes containing appendices.

The testicular appendices showed a significant structural alteration in the patients with cryptorchidism: although the epithelium was not changed, the testicular appendices of the patients with cryptorchidism had a larger quantity of elastic fibers and smaller quantity of smooth muscle cells and predominance of type III collagen, remodeling in patients with cryptorchidism.

REFERENCES

- Barthold JS, Redman JR: Association of epididymal anomalies with patent processus vaginalis in hernia, hydrocele and cryptorchidism. *J Urol*, 156: 2054-2056, 1996.
- Cendron M, Huff DS, Keating MA, Snyder, III HM, Duckett JW. Anatomical, morphological and volumetric analysis: A review of 759 cases of testicular maldescent. *J Urol*, 149: 570-73, 1993.
- Cortivo R, Pagano F, Passerini G, et al: Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol*, 53: 134-137, 1981.
- Favorito LA, Sampaio FJB: Anatomical relationships between testis and epididymis during the fetal period in humans (10 to 36 weeks postconception). *Eur Urol*, 33: 121-123, 1998.
- Favorito LA, Cavalcante AG, Babinski MA: Study on the incidence of testicular and epididymal appendages in patients with cryptorchidism. *Int Braz J Urol*, 30: 49-52, 2004.
- Gill B, Kogan S: Cryptorchidism. Current concepts. *Ped Clin N Amer*, 44: 1211-1227, 1997.
- Hirshberg A, Lib M, Kozlovsky A, et al: The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*, 43: 278-282, 2007.
- Jacob M, Barteczko K: Contribution to the origin and development of the appendices of the testis and epididymis in humans. *Anat Embryol*, 209: 287-302, 2005.
- Johansen TEB: Anatomy of the testis and epididymis in cryptorchidism. *Androl*, 19: 565-569, 1987.
- Józsa T, Csízy I, Kutasy B, Cserni T, Flaskó T. Decreased incidence of appendix testis in cryptorchidism with intraoperative survey. *Urol Int*, 80(3):317-20, 2008.
- Josza T, Dienes B, Telek A, Hargitai Z, Por A, Kiss C: Differential expression of androgen and estrogen receptor of appendix testis in patients with descended and undescended testes. *Int J Urol*, 15: 171-174, 2008.
- Kernohan NM, Coutts AG, Best PV: Cystoadenocarcinoma of appendix testis. *Histopathology*, 17:147-154, 1990.

- Kogan S, Hadziselimovic F, Howards SS, Snyder III HM, Huff D: Pediatric andrology. In: Adult and pediatric urology, 3rd ed. St Louis: Mosby Year Book, 1996.
- Krukowsky ZH, Auld CD: Torsion of the appendix epididymis in a maldescendent testis. BJU, 160: 755-756, 1983.
- Mandarim-de-Lacerda, CA, Fernandes-Santos, C, Aguila, MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol.* 2010; 611:211-225
- Marshall FF: Anomalies associated with cryptorchidism. *Urol Clin N Amer*, 9: 339-347, 1982.
- Mollaeian M, Mehrabi V, Elahi B: Significance of epididymal and ductal anomalies associated with undescended testis: Study in 652 cases. *Urology*, 43: 857-860, 1994.
- Noske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W: Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. *J Urol*, 159: 13-16, 1998.
- Posinovec J: Is the unstalked hydatid a functioning organ? *Verh Anat Ges*, 63:751-9, 1969.
- Rolnick D, Kawanoue S, Szanto P, Bush IM: Anatomical incidence of testicular appendages. *J Urol*, 100: 755-756, 1968.
- Sahni D, Jit I, Joshi K, Sanjeev: Incidence and structure of the appendices of the testis and epididymis. *J Anat*, 189: 341-348, 1996.
- Sundarasivarao D: The Müllerian vestiges and benign epithelial tumours of the epididymis. *J Path Bact*, 66: 417-432, 1953.
- Samnakay N, Cohen RJ, Orford J, King PA, Davies RJ. Androgen and oestrogen receptor status of the human appendix testis. *J Pediatr Surg Int*, 19: 520-524, 2003.
- Turek PJ, Ewalt DH, Snyder, III H, Duckett JW: Normal epididymal anatomy in boys. *J Urol*, 151: 726-727, 1994.
- Ushiki T: Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol*, 65: 109- 126, 2002.
- Vermeulen CW, Hagerty CS: Torsion of the appendix testis (Hydatid of Morgagni): report of two cases with a study of the microscopic anatomy. *J Urol*, 54: 459-465, 1945.

Table 1– Incidence of the testicular and epididymal appendices studied with respect to position of the testes with cryptorchidism and the testes in the control group.

Appendices	ABDOMEN	CANAL	SUPRA-SCROTAL	CONTROL
No appendix	3 (%)	23(%)	2 (%)	1 (%)
Testicular appendix	1 (%)	23(%)	7 (%)	5 (%)
Epididymal appendix	2 (%)	4 (%)	0 (0%)	1 (%)
Testicular and epididymal appendix	1 (%)	4 (%)	2 (%)	1 (%)
Total	7	54	11	8

Table2 – Relation between the type of appendix found and the patency of the vaginal process and presence of epididymal anomaly.

Appendices	Patent vaginal process	Epididymal anomaly
Testicular (31)	20 (%)	5 (%)
Epididymal (6)	5 (%)	4 (%)
Testicular and Epididymal (7)	5 (%)	2 (%)
Total	30	11

FIGURES

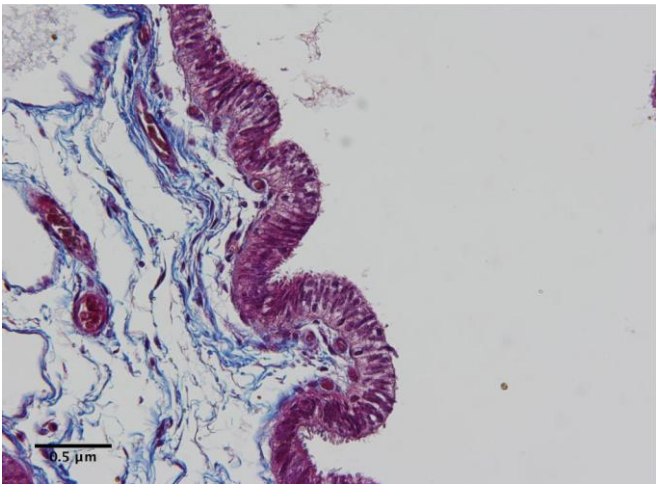
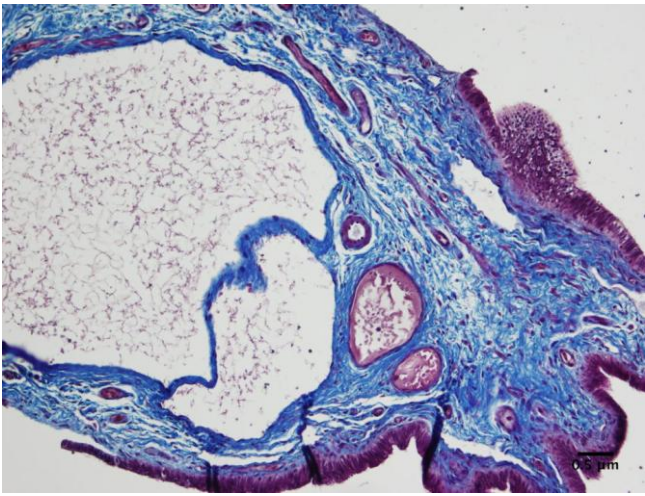
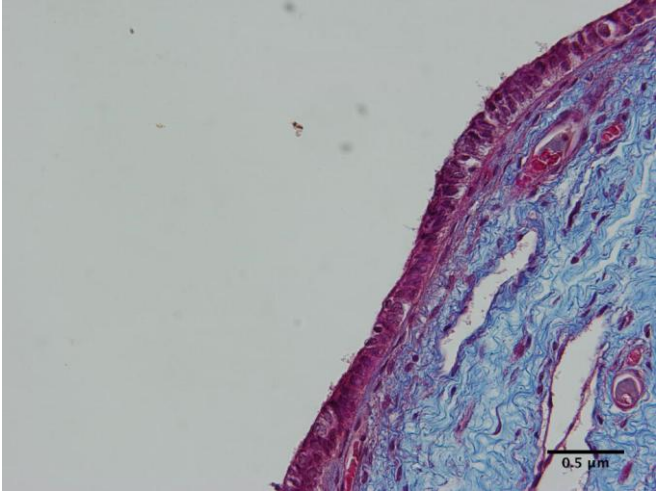
FIGURE 1: Appendix epithelium. A) Patient with cryptorchidism with 3-years-old, showing the vascular stroma lined with pseudostratified epithelium of the testicular appendix. Masson's trichrome x200. B) Patient of the control group with 13-year-old, showing epididymal appendix with cavitation covered by pseudostratified epithelium. Masson's trichrome x 200. C) Patient of the control group with 13-years-old, showing pseudostratified epithelium of the entire testicular appendix. Masson's trichrome x200.

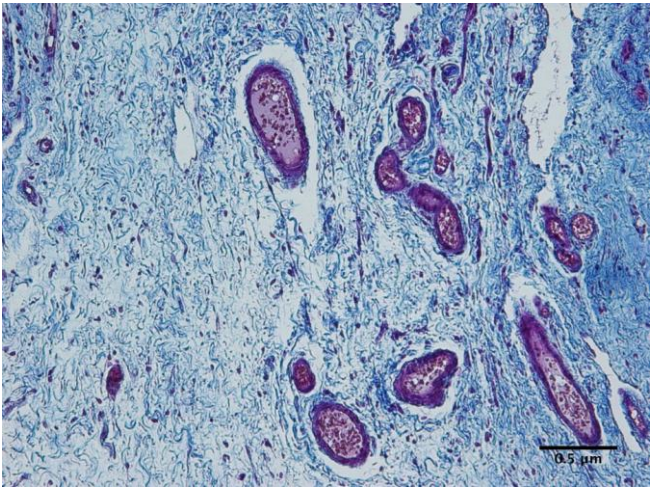
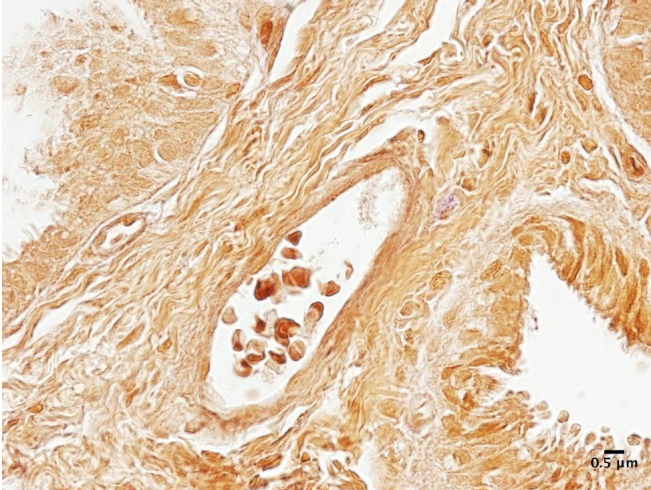
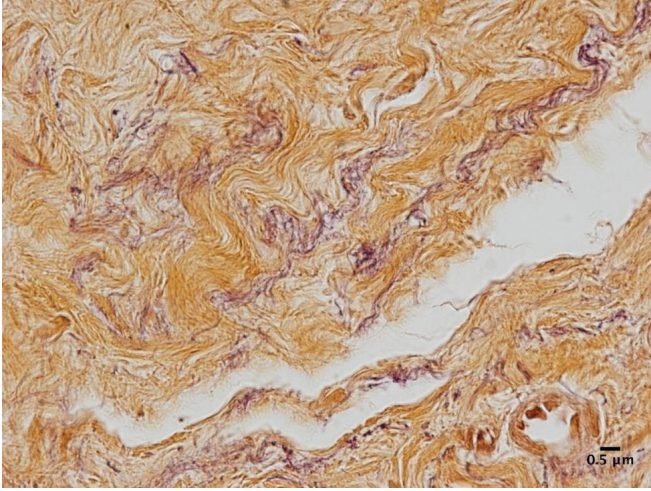
FIGURE 2 – Elastic system fibers of the testicular appendix. A) Testicular appendix of 13-year-old patient with cryptorchidism. Weigert x400. B) Testicular appendix of 13-year-old patient of the control group. Weigert x400. Note the marked increase of elastic fibers (brown) in the patient with cryptorchidism when compared to the control.

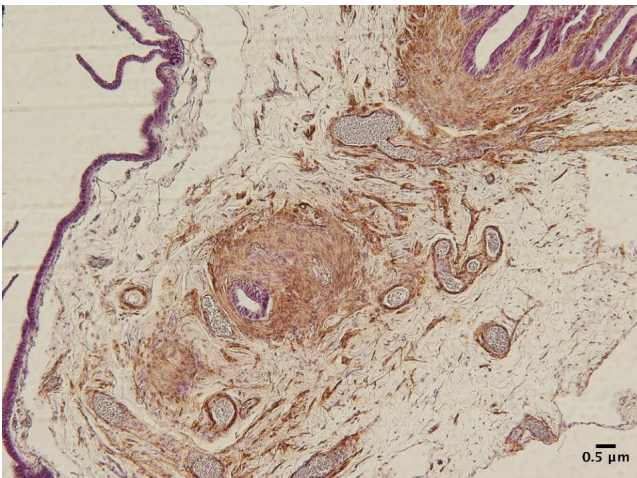
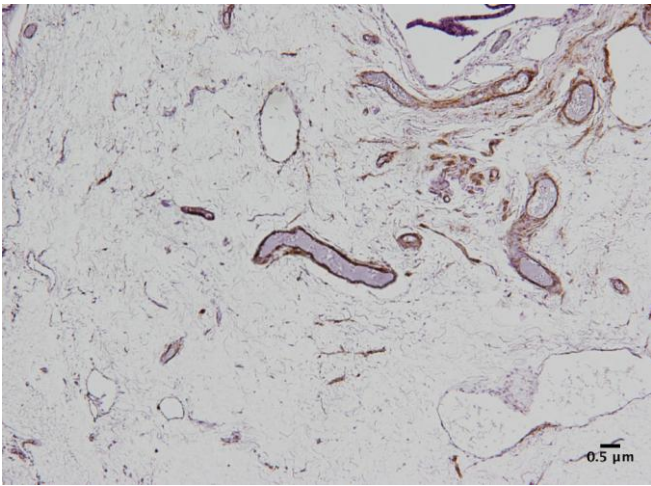
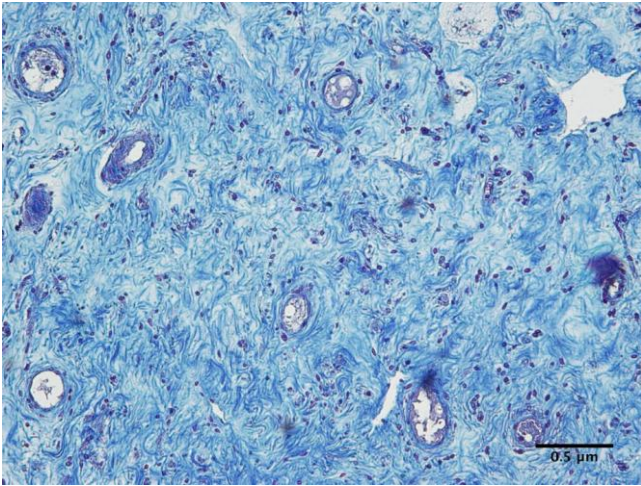
FIGURE 3 – Testicular appendix vessels. (A) Testicular appendix of 2 years-old patient with cryptorchidism. Masson's trichrome X200. (B) Testicular appendix of 1 year-old patient in the control group. Masson's trichrome X200. Note the marked increase of vessels in the appendix of the cryptorchidic patient.

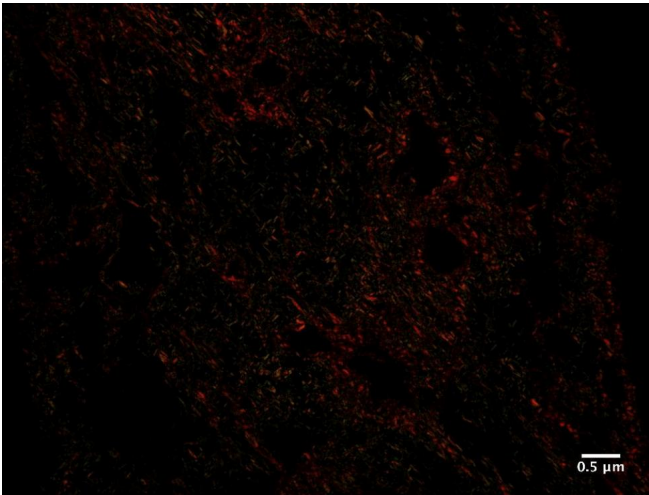
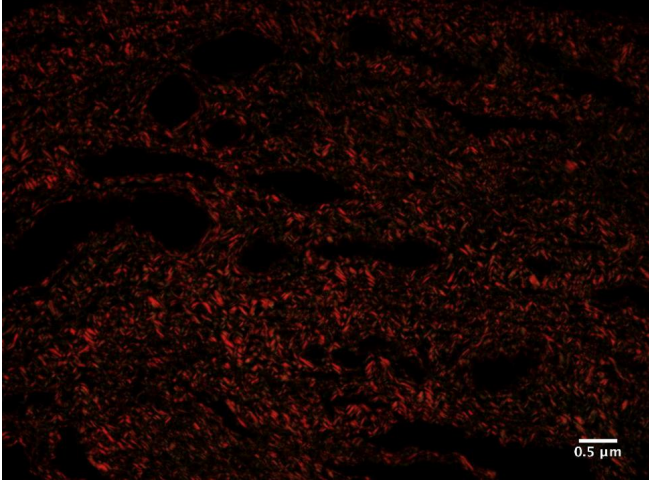
FIGURE 4 – Distribution of smooth muscle cells of the testicular appendix. (A) Testicular appendix of 3-year-old patient with cryptorchidism. Immunohistochemical staining for alpha-actin X200. (B) Testicular appendix of 11-year-old patient of the control group. Immunohistochemical staining for alpha-actin X200. Note the marked increase of SMCs in the appendix of the control patient when compared to the cryptorchidic patient.

FIGURE 5 – Qualitative collagen distribution in testicular appendices. (A) Testicular appendix of 3-year-old patient with cryptorchidism showing prevalence of yellowish color. Picosirius-polarization method, X400. (B) Testicular appendix of 11-years- old patient of the control group showing prevalence of greenish color. Picosirius- polarization method, X400.









ANEXO A : Submissão do artigo

Para: luciano a favorito <lufavorito@yahoo.com.br>; luciano favorito <lufavorito@yahoo.com.br>

Cc: jandrol@jandrol.org

Enviadas: Sábado, 11 de Fevereiro de 2012 20:45

Assunto: JANDROL/2012/016626 Manuscript Submission

MS ID#: JANDROL/2012/016626

MS TITLE: STRUCTURAL ANALYSIS OF TESTICULAR APPENDICES IN PATIENTS WITH CRYPTORCHIDISM

Dear Dr. Favorito:

This is an automatic message acknowledging your submission to Journal of Andrology. Thank you for submitting your manuscript online. Please reference JANDROL/2012/016626 in all communications with the journal office regarding your paper. To check the status of your manuscript, please visit <http://submit.andrologyjournal.org> and enter your Author Area.

The disposition of your paper will be emailed to you as soon as all the reviews are in and the Editors make a decision. If you have any questions or concerns prior to receiving the decision letter email, please let us know.

If you have questions or difficulties, please contact the Editorial Office at jandrol@jandrol.org or 608-256-4616.

Sincerely,
Editorial Staff
Journal of Andrology

ANEXO B - Comitê de ética em pesquisa

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 14 de Outubro de 2011

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

Prof.: Wille Oigman

Para: Aut. Guilherme Damian Tostes – Orient.Prof. Luciano Alves Favorito

Registro CEP/HUPE: 2945/2011 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)

CAAE: 0094.0.228.000-11

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ANÁLISE DA INCIDÊNCIA E COMPARAÇÃO HISTOLÓGICA DOS APÊNDICES TESTICULARES E EPIDIDIMÁRIOS EM DIFERENTES PATOLOGIA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sa., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

ANEXO C – Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO**Consentimento Informado para estudo do apêndice testicular e epididimário**

Você será submetido a procedimento para correção da hidrocele, criptoquirdia ou orquiectomia. Durante o procedimento poderá ser colhido o apêndice, se estiver presente.

Este material será utilizado para pesquisa histológica no Laboratório de Pós Graduação do Hospital Pedro Ernesto para tese de mestrado. Após realizar a análise e o trabalho final ter sido produzido, o material será descartado.

Para a coleta do material não haverá riscos para o paciente. As complicações que possam ocorrer no tratamento da hidrocele e da orquipedia são inerentes a coleta do material. Na coleta pós orquiectomia serão coletados após retirada do testículo

As pesquisas envolvendo crianças e adolescentes terão o Termo de Consentimento assinado por seus representantes, garantida a sua participação no processo, na medida de seu desenvolvimento moral, a partir dos sete anos. Às crianças menores de sete anos é garantido o direito de serem informadas, de forma adequada ao seu nível de compreensão. A recusa em participar, por parte da criança ou do adolescente, deverá ser sempre acatada, salvo quando a intervenção proposta for a única possibilidade terapêutica disponível ao caso e os pais ou representantes legais autorizarem a sua realização.

Essa pesquisa não traz benefícios direto para o paciente participante e não tem fins lucrativos

Pelo presente instrumento, declaro que fui suficientemente esclarecido (a) pelo (a) médico (a) (nome completo do médico) sobre os procedimentos (esclarecer quais procedimentos), a que vou me submeter, ou a que vai ser submetido (nome do paciente), do qual sou responsável legal, bem como do diagnóstico, prognóstico, riscos e objetivos do tratamento (discriminar).

Local e data

Nome e assinatura do paciente (ou representante legal)

Documento de Identidade

Testemunha

Testemunha