



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Raquel Milhomem Lange

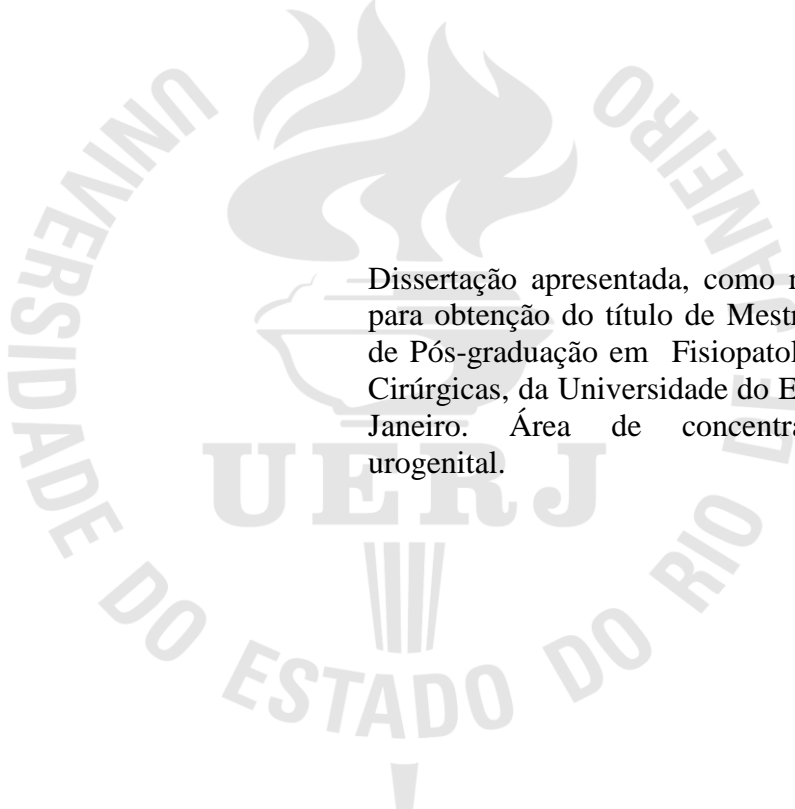
**Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes,  
durante e após a puberdade, e o efeito do tratamento com L-arginina**

Rio de Janeiro

2013

Raquel Milhomem Lange

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



-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

L274 Lange, Raquel Milhomem.

Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes, durante a após a puberdade, e o efeito do tratamento com L-arginina / Raquel Milhomem Lange. – 2013.  
90 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. Testículos - Teses.. 2. Torção do cordão espermático. 3. Arginina - Teses. 4. Isquemia - Teses. 5. Reperusão. I. Sampaio, Marco Aurélio Pereira. II. Souza, Diogo Benchimol de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. 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

Raquel Milhomem Lange

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

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 21 de agosto de 2013.

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

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

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dra. Viviane A. Nunes Degani  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dra. Carla Braga Mano Gallo  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2013

...o meu trabalho, que fiz por muito tempo, não prosseguiu, a fim de ganhar o louvor. Agora desfruto, principalmente por um desejo pelo conhecimento, e noto que reside em mim mais do que na maioria dos outros homens....

*Anton van Leeuwenhoek*

## RESUMO

MILHOMEM, Raquel Lange. *Avaliação dos testículos de ratos submetidos à torção testicular antes, durante e após a puberdade, e o efeito do tratamento com L-arginina*. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Torção testicular (TT) é uma síndrome urológica comumente encontrada em recém nascidos, crianças e adolescentes. Neste trabalho foi estudada as lesões morfológicas e a função reprodutiva em ratos adultos que sofreram TT, em diferentes idades de maturidade sexual e o efeito protetor da L-arginina, contra os danos causados pela isquemia/reperfusão na torção testicular. Dezoito ratos pré-púberes (4 semanas de vida) dezessete púberes (6 semanas de vida) e dezessete adultos (9 semanas de vida) foram submetidos à TT. Sob anestesia o testículo direito foi rotacionado em 720° e fixado, sendo então destorcido após 4 horas. Vinte e quatro ratos (ARG4, n=8, ARG6, n=8 e ARG9 n=8) foram submetidos ao tratamento com 650mg/kg de L-arginina, por via oral, durante 7 dias. Outros trinta ratos de mesma idade sofreram cirurgia simulada (SH4, n=10, SH6, n=10 e SH9, n=10). Com 12 semanas de idade, foram submetidos ao acasalamento controlado com 3 fêmeas e ao vigésimo dia de gestação o número de fetos, corpos lúteos, absorções e implatações foram contados. Na 14<sup>a</sup> semana, os ratos foram mortos e os espermatozoides coletados da cauda dos epidídimos, foi anotado o peso corporal, o peso e volume testicular. O soro foi usado para dosagem de testosterona. Foram avaliadas a concentração, motilidade e a viabilidade espermática. Os testículos coletados foram fixados em Bouin, pós-fixados em formalina e processados em parafina. Utilizando o programa de imagem Image J, lâminas coradas com HE, mensuramos a altura do epitélio, densidade volumétrica e diâmetro do túbulo seminífero. Para avaliar a integridade do epitélio seminífero foi utilizado a frequência dos estágios do ciclo do epitélio e o escore de Johnsen. Também foi avaliado a proliferação do compartimento tubular e intertubular, através da imunomarcagem com PCNA. Os dados foram tabulados e as médias dos grupos comparadas pelo teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns (programa Graphpad Prism, com  $p < 0,05$ ). Os resultados revelaram grandes danos produzidos pela injúria testicular, no testículo ipsilateral, com diminuição da capacidade reprodutiva, da concentração, viabilidade e mobilidade, do peso e volume testicular. Animais TT9 não apresentaram espermatozoides nas amostras coletas. Houve diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio, aumento do compartimento intertubular, com ênfase dos vasos sanguíneos, aumento da proliferação celular estromal e diminuição da proliferação epitelial. Houve diminuição da concentração sérica de testosterona no grupo TT4, quando comparado como grupo TT9. Em geral, os animais submetidos à torção na fase adulta foram os mais acometidos. Não foram encontradas alterações dignas de nota, nos testículo contralaterais. Animais tratados com L-arginina obtiveram melhora dos índices reprodutivos, com aumento da potência em todas as idades. Houve aumento da concentração espermática no testículo contralateral de ARG4 e ARG6, mostrando que a L-arginina atuou como antioxidante. Não houve proteção para as lesões causadas pela torção na maioria dos grupos, mas os animais tratados ARG9 apresentaram concentração espermática mensurável, quando comparados aos ratos TT9, que tinham azospermia.

Palavras-chave: Torção Testicular. L-arginina. Isquemia/reperfusão.

## ABSTRACT

MILHOMEM, Raquel Lange. *Evaluation of the testes of rats testicular torsion before, during and after puberty, and the effect of treatment with L-arginine*. 2013. 90f. Dissertation (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 urologic syndrome commonly found in infants, children and adolescents. In this work, the morphological damage and reproductive function in adult rats that underwent TT in different ages of sexual maturity and the protective effect of L-arginine against damage caused by ischemia / reperfusion in testicular torsion. Eighteen prepubertal rats (4 weeks old) seventeen pubertal (6 weeks old) and seventeen adults (9 weeks old) underwent TT. Under anesthesia, the right testis was rotated 720 ° and fixed, and then distorted after 4 hours. Twenty four rats (ARG4, n = 8, Arg6 n = 8, and Arg9 n = 8) were treated with 650mg/kg of L-arginine orally for 7 days. Other thirty rats of the same age underwent sham surgery (SH4, n = 10, SH6 n = 10, and SH9 n = 10). At 12 weeks of age, were subjected to controlled breeding 3 females and twentieth day of gestation and number of fetuses, corpora lutea, implantations, and absorptions were counted. At 14 weeks, the rats were killed and sperm collected from the epididymis tail was also noted body weight, testicular weight and volume. The serum was used for measurement of testosterone. We evaluated the concentration, motility and sperm viability. The testes were collected and fixed in Bouin, post-fixed in formalin and processed in paraffin. Using imaging program Image J, HE-stained slides, we measured the height of the epithelium, volume density and diameter of the seminiferous tubule. To evaluate the integrity of the seminiferous epithelium was used the frequency of the cycle stages of the epithelium and Johnsen's score. Also evaluated was the proliferation of the tubular and intertubular compartment by immunostaining with PCNA. Data were tabulated and the means of groups were compared by ANOVA with Bonferroni post-test or Kruskal-Wallis with Dunns post test (Graphpad Prism, p <.05). The results revealed major damage produced by testicular injury in the ipsilateral testis, with decreased reproductive capacity, concentration, viability and motility, weight and testicular volume. TT9 animals showed no sperm in the samples collected. A decrease of the seminiferous tubule diameter and height of the epithelium, increased intertubular compartment, with emphasis on blood vessels, increased proliferation and reduced stromal cell epithelial proliferation. There was a decrease in serum testosterone group TT4, when compared as a group TT9. In general, animals subjected to torsion at 9 weeks were the most affected. There were no notable changes in the contralateral testis. Animals treated with L-arginine showed improvement of reproductive rates, with increased potency at all ages. There was increased sperm concentration in the contralateral testicular ARG4 and ARG6, showing that L-arginine acted as an antioxidant. There was no protection for injuries caused by twisting in most groups, but animals treated ARG9 showed measurable sperm concentration compared to TT9 mice that had azoospermia.

Keywords: Testicular torsion. L-arginine. Ischemia / reperfusion

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fotografia de testículo de neonato humano.....	12
Figura 2 –	Classificação dos tipos de torção testicular.....	15
Figura 3 –	Desenho da fórmula estrutural de L-arginina, na síntese de Óxido Nítrico.....	17
Quadro 1 –	Distribuição dos animais de acordo com a idade cirúrgica e o tipo de intervenção.....	19
Figura 4 –	Fotografia de ratos em plano anestésico, após torção.....	20
Figura 5 –	Imagem do procedimento cirúrgico experimental em rato de 9 semanas.....	21
Figura 6 –	Fotomicrografia de citologia vaginal de rata.....	22
Figura 7 –	Fotomicrografia da câmara de Neubauer espelhada.....	23
Figura 8 –	Fotografia de rato no momento da coleta de sangue.....	25
Figura 9 –	Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, para análise de diâmetro do túbulo seminífero.....	26
Figura 10 –	Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, para análise de altura do epitélio seminífero.....	27
Figura 11 –	Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, para análise densidade volumétrica.....	28
Figura 12 –	Desenho esquemático da metamorfose das espermatídes.....	31
Figura 13 –	Diagrama esquemático dos estágios do ciclo do epitélio seminífero de ratos.....	32
Figura 14 –	Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, análise de proliferação celular.....	33
Figura 15 –	Resultado do Teste de Fertilidade, avaliação do parâmetro de potência.....	37
Figura 18 –	Fotomicrografias de Câmara de Neubauer.....	38
Figura 19 –	Resultado Avaliação Espermática, concentração de espermatozóides...	39
Figura 20 –	Resultado Avaliação Espermática, parâmetro de motilidade.....	40
Figura 21 –	Resultado avaliação espermática, parâmetro de viabilidade.....	41
Figura 22 –	Resultado da avaliação da concentração espermática no testículo	



	contralateral.....	41
Figura 23 –	Testículos de ratos adultos submetidos à torção testicular, com 4 semanas de idade.....	43
Figura 24 –	Peso dos testículos ipsilaterais dos ratos.....	44
Figura 25 –	Volume dos testículos ipsilaterais dos ratos.....	44
Figura 26 –	Volume dos testículos ipsilaterais dos ratos.....	45
Figura 27 –	Peso corporal final dos ratos.....	45
Figura 28 –	Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo direito.....	47
Figura 29 –	Diâmetro do túbulo de testículos ipsilaterais dos ratos.....	48
Figura 30 –	Altura do epitélio seminífero de testículos ipsilaterais dos ratos.....	49
Figura 31 –	Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos de testículo de rato.....	52
Figura 32 –	Densidade volumétrica do epitélio seminífero, em testículos ipsilaterais de ratos.....	53
Figura 33 –	Densidade volumétrica do compartimento intertubular.....	53
Figura 34 –	Resultados das análises estatísticas do volume absoluto de vasos.....	54
Figura 35 –	Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos.....	55
Figura 36 –	Resultados das análises estatísticas do volume absoluto da túnica própria.....	56
Figura 37 –	Resultados das análises estatísticas do volume absoluto do epitélio.....	56
Figura 38 –	Resultados das análises estatísticas do volume absoluto do lúmen.....	57
Figura 39 –	Comprimento tubular nos testículos ipsilaterais dos ratos.....	58
Figura 40 –	Escore de Johnsen de testículos ipsilaterais dos ratos.....	59
Figura 41 –	Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais de 4 semanas.....	60
Figura 42 –	Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais de 6 semanas.....	61
Figura 43 –	Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais de 9 semanas.....	61
Figura 44 –	Fotomicrografia de secções transversais de túbulo seminíferos.....	62
Figura 45 –	Fotomicrografia de secções transversais de túbulo seminíferos.....	63
Figura 46 –	Proliferação celular do epitélio de testículos ipsilaterais dos ratos.....	64

Figura 47 – Proliferação celular da região intersticial de testículos ipsilaterais dos ratos.....	65
Figura 48 – Testosterona sérica dos ratos adultos.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros do Teste de Fertilidade, animais de 4, 6 e 9 semanas de idade, do grupo controle, torcidos e torcidos tratados com arginina.....	36
Tabela 2 –	Parâmetros do Teste de Fertilidade, animais do grupo torcido com 4, 6 e 9 semanas de idade.....	37
Tabela 3 –	Avaliação espermática de ratos submetidos à torção testicular, animais do grupo torcido, controle e torcido tratados com L-arginina (4, 6 e 9 semanas de idade).....	39
Tabela 4 –	Avaliações biométricas de ratos submetidos à torção testicular, animais do grupo torcido, controle e tratados com L-arginina (4, 6 e 9 semanas de idade).....	43
Tabela 5 –	Avaliações morfométricas dos túbulos seminíferos, de testículo ipsilateral de animais do grupo torcido, controle e torcido tratados com L-arginina (4, 6 e 9 semanas de idade).....	46
Tabela 6 –	Resultados das análises estatísticas da densidade volumétrica, do compartimento tubular, de animais, do grupo torcido e controle, com 4, 6 e 9 semanas.....	50
Tabela 7 –	Resultados das análises estatísticas da densidade volumétrica, do compartimento tubular, de animais, dos grupos tratados com 4, 6 e 9 semanas.....	51
Tabela 8 –	Resultados das análises do comprimento tubular, do testículo direito, de animais, do grupo controle, torcido e torcido tratado com 4, 6 e 9 semanas..	58
Tabela 9 –	Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais (grupo torcido, torcido e tratado e controle, com 4, 6 e 9 semanas).....	60
Tabela 10-	Análise da Proliferação celular, nos diferentes compartimentos do testículo de ratos (grupo torcido, torcido e tratado e controle, com 4, 6 e 9 semanas).	62

## SUMÁRIO

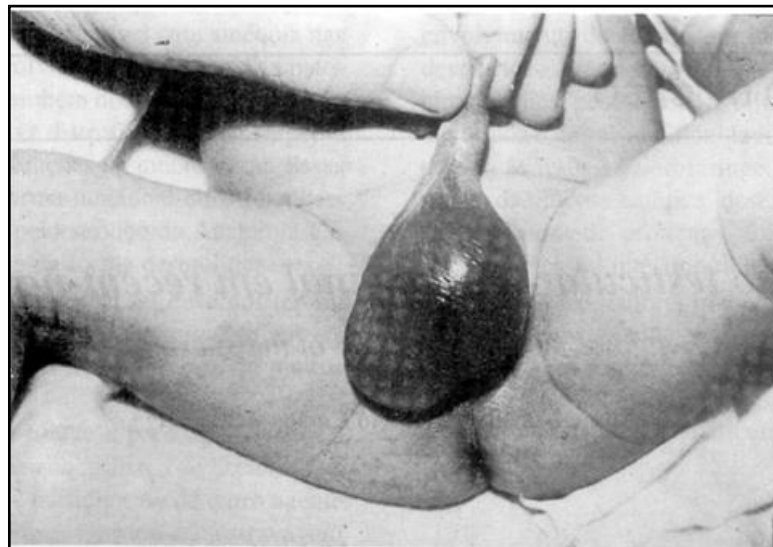
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	18
1.2	<b>Objetivo específico</b> .....	18
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	19
2.1	<b>Animais</b> .....	19
2.2	<b>Torção Testicular</b> .....	20
2.3	<b>Tratamento</b> .....	21
2.4	<b>Teste de Fertilidade</b> .....	21
2.5	<b>Avaliações dos Espermatozóides</b> .....	26
2.6	<b>Avaliação do Nível de Testosterona Sérica</b> .....	24
2.7	<b>Avaliações Biométricas</b> .....	25
2.8	<b>Análises Estruturais</b> .....	25
2.8.1	<u>Diâmetro do túbulo seminífero</u> .....	26
2.8.2	<u>Altura do epitélio do túbulo seminífero</u> .....	27
2.8.3	<u>Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares</u> .....	28
2.8.4	<u>Comprimento total dos túbulos seminíferos</u> .....	29
2.8.5	<u>Avaliação do Escore de Johnsen</u> .....	29
2.9	<b>Avaliação dos Estágios do Ciclo do Epitélio Seminífero</b> .....	30
2.10	<b>Avaliação da Proliferação Testicular</b> .....	33
2.11	<b>Análise Estatística</b> .....	34
3	<b>RESULTADOS</b> .....	35
3.1	<b>Resultado do Teste de Fertilidade</b> .....	35
3.2	<b>Resultados das Avaliações Espermáticas</b> .....	37
3.3	<b>Resultados das Avaliações Biométricas</b> .....	42
3.4	<b>Resultados das Análises Estruturais</b> .....	46
3.4.1	<u>Resultados do Diâmetro do túbulo seminífero</u> .....	46
3.4.2	<u>Resultados da Altura do Epitélio Seminífero</u> .....	48
3.4.3	<u>Resultados da Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares</u> .....	49

3.4.4	<u>Resultados do Comprimento total dos túbulos seminíferos</u> .....	57
3.4.5	<u>Resultados do Escore de Jonhsen</u> .....	58
3.4.6	<u>Resultados da Avaliação dos estágios do ciclo do epitélio seminífero</u> .....	59
3.5	<b>Resultados das Análises da Proliferação Celular</b> .....	62
3.5.1	<u>Proliferação celular da região tubular</u> .....	63
3.5.2	<u>Proliferação celular da região intersticial</u> .....	64
3.6	<b>Dosagem de testosterona sérica</b> .....	65
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	71
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
	<b>APÊNDICE A</b> - Soluções utilizadas no experimento.....	78
	<b>APÊNDICE B</b> Protocolo de análise de testosterona sérica Método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	79
	<b>APÊNDICE C</b> - Protocolo de coloração histoquímica.....	80
	<b>APÊNDICE D</b> - Protocolo de coloração imunohistoquímica antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	82
	<b>APÊNDICE E</b> - Artigo publicado.....	83
	<b>ANEXO</b> - Comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais.....	90

## INTRODUÇÃO

A torção testicular (TT) é uma urgência urológica resultado da rotação do cordão espermático (RAJU et al, 2011), gerando um comprometimento do suprimento sanguíneo testicular. Pode ocorrer em qualquer idade (FAVORITO et al, 2004), entretanto, a distribuição etária é bimodal, com dois picos, um no período neonatal (Figura1) e outro com cerca de 13 anos de idade (GUNTHER et al, 2006).

Figura 1 - Fotografia de testículo de neonato humano



Legenda: Aumento do volume escrotal esquerdo, observando-se pele com coloração escurecida decorrente da hematocele.

Fonte: TUCCI et al, 1993.

Os testículos são órgãos responsáveis pela produção dos gametas masculinos, os espermatozoides, entretanto, além da função celular, esta gônada possui função endócrina primordial para formação das características sexuais secundárias e controle da gametogênese (MOORE; DALLEY, 2007)

Localizados no interior da bolsa escrotal, os testículos, são formados na parede dorsal da cavidade abdominal, retroperitonealmente, e durante o desenvolvimento fetal, passam pelo processo de migração. Ao se deslocarem pelo canal inguinal, carregam consigo dois folhetos serosos (túnica vaginal visceral e parietal), que envolvem a túnica albugínea, cápsula de tecido conjuntivo denso que reveste o parênquima testicular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

A vascularização é realizada pela artéria testicular, que tem um trajeto tortuoso, e a drenagem sanguínea através das veias testiculares, que se ramificam e se moldam em um arranjo também tortuoso para formar o plexo pampiniforme, responsável pela termorregulação do órgão. A inervação é feita pelos ramos posterior e anterior do nervo testicular, ramo do nervo pudendo que emerge das raízes anteriores, dos pares S2, S3 e S4 de nervos espinhais (MOORE; DALLEY, 2007).

Projeções da túnica albugínea formam septos que dividem o órgão em lóbulos, no interior destes é possível observar dois tipos de regiões diferenciadas. O compartimento tubular se caracteriza por ter epitélio seminífero disposto de forma tubular em uma membrana basal, que repousa na túnica própria, entremeado com células de Sertoli. O túbulo seminífero é cercado por células mióides, que atuam no processo de contração tubular, para transportar o fluido testicular e produtos da espermatogênese ao longo do lúmen das vias reprodutivas. As células de Sertoli contribuem de forma fundamental na formação do gameta masculino, atuam sustentando, protegendo e nutrindo os espermatozoides em desenvolvimento. Também atuam na fagocitose do citoplasma residual liberado pelas espermátides maduras, na forma de corpos residuais e secretam fluido usado no transporte pelos ductos genitais, contendo uma proteína ligante de andrógeno. Além disso, formam a barreira hemato-testicular, impedindo o contato das células haploides com o sistema imunológico (RUSSEL et al, 1990).

A linhagem germinativa das células espermáticas sofre uma cascata de transformações caracterizadas por sucessivas divisões celulares mitóticas e meióticas, controladas pela secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), denominada espermatogênese. Um evento temporal, ordenado e bem definido, em que, células germinativas indiferenciadas dão origem aos espermatozoides maduros, é dividido em três etapas. A primeira, proliferação, que se caracteriza por mitoses sucessivas (LOUIS HERMANO et al, 2010) que transformam as células germinativas em diferentes tipos de espermatogônias. Estas por sua vez sofrem crescimento do volume citoplasmático, dando origem aos espermatócitos I. A segunda etapa, meiótica, ocorre após duplicação e recombinações gênicas (pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), formando o espermatócito II, seguido por meiose reducional, dando origem às células haploides denominadas espermátides. A terceira etapa é conhecida como metamorfose ou espermiogênese, se resume a grandes transformações citoplasmáticas e nucleares, com formação de acrossoma, cabeça e flagelo, que culminam no surgimento do espermatozóide.

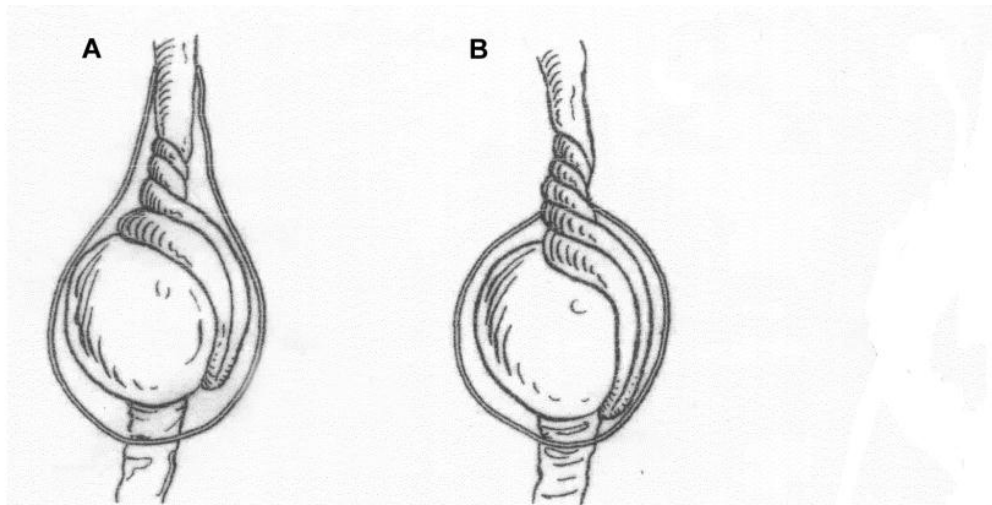
O compartimento intersticial se caracteriza por células de tecido conjuntivo, raras, que entremeiam a membrana basal e células mioepiteliais. Além destas, células de Leydig, nervos,

vasos linfáticos e sanguíneos dividem espaço com alguns macrófagos. Os capilares testiculares não são fenestrados e os vasos linfáticos são canais irregulares, ou sinusóides, incompletamente delimitados pelas células endoteliais (FAWCETT, 1973). A testosterona é produzida pelas células de Leydig, nos testículos adultos, e secretada no líquido testicular intersticial, bem como, nos capilares ao redor dos túbulos seminíferos. A concentração deste hormônio no tecido é muito alta, cerca de 50 a 100 vezes maior, do que a concentração sérica (TURNER, 1985). A produção de testosterona aumenta gradualmente, desde o período pré-púbere, até a idade adulta, coincidindo com o desenvolvimento de células de Leydig adultas. Uma vez formadas, células deste tipo, raramente morrem, ou se dividem (STANLEY et al, 2012). O hormônio luteinizante (LH), liberado pela hipófise, atua nas células de Leydig, que produzem testosterona. Receptores para este hormônio são encontrados nas células de Sertoli e nas espermatogônias do túbulo seminífero. Por difusão, a testosterona atravessa os espaços linfáticos, peritubulares, atua sobre o compartimento intertubular, estimulando a espermatogênese. O hormônio folículo estimulante (FSH), também secretado pela hipófise, estimula a gametogênese masculina, atuando nos receptores das células do compartimento tubular (RUSSELL, 1990).

A torção testicular é caracterizada pela rotação do cordão espermático, gerando comprometimento do suprimento sanguíneo do testículo (KUTLU et al, 2010). Os pacientes acometidos se apresentam com rubor, edema e dor escrotal (muitas vezes não associada a trauma) além de náuseas e vômito (LAVELEE; CASH, 2005). Quanto à etiologia, pode ser classificada de duas formas, como intravaginal ou extravaginal (Figura 2) (KAPOOR, 2008). A primeira é a mais comum, geralmente associada à alteração da túnica vaginal, como inserção alta no cordão espermático, o que gera uma pendulação anormal, caracterizada por aumento da mobilidade testicular. A incidência é maior, em crianças, adultos e principalmente jovens (SESSIONS et al, 2003). A modalidade extravaginal é usualmente vista no período natal e pré-natal (KAPOOR, 2008), sem alterações anatômicas identificadas.



Figura 2 - Classificação dos tipos de torção testicular



Legenda: A) Torção intravaginal; B) Torção extravaginal.  
Fonte: FAVORITO et al, 2004.

Essa emergência, relativamente comum, precisa ser tratada rapidamente, para que os testículos não sofram danos permanentes. Pois tanto a espermatogênese, quanto à produção de esteroides, das células de Leydig, são vulneráveis ao estresse oxidativo, apesar da baixa tensão de oxigênio, provocada pela pobre vascularização característica deste tecido (ELSHAARI et al, 2011).

Quando o testículo se torce sobre seu eixo, a irrigação do órgão é interrompida e quando não restabelecida em até 6-8 horas gera danos irreversíveis (CUMMINGS et al, 2002). Após este período, mesmo realizando-se a orquiectomia do testículo, o órgão contralateral pode ser afetado, com consequente subfertilidade (PRATER; OVERDORF, 1991; FILHO et al, 2004).

O processo de isquemia/reperfusão pode ser dividido em duas fases distintas, a primeira ocorre imediatamente antes da reperfusão e se estende por poucas horas. É uma situação típica de estresse oxidativo, onde a injúria é, em termos, consideravelmente reversível. A segunda fase se estende por horas e até dias, dependendo da manutenção do insulto do estresse oxidativo, gerando danos teciduais irreversíveis e inflamação, com aporte de infiltrado neutrofílico e recrutamento de macrófagos (FILHO et al, 2004).

A principal causa do dano testicular é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a reperfusão. Durante o período de hipóxia, o catabolismo de adenosina trifosfato (ATP) leva ao acúmulo de metabólitos das purinas, as hipoxantinas. Nesse período a

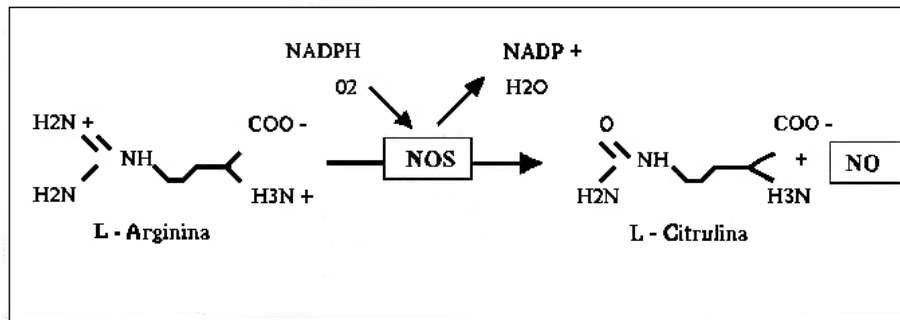
xantino desidrogenase é convertida em xantino oxidase. Quando ocorre a reperfusão, o grande aporte de oxigênio é substrato para oxidação das purinas, formação de xantina e esta em ácido úrico, como subprodutos dessa reação, aparecem uratos e ROS (SILVA et al, 2010). Esses radicais livres são moléculas instáveis ou fragmentos de moléculas sem um par de elétrons em suas órbitas exteriores. Inclui-se o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila (OH) (CÓRDOVA; NAVAS, 2000). Essas substâncias oxidam a membrana lipídica, proteínas e o DNA, conduzindo às disfunções e morte celular (HEKIMOGLU et al, 2009).

A tolerância dos tecidos a isquemia é variável e multifatorial, dependendo do tempo de isquemia, das necessidades metabólicas dos tecidos, do aporte da circulação colateral e de fatores humorais (NETO et al, 2005). O testículo dos mamíferos é extremamente sensível ao dano oxidativo de radicais livres; as células germinativas são severamente danificadas e morrem depois de expostas a qualquer aumento de tensão de oxigênio (FILHO et al, 2004).

O óxido nítrico (NO) apresenta um papel controverso, na injúria da isquemia/reperfusão (TAHA et al, 2012), ele pode mediar vários fenômenos, como citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea basal e microcirculação medular e glomerular (KUROSE et al, 1994). Mantém um estado de vasodilatação persistente, mas, também pode, com o aparecimento dos radicais livres, tornar-se um potente oxidante ao combinar-se com o radical hidroxila (BOVERIS, 1998).

Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina (Figura 3) produz o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) (KUO; SCHROEDER, 1995). Essa enzima, em sua isoforma endotelial, tem sua expressão em humanos, significativamente suprimida, pela hipóxia (WONG, 1996). A redução dos níveis de NO em tecidos após isquemia/reperfusão pode ser devida à inativação da NOS e inativação do próprio NO pelo superóxido, que é produzido nesses tecidos (KUROSE et al, 1994).

Figura 3 – Desenho da fórmula estrutural de L-arginina, na síntese de Óxido Nítrico



Legenda: O aminoácido L-arginina (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) é oxidado pela enzima óxido nítrico-sintetase (NOS), em presença de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e oxigênio (O<sub>2</sub>), formando L-citrulina (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) e Óxido Nítrico (NO).

Fonte: COSTA et al, 1999.

Alguns pesquisadores tem se concentrado em medicamentos que podem prevenir a injúria da inquemia/reperfusão, o aluporinol, o éster fenetil do ácido caféico, a vitamina E, verapamil e o sildenafil, tem mostrado resultados promissores (KEHINDE; BOZLU, 2005; SALMASI et al, 2005). A L-arginina também mostrou um forte efeito protetor, observada na fase de reperfusão, quando injetada no início do processo isquêmico de fígado de ratos (TAHA et al, 2012). É um aminoácido básico, substrato da síntese de importantes moléculas, incluindo o NO (WANG et al, 2008), tem ação benéfica contra doenças cardiovasculares, pulmonares, renais, gastrintestinais, estimula o sistema imune, bem como a cicatrização tecidual e manutenção da integridade do tecido (WU et al, 2008, 2009). Melhora o fluxo sanguíneo após a torção testicular e possui efeito protetor no testículo contralateral (BARLAS et al, 2002). Em estudos de transplante renal o exame histológico mostrou que a necrose tubular aguda foi significativamente diminuída em rins transplantados, tratados com uma combinação de L-arginina e  $\alpha$ -tocoferol (SHOKEIR et al, 2011).

Diversos estudos mostram as injúrias da TT em ambos os testículos de ratos púberes e adultos, bem como métodos para proteção contra as lesões provocadas pela isquemia e reperfusão testicular (AKTAS et al, 2010). Contudo, ainda não foram comparadas alterações na função reprodutiva de ratos, tratados com L-arginina, após TT. Além disso, poucos são os estudos sobre esta afecção em modelo animal pré-púbere. Até o presente momento, não se comparou as alterações provocadas, pela torção testicular, em ratos, à função reprodutiva, produção espermática (da amostra de sêmen à avaliação histológica do ciclo do epitélio) em diferentes etapas de maturidade sexual.

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivos gerais**

O objetivo do presente trabalho foi estudar as alterações testiculares em ratos adultos que sofreram TT na idade pré-púbere (4 semanas), púbere (6 semanas) e adulta jovem (9 semanas), bem como o efeito do tratamento com L-arginina.

### **1.2 Objetivos específicos**

Avaliar as alterações morfológicas e reprodutivas causadas pela TT no testículo torcido e contralateral, comparando-os com seus controles, nas diferentes idades.

Avaliar o efeito do tratamento com L-arginina como protetor antioxidante, contra os danos causados pela torção testicular no testículo torcido e no testículo contralateral.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Animais

Foram utilizados 82 ratos machos e 246 fêmeas para todo o experimento. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas em condições controladas de temperatura e ciclo claro/escuro. Receberam água e ração comercial (Nuvilab, Nuvital Ltda®, Colombo, Paraná, BR) *ad libidum* durante todo o experimento.

Os animais machos foram divididos em três grandes grupos, de acordo com a idade que os animais sofreram a torção testicular (4, 6 e 9 semanas). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos contendo até 10 animais cada, como descritos no quadro a seguir:

Quadro 1 - Distribuição dos animais de acordo com a idade cirúrgica e o tipo de intervenção

IDADE CIRÚRGICA	GRUPOS		
	CONTROLE	TORCIDO	TRATADO L - ARGININA
4 SEMANAS (Pré-púbere)	Ctrl 4 (n=10)	TT 4 (n=10)	ARG 4 (n=08)
6 SEMANAS (Púbere)	Ctrl 6 (n=10)	TT 6 (n=09)	ARG 6 (n=08)
9 SEMANAS (Adulto)	Ctrl 9 (n=10)	TT 9 (n=09)	ARG9 (n=08)

Legenda: Grupos Controles – animais que sofreram cirurgia de simulação da torção testicular, em idade pré-púbere (**Ctrl4**), em idade púbere (**Ctrl6**) e idade adulta (**Ctrl9**). Grupos Torcidos – animais que sofreram a torção testicular, idade pré-púbere (**TT4**), em idade púbere (**TT6**) e idade adulta (**TT9**). Grupos Torcidos e Tratados – animais que sofreram cirurgia de torção testicular e tratamento com L-arginina por 7 dias a partir da torção, em idade pré-púbere (**ARG4**), em idade púbere (**ARG6**) e idade adulta (**ARG9**).

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Todos os machos foram submetidos à eutanásia com 14 semanas de idade por overdose anestésica (tiopental sódico, 100 mg/Kg, injetado por via intraperitoneal). As fêmeas foram utilizadas como matrizes no teste de fertilidade.

## 2.2 Torção testicular

Os animais dos grupos que sofreram torção testicular (TT4, ARG4, TT6, ARG6, TT9 e ARG9), foram mantidos em plano anestésico adequado pela administração de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) pela via intraperitoneal, doses adicionais foram administradas individualmente conforme a necessidade.

O testículo direito foi exposto pela incisão da bolsa escrotal e túnica vaginal e então rotacionado em 720 graus, no sentido horário, sendo fixado nesta posição por sutura com fio de poligalactina 910 6-0 (JEONG et al, 2010). A bolsa escrotal foi então suturada.

Os animais dos grupos de cirurgia simulada (Ctrl4, Ctrl6 e Ctrl9), também sobre o mesmo protocolo anestésico descrito acima, tiveram os testículos direitos expostos pela mesma abordagem cirúrgica e fixados na posição anatômica normal, no entanto não foram rotacionados. A bolsa escrotal foi suturada da mesma maneira que nos grupos torcidos.

Todos os grupos foram mantidos nessas condições durante 4 horas (Figura 4). Após este período, a bolsa escrotal foi novamente aberta, as suturas de fixação do testículo foram removidas, os testículos dos animais dos grupos TT4, ARG4, TT6, ARG6, TT9 e ARG9 foram destorcidos e colocados em posição anatômica e a bolsa escrotal suturada com fio de poligalactina 910 6-0.

Figura 4 - Fotografia de ratos em plano anestésico, após torção

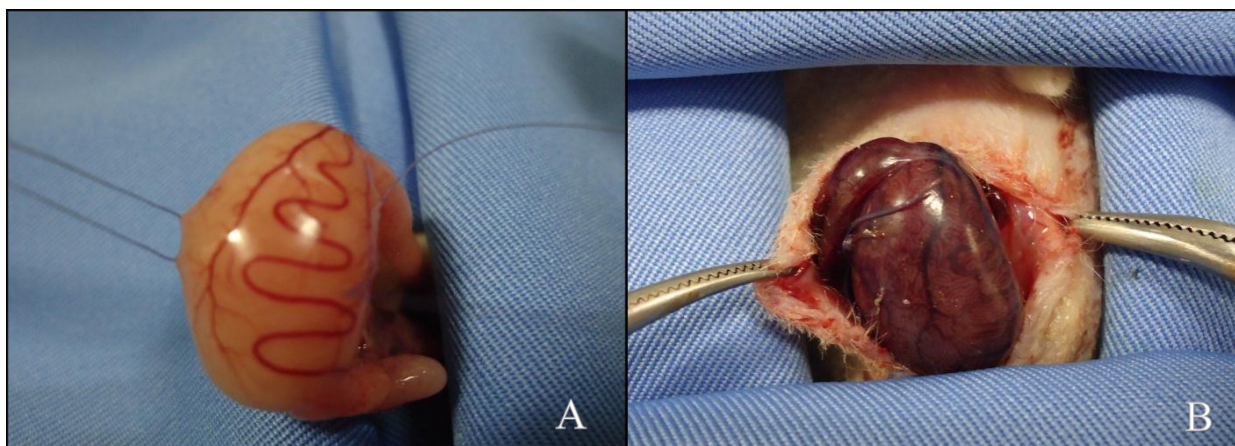


Legenda: Animais em manutenção anestésica, pós-cirúrgica. Acompanhamento de parâmetros respiratórios e controle de temperatura. Laboratório de Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Fonte: MILHOMEM, 2012.

Alterações macroscópicas dos testículos percebidas nesta ocasião (edema, congestão venosa, isquemia) foram anotadas (Figura 5).

Figura 5 - Imagem do procedimento cirúrgico experimental em rato de 9 semanas



Legenda: Em **A**, testículo direito, no momento anterior à torção testicular, parâmetros de coloração e posicionamento normais. Em **B**, foto do mesmo testículo, torcido por quatro horas, momentos antes da destorção. Alteração de parâmetros colorimétricos e posicionamento.

Fonte: MILHOMEM, 2012.

### 2.3 Tratamento

Os grupos tratados (ARG4, ARG6 e ARG9) receberam dose oral diária de L-arginina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) a 650 mg/kg, por via oral (PICANÇO et al, 2011) diariamente, durante 7 dias, a partir da torção, por gavagem.

### 2.4 Teste de fertilidade

Na 12ª semana de vida, cada macho (independente do grupo) foi submetido a teste de fertilidade com três fêmeas (MOTRICH et al, 2007). Para tal, os machos foram colocados em uma caixa com uma fêmea no período de estro, ficando com a fêmea durante um período de 12 horas. A cópula foi confirmada pela presença de sêmen, visualizada microscopia de luz

(Olympus BH-2, Tóquio, Japan), em aumento de 200x, em citologias de amostras vaginais (Figura 6). Foi devidamente registrada qual fêmea foi posta para reprodução com qual macho.

Figura 6 – Fotomicrografia de citologia vaginal de rata



Legenda: Amostra vaginal, coletada por swab, 12 horas após permanência da fêmea com o macho. A seta aponta presença de espermatozói-de, confirmando a cópula. Laboratório de Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: Vermelho de Shorr e H-E 200x.

Fonte: MILHOMEM, 2012.

No vigésimo dia de gestação as fêmeas sofreram eutanásia, por overdose de tiopental sódico intraperitoneal. O útero foi exposto e o número de sítios de implantação foi contado e anotado. O número de corpos lúteos de ambos os ovários foi contado sob magnificação. O número de fetos formados, e não formados foi contado, e o peso e a circunferência torácica de cada feto a termo foram quantificados.

A potência, ou habilidade do macho de copular, foi calculada como a proporção do número de fêmeas copuladas para o número de fêmeas postas para copular. O índice de fertilidade foi calculado como a relação do número de sítios de implantação para o número de corpos lúteos. A fecundidade foi calculada como a proporção entre o número de ratos machos que geraram pelo menos um feto viável para o número de ratos postos para acasalar, como exposto a seguir:

- O índice de perda pré-implantação foi calculado pela fórmula:

$$\frac{[\text{número de corpos lúteos}]}{[\text{número de sítios de implantação}]}$$



[número de corpos lúteos]

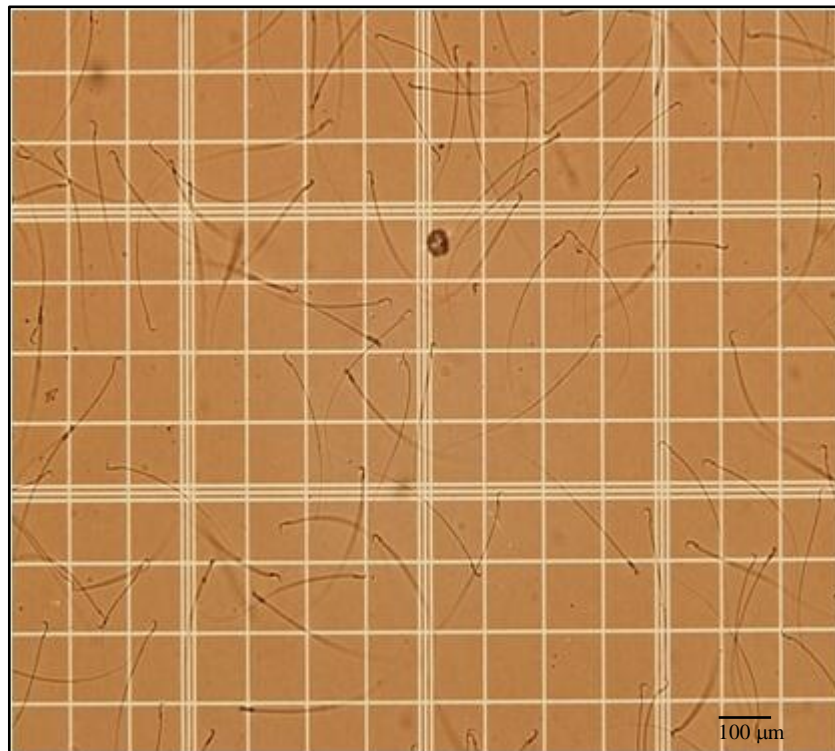
- O índice de perda pós-implantação foi calculado pela fórmula:

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

## 2.5 Avaliações dos espermatozoides

Imediatamente após a eutanásia os epidídimos de ambos os testículos foram coletados. A cauda do epidídimo foi ressecada, seccionada e lavada em 5 ml de tampão (PBS/BSA 0,5% - SIGMA®) para coleta dos espermatozoides (OZAKI et al, 2002). Foram avaliadas concentração espermática (Figura 7), motilidade e integridade e funcionamento da membrana plasmática através do teste hipo-osmótico (JEYENDRAN et al, 1984).

Figura 7 - Fotomicrografia da câmara de Neubauer espelhada



Legenda: Amostra de concentrado espermático, utilizada para análise de motilidade e concentração.

Nota: 100x.

Fonte: MILHOMEM, 2012.

Alíquotas de amostras foram diluídas, conforme o grau de turbidez e depositadas em câmara de Neubauer, para visualização em microscópio de contraste de fase (Nikon H550S, Tóquio, Japão). Foram realizadas micrografias sequencias, através da câmara acoplada (Basler, Ahrensburg, Alemanha) e a motilidade espermática foi mensurada, em percentual, através da diferença do número total de espermatozoides quantificados (n=200) pelo o número de espermatozóides imóveis durante a análise. Para concentração, foram contados 5 quadrantes menores, no interior do quadrante central da câmara de Neubauer e o número aproximado foi atingido através da fórmula demonstrada a seguir:

$$\bullet \text{ Concentração} = N^{\circ} \text{ de sptz} \times (\text{fator de correção}) \times (\text{fator de diluição})$$

Onde, fator de correção = 50000;

Fator de diluição = 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 (dependendo da diluição das amostras se = 0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, respectivamente).

As análises de concentração e motilidade foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador e ao mesmo tempo no microscópio com contraste de fases, para melhor identificação da mobilidade da cauda (em aumento de 100x). Para o teste hipo-osmótico, foi feita diluição em solução hiposmótica de 100 mOsm/L e mantidos por 30 minutos à temperatura de 37°C. Após este período, foi coletado 10 µl da solução, desprezado sobre lâmina previamente aquecida à 37°C e identificada, coberto com lamínula e levada para avaliação direta em microscopia de luz em aumento de 200x (Olympus BH-2, Tóquio, Japão). Foi então avaliado o percentual de espermatozoides apresentando dobramento de cauda, em 200 espermatozoides.

## 2.6 Avaliação do nível de testosterona sérica

Amostras sanguíneas, de aproximadamente 5 ml, foram coletadas de cada animal, durante plano anestésico profundo, através de punção intracardíaca, conforme mostra a figura 8.

Figura 8 - Fotografia de rato no momento da coleta de sangue



Legenda: Punção intracardíaca, em plano anestésico profundo, por sobredose de tiobarbitúrico (IP). Laboratório de Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Fonte: MILHOMEM, 2013.

As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio tipo "*falcon*" (15 mL), para extração do soro, e foi utilizado 3.000 rpm por 3 minutos em centrífuga. Com auxílio de pipeta analítica, foram extraídos em média, 1,5mL de soro por amostra, que posteriormente foram separadas alíquotas, acondicionados em "*ependorfs*" e congelados. Para a análise foi utilizado o método de ensaio imuno-enzimático (ELISA), com o kit para detecção de testosterona (E90458Ge,USCN, Houston, EUA).

## 2.7 Avaliações biométricas

Os testículos foram pesados (g) em balança de precisão e o volume (cm<sup>3</sup>) medido pelo método de Scherle (SCHERLE, 1970). Os animais foram pesados (g) semanalmente.

## 2.8 Análises estruturais

Cada testículo foi fixado por imersão em solução de Bouin por 24 horas. Após este período o órgão foi clivado (com lâmina de microtomia) para pós-fixação em formalina 10%

e glutaraldeído 2,5%. Após o processamento histológico de rotina as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (H-E) para as seguintes análises:

### 2.8.1 Diâmetro do túbulo seminífero

Para esta análise, 5 túbulos seminíferos de 5 campos aleatórios de 5 cortes, de cada testículo, foram micrografados através da câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio (Olimpus BX51, Tóquio, Japão), no aumento de 100 vezes, utilizando o programa de captura (ImagePro, versão 5.0.1.26). Ao total, 125 túbulos seminíferos de cada testículo foram mensurados ( $\mu\text{m}$ ) através do programa de tratamento de imagem (ImageJ, versão 1.46). Com a ferramenta "*straight*" foi traçada uma linha reta, a partir da túnica própria, até o outro lado, passando pelo centro do túbulo. Sempre utilizando os túbulos mais arredondados possíveis (Figura 9).

Figura 9 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, para análise de diâmetro do túbulo seminífero



Legenda: Túbulos seminíferos, de testículo contralateral, de rato do grupo controle. Linha traçada com ferramenta "*straight*", aferição dos túbulos arredondados. Laboratório de Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

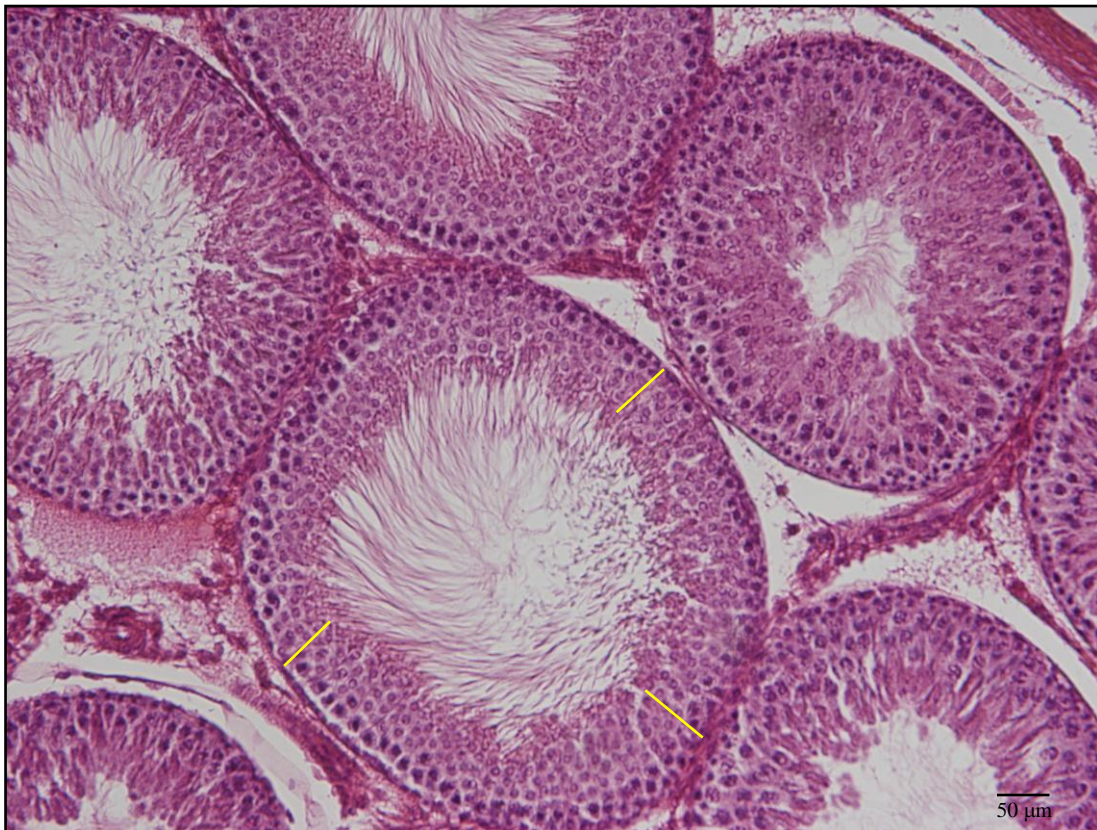
Nota: H-E, 100x, resolução 2040x1536

Fonte: MILHOMEM, 2012.

### 2.8.2 Altura do epitélio do túbulo seminífero

Para a altura do epitélio, 5 túbulos seminíferos de 5 campos aleatórios de 5 cortes, de cada testículo, foram micrografados através da câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão), no aumento de 200 vezes, utilizando o programa de captura (ImagePro, versão 5.0.1.26). Ao total, 125 túbulos seminíferos de cada testículo foram mensurados ( $\mu\text{m}$ ) através do programa de tratamento de imagem (ImageJ, versão 1.46). Com a ferramenta "*straight*" foram traçadas três linhas distribuídas uniformemente, da túnica própria até a célula mais apical do epitélio seminífero (das células germinativas às espermatídes). Foi utilizada a média das mensurações em  $\mu\text{m}$  (Figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, para análise de altura do epitélio seminífero



Legenda: Túbulos seminíferos, de testículo contralateral, de rato do grupo controle. Linhas traçada com ferramenta "*straight*", aferição dos túbulos arredondados. Laboratório de Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

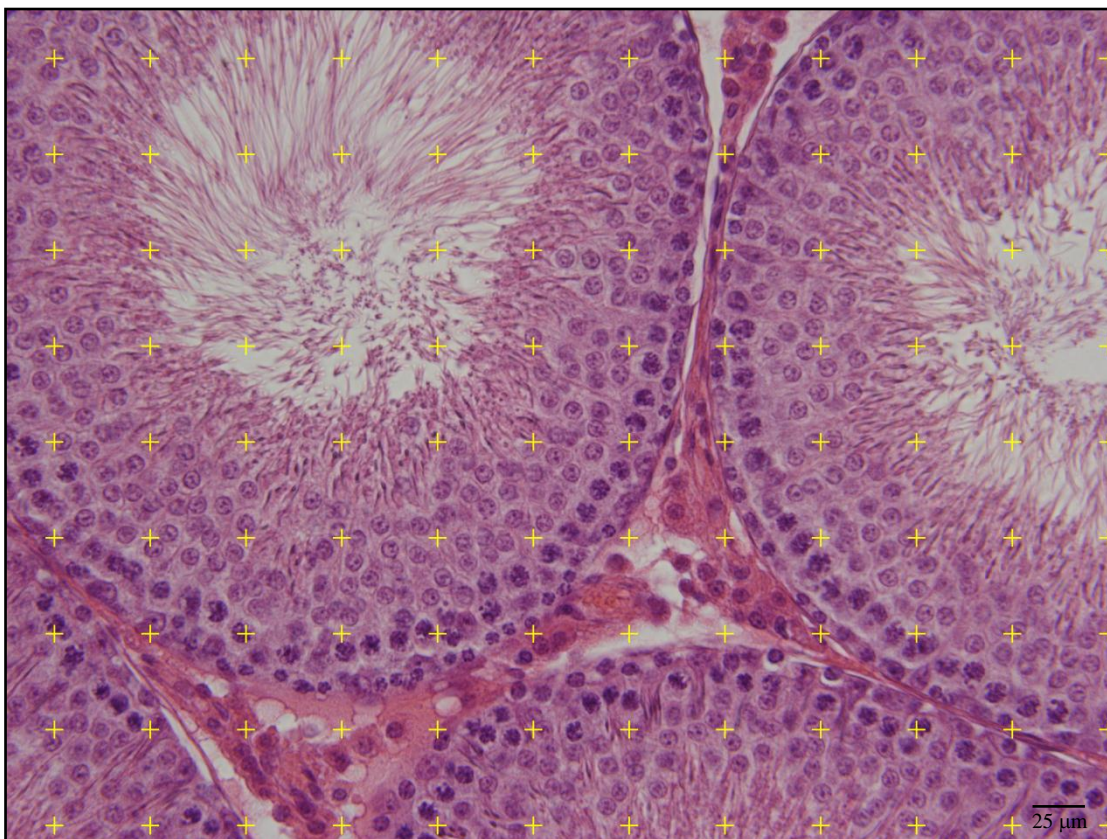
Nota: H-E, 200x, resolução 2040x1536.

Fonte: MILHOMEM, 2012.

### 2.8.3 Densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares

Para esta análise, foram utilizados 5 campos aleatórios, de cada corte, foram micrografados através da câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão), no aumento de 400 vezes, utilizando o programa de captura (ImagePro, versão 5.0.1.26). Foi montada uma grade de 100 pontos (Figura 11), através do programa de tratamento de imagem (ImageJ, versão 1.46). O compartimento tubular (membrana basal, epitélio seminífero e lúmen) e a região intertubular (interstício e vasos sanguíneos) que foram quantificadas, se sobrepunham à interseção da cruz da grade de 100 pontos. Após a contagem de um total de 2500 pontos por testículo, foi feita a média dos percentuais encontrados e o resultado desta análise foi denominado de Densidade Volumétrica (VV). Os dados foram tabulados em planilha do programa Excel (Microsoft 2007).

Figura 11 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, para análise densidade volumétrica



Legenda: Testículo contralateral, de rato do grupo controle, sobreposição de grade de 100 pontos no parênquima e estroma testicular. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: H-E, 400x, resolução 2040x1536.

Fonte: MILHOMEM, 2012.

#### 2.8.4 Comprimento total dos túbulos seminíferos

Com base nos parâmetros de densidade volumétrica do compartimento tubular, volume testicular e diâmetro tubular médio, o comprimento total dos túbulos, em metros, foi calculado utilizando a fórmula a seguir:

$$\bullet \text{ Volume do Cilindro} = \pi \times r^2 \times h$$

Onde  $\pi = 3,14$ ,  $r =$  raio e  $h =$  altura.

O volume total dos túbulos foi encontrado multiplicando a densidade volumétrica das estruturas do compartimento tubular com o volume testicular. Para o raio do túbulo seminífero, foi utilizado o parâmetro diâmetro tubular médio, dividido por dois. O valor de  $\pi$  foi considerado com 3,14. A variável altura foi considerada com sendo o comprimento total dos túbulos, sendo mensurada em metros. A fórmula abaixo resume o calculo utilizado para esta análise:

$$\bullet \{ ( Vv[ct] \times VT ) / ( D[ts]/2 )^2 \times \pi \}$$

Onde:  $Vv[ct]$  = densidade volumétrica do compartimento tubular,

$VT$  = volume do testículo,

$D[ts]$  = diâmetro do túbulo seminífero,

$$\pi = 3,14$$

#### 2.8.5 Avaliação do Escore de Johnsen

Esta análise qualitativa foi realizada diretamente em microscopia de luz (Nikon H550S, Japan) com aumento de 400x. Foi utilizado este escore para avaliação da lesão do epitélio seminífero de 50 túbulos por testículo. Segundo este escore (JOHNSEN, 1970), um valor de 1 a 10 é dado a cada um dos túbulos de acordo com a maturação das células germinativas: 10 para espermatogênese completa, com muitos espermatozóides e epitélio germinativo organizado com espessura regular deixando um lúmen aberto; 9 para muitos espermatozóides presentes, mas epitélio germinal desorganizado com descamação ou obliteração do lúmen; 8 para apenas alguns poucos espermatozóides; 7 para nenhum

espermatozóide mas muitas espermátides presentes; 6 para nenhum espermatozóide e poucas espermátides (menos de 5); 5 para nenhum espermatozóide e espermátide mas vários espermátocitos presentes; 4 para poucos espermátocitos (menos de 5) 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 na seção tubular.

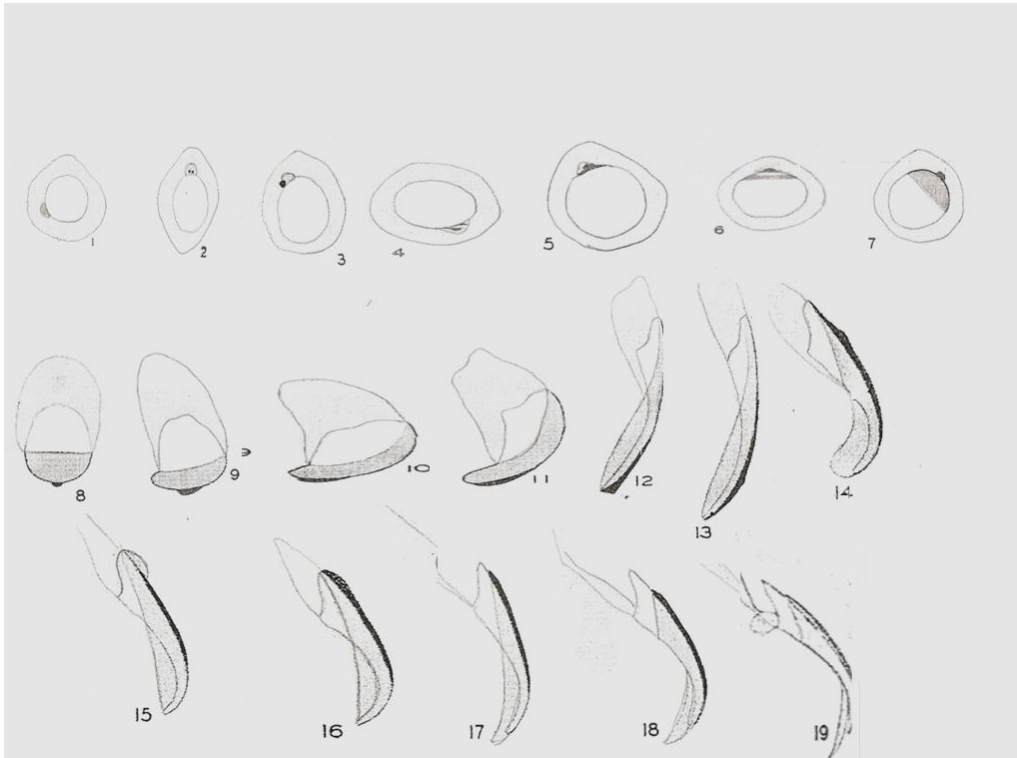
## 2.9 Avaliação dos Estágios do Ciclo do Epitélio Seminífero

Para tal análise, as lâminas foram coradas por técnica histoquímica, com Ácido Periódico de Schiff (PAS), contracorados em H-E. O reativo de Schiff é composto por fucsina básica e tem como característica marcar glicoproteínas, derivadas do complexo de Golgi, presentes no citoplasma das espermátides, conferindo a coloração roxo-púrpura aos componentes do acrossoma ao redor do núcleo. Os estágios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados com base no desenvolvimento do sistema acrossomal e morfologia do núcleo da espermátide (SILVA et al, 2010). A frequência relativa de cada fase foi determinada através da avaliação de 150 túbulos seminíferos em 5 cortes, de ambos os testículos, através da câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão), em aumento de 1000 vezes, sob imersão em óleo (Nikon, Tóquio, Japão), utilizando o programa (ImagePro, versão 5.0.1.26).

A espermiogênese de ratos possui 19 fases (Figura 12), classificadas de acordo com a morfologia do núcleo e o sistema acrossomal (LEBLOND; CLERMONT, 1952). As três primeiras fases 1-3 são consideradas Fase de Golgi, onde ocorre a formação da vesícula idiossomal, dos grânulos pró-acrossomais e sua união, resultando no grânulo acrossomial. Na fase seguinte, Fase Capuchão, 5-7, o grânulo acrossômico se torna achatado e sai da membrana do idiossoma, acompanhando o núcleo da espermátide, até cobrir 1/3 (um terço) do mesmo. Na Fase do Acrossoma, 8-14, o núcleo começa a se alongar e o citoplasma se direciona para porção caudal, a cabeça se fixa no ângulo dorsal. E a última fase, Maturação, 15-19, a membrana desaparece, o acrossoma se estende ao longo do ângulo dorsal, exposição da região ventral e perda de afinidade do acrossoma com o corante. Terminando com o espermatozoide completo, pronto para ser carregado pelo fluxo espermático gerado pelas células mioepiteliais.



Figura 12- Desenho esquemático da metamorfose das espermatídes



Legenda: A imagem está mostrando as 19 fases da espermiogênese de ratos.

Fonte: LEBLOND; CLERMONT, 1952.

Segundo Leblond e Clermont (1952), a espermatogênese nos ratos foi dividida em XIV estágios com base nas diferentes fases da espermiogênese (Figura 13). O intervalo de tempo, em um segmento do túbulo, entre o início da formação de espermatídes e seu término é conhecido como ciclo do epitélio, com duração de aproximadamente 13 dias no rato. São necessários, aproximadamente, 4 ciclos e meio (AMANN; SCHANBACHER, 1983) para que uma espermatogônia do Tipo A, se transforme em espermatozóides, isto são 65 dias, no rato (LOUIS HERMANO et al, 2010).

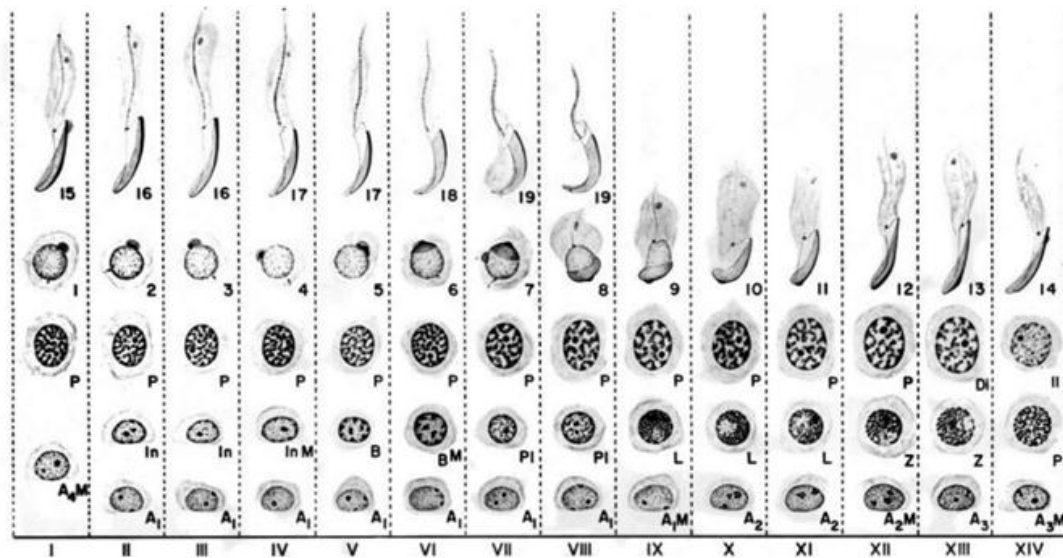
De acordo com as análises de Leblond e Clermont (1952) os estágios iniciais (I-VI) se caracterizam por exibir em diferentes camadas de uma mesma região do túbulo, células da linhagem germinativa, como as espermatogônias do Tipo A, indeterminadas, ou do Tipo B, em um nível superior espermatócitos I em paquíteno, mais espermatídes jovens em desenvolvimento inicial (fase 1 a 8), contrastando com espermatídes maduras, mais próximas do lúmen, em estágio finais de desenvolvimento (fase 15 à 19).

A característica marcante do Estágio VII é a presença de espermatídes imaturas na fase 19, que começam a perder reatividade com PA-FSA, no lúmen do túbulo. No Estágio VIII

ocorre, a dispersão de espermatozoides livres no lúmen e corpos residuais (resíduo citoplasmático).

Nos estágios mais avançados (IX-XIV), após o lançamento dos espermatozoides prontos na luz do túbulo, que são carreados pela onda de contração mioepitelial, ocorre o alongamento e achatamento do núcleo das espermatídes mais jovens, formando uma camada sólida. Corpos residuais desaparecem gradativamente. As poucas espermatogônias Tipo A se encontram em mitose, os espermatócitos formam duas camadas, uma primeira, na forma imatura (pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno e paquíteno) e na segunda maduros (paquíteno e diplóteno), ou espermatócito II. Ao fim de um ciclo, um novo ciclo se inicia.

Figura 13- Diagrama esquemático dos estágios do ciclo do epitélio seminífero de ratos



Legenda: Os estágios indicados pelos números romanos de I – XIV, em cada coluna, com seus diferentes tipos celulares. Onde espermatogônia do Tipo A ( $A_{1-4}$ ), intermediária (In) e do Tipo B (B). Espermatócito primário em Pré-leptóteno (Pl), Leptóteno (L), Zigóteno (Z), Paquíteno (P) e Diplóteno (D). Espermatócito secundário (II) e desenvolvimento da Espermatíde de 1 -19. (M) representa divisão mitótica.

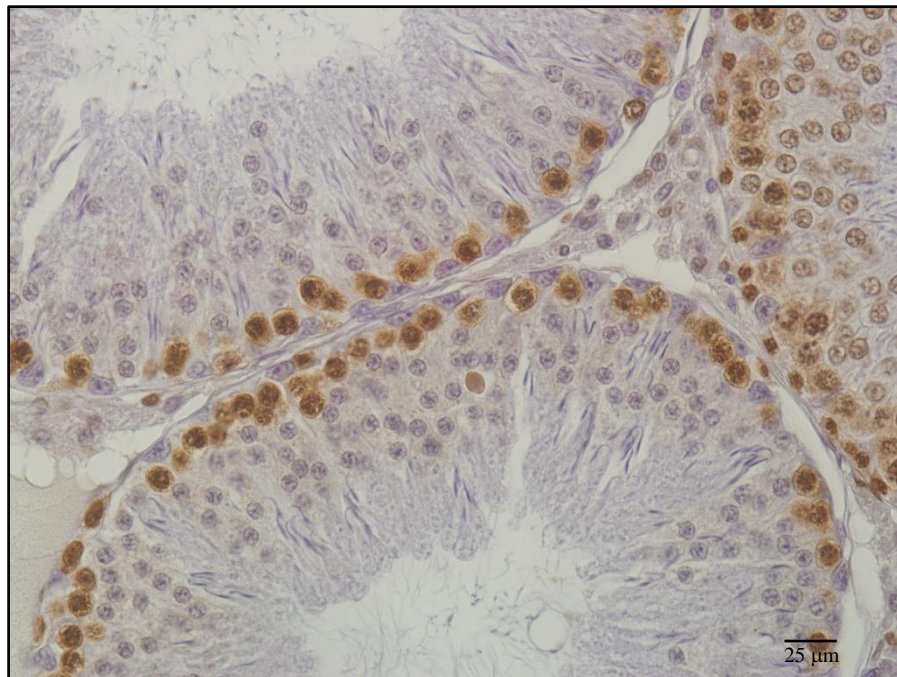
Fonte: LOUIS et al, 2010.

Foram classificados os XIV estágios do ciclo (conforme descritos anteriormente), entretanto, como a mudança de Estágio II para o III ocorre de forma muito sutil, convencionou-se a classificação conjunta, neste trabalho. A frequência relativa dos estágios foi atingida pelo cálculo em percentual.

## 2.10 Avaliação da Proliferação Testicular

Para esta avaliação foi utilizada uma técnica imunohistoquímica, pelo método de imunomarcção do antígeno nuclear de proliferação (PCNA), com anticorpo monoclonal anti-mouse anti-PCNA (18110, Camarillo, EUA), contracoradas em H-E. Foram micrografadas, no aumento de 400 vezes, com auxílio do programa (DP Controller, versão 3.3.1.222), através da câmera (Olympus DP71, Tóquio, Japão), acoplada ao microscópio (Olimpus BX51, Tóquio, Japão). Ao total, 20 campos, de cada testículo, foram selecionados de maneira aleatória, em pelo menos duas lâminas, com cortes imunomarcados. Com o programa de imagem (ImageJ, versão 1.46), através da ferramenta "cell counter" e "freehand selections", foi possível quantificar o número de núcleos em proliferação, em uma dada área ( $\text{mm}^2$ ). As análises foram realizadas tanto no compartimento tubular, quanto no intertubular. Os resultados obtidos foram tabulados no programa Excel 2007, realizando o cálculo da média de células em proliferação sobre a média da área calculada em  $\text{mm}^2$ .

Figura 14 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo de rato, análise de proliferação celular



Legenda: Túbulos seminíferos com núcleos de células germinativas imunomarcadas, evidenciando a proliferação do epitélio. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: PCNA, 400x, resolução 2040x1536.

Fonte: MILHOMEM, 2013.

## 2.11 Análise estatística

Os dados foram tabulados e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste de ANOVA com pós-teste de Bonferroni (para os dados paramétricos) ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (para os dados não-paramétricos). Para tal, foi utilizado o software Graphpad Prism. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

Este estudo revelou que a torção testicular experimental de 720° por 4 horas, causou severos danos morfofuncionais nos testículos ipsilaterais de ratos adultos, independente da idade de maturidade sexual que ocorreu.

#### 3.1 Resultado do teste de fertilidade

Os resultados obtidos através do teste de fertilidade, de todos os grupos, foram organizados na tabela 1, e mostram que ocorreu diminuição na maioria dos parâmetros analisados, nos animais torcidos (TT4, TT6 e TT9). Apesar disto, não houve diferença em relação à fecundidade, perda pós-implantação, peso dos fetos, circunferência torácica fetal e número de fetos por ninhada, entre os grupos controle, torcido e torcido tratado com L-arginina, nas diferentes idades. Não houve diferença nos resultados do teste de fertilidade entre os animais que sofreram TT, independente da idade, como mostra a tabela 2. Entretanto, animais que foram submetidos ao tratamento com L-arginina apresentaram melhor desempenho na avaliação de potência, onde os grupos tratados com 4, 6 ou 9 semanas apresentaram respectivamente desempenho 66%, 287% e 146% melhor que os animais que sofreram somente TT com a mesma idade (Figura 15).

O grupo submetido à torção na fase púbera (TT6) apresentou menor perda pós-implantação ( $0,12 \pm 0,11$ ) e índice de fertilidade maior ( $0,85 \pm 0,19$ ) do que o grupo Ctrl6, ( $0,22 \pm 0,39$  e  $0,82 \pm 0,19$ , respectivamente), contudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas de tais parâmetros, nestes animais.

Tabela 1 - Parâmetros do Teste de Fertilidade, animais de 4, 6 e 9 semanas de idade, do grupo controle, torcidos e torcidos tratados com arginina

	<b>CTRL4</b>	<b>TT4</b>	<b>ARG4</b>
<b>Fetos por ninhada</b>	11,00±2,57	11,31±1,62	11,68±1,28
<b>Peso dos Fetos (g)</b>	2,28±0,21	2,38±0,27	2,35±0,20
<b>Perda Pré-implantação (%)</b>	0,10±0,15	0,13±0,07	0,04±0,07
<b>Perda Pós-implantação (%)</b>	0,10±0,14	0,05±0,08	0,05±0,05
<b>Fertilidade (%)</b>	0,89±0,15	0,78±0,30	0,95±0,08
<b>Fecundidade (%)</b>	1,00±0,0	0,90±0,31	1,00±0,00
<b>Potência (%)</b>	0,61±0,15 <sup>a,b</sup>	0,50±0,23 <sup>a</sup>	0,83±0,24 <sup>b</sup>
<b>Circunferência Torácica Fetal (cm<sup>2</sup>)</b>	2,91±0,20	2,99±0,15	3,439±1,84
	<b>CTRL6</b>	<b>TT6</b>	<b>ARG6</b>
<b>Fetos por ninhada</b>	10,57±2,27	10,75±2,36	10,94±2,35
<b>Peso dos Fetos (g)</b>	2,54±0,23	2,46±0,07	2,39±0,25
<b>Perda Pré-implantação (%)</b>	0,14±0,09	0,17±0,18	0,10±0,09
<b>Perda Pós-implantação (%)</b>	0,22±0,39	0,12±0,11	0,05±0,10
<b>Fertilidade (%)</b>	0,82±0,19	0,85±0,19	0,89±0,09
<b>Fecundidade (%)</b>	0,90±0,31	0,67±0,47	1,00±0,00
<b>Potência (%)</b>	0,56±0,32 <sup>a</sup>	0,33±0,28 <sup>b</sup>	0,96±0,12 <sup>b</sup>
<b>Circunferência Torácica Fetal (cm<sup>2</sup>)</b>	2,96±0,06	2,92±0,09	2,89±0,17
	<b>CTRL9</b>	<b>TT9</b>	<b>ARG9</b>
<b>Fetos por ninhada</b>	9,62±3,81	7,78±5,97	10,66±1,69
<b>Peso dos Fetos (g)</b>	2,41±0,13	2,38±0,27	2,28±0,32
<b>Perda Pré-implantação (%)</b>	0,07±0,13	0,08±0,08	0,03±0,05
<b>Perda Pós-implantação (%)</b>	0,01±0,03	0,05±0,07	0,08±0,06
<b>Fertilidade (%)</b>	0,92±0,13	0,77±0,30	0,97±0,05
<b>Fecundidade (%)</b>	1,00±0,00	0,60±0,51	1,00±0,00
<b>Potência (%)</b>	0,58±0,20 <sup>a,b</sup>	0,50±0,23 <sup>a</sup>	0,79±0,25 <sup>b</sup>
<b>Circunferência Torácica Fetal (cm<sup>2</sup>)</b>	3,014±0,17	2,77±0,03	2,84±0,14

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

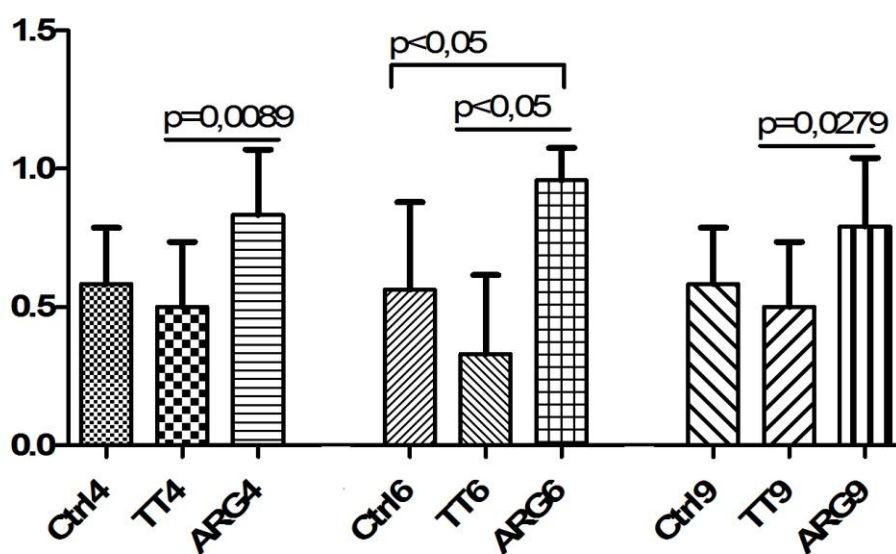
Tabela 2 - Parâmetros do Teste de Fertilidade, animais do grupo torcido com 4, 6 e 9 semanas de idade

	TT4	TT6	TT9
<b>Fetos por ninhada</b>	11,31±1,62	10,75±2,36	7,78±5,97
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,38±0,27	2,46±0,07	2,38±0,27
<b>Perda pré-implantação (%)</b>	0,13±0,07	0,17±0,18	0,08±0,08
<b>Perda pós-implantação</b>	0,05±0,08	0,12±0,11	0,05±0,07
<b>Fertilidade</b>	0,78±0,30	0,85±0,19	0,77±0,30
<b>Fecundidade</b>	0,90±0,31	0,67±0,47	0,60±0,51
<b>Potência</b>	0,50±0,23	0,33±0,28	0,50±0,23
<b>Circunferência Torácica Fetal (cm<sup>2</sup>)</b>	2,99±0,15	2,92±0,09	2,77±0,03

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 15 - Resultado do Teste de Fertilidade, avaliação do parâmetro de potencia



Legenda: Animais tratados apresentando melhor desempenho, independente da idade de torção e tratamento.

Animais do grupo tratado com 6 semanas mostraram-se melhores do que o grupo controle.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

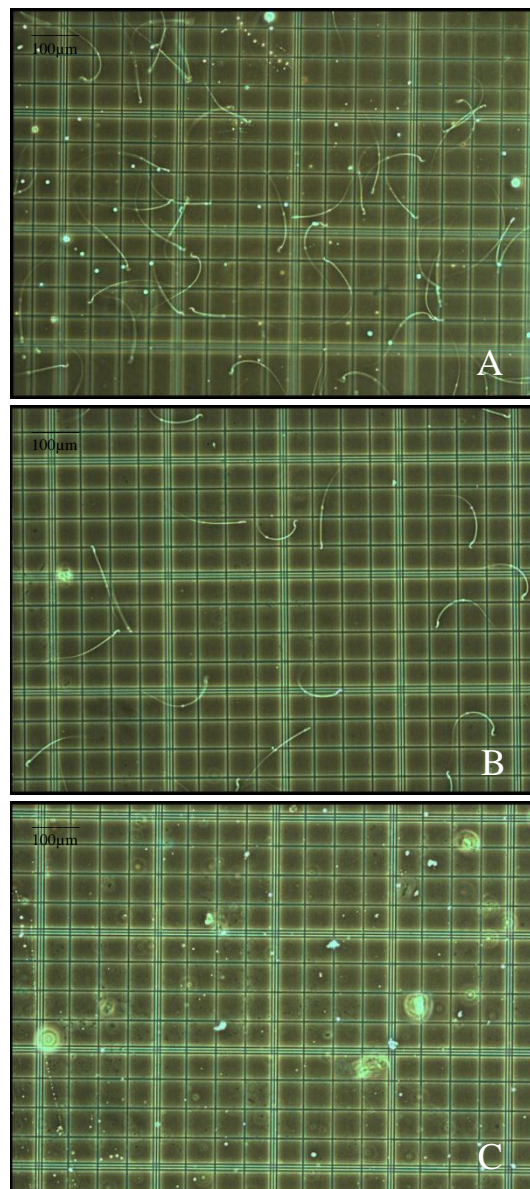
Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.2 Resultados das avaliações espermáticas

A avaliação dos espermatozoides revelou diminuição da concentração nos testículos torcidos de todos os grupos que sofreram a torção. Houve diminuição de 97,2% no concentrado espermático dos animais de 4 semanas, 72,41% no de 6 semanas e os animais de

9 semanas, não apresentaram espermatozoides, no testículo torcido. O tratamento com L-arginina promoveu melhora no percentual (Figura 18 e 19) nos animais de 4 e 6 semanas, entretanto não houve diferença significativa entre testículos torcidos e tratados. Foi possível verificar a presença de espermatozoides nas amostras coletadas do epidídimo de 5 dos 8 animais submetidos à TT e tratados com L-arginina, com 9 semanas de idade, apesar da média do grupo ter sofrido diminuição de 93%, quando comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Figura 18 - Fotomicrografias de Câmara de Neubauer



Legenda: Espermatozoides coletados da cauda do epidídimo direito de animal controle (A), tratado (B) e torcido (C) de ratos submetidos à cirurgia com 4 semanas de idade, mostrando uma significativa diminuição na concentração espermática no sêmen do testículo torcido, em relação ao que não sofreu torção e ao que foi submetido ao tratamento com arginina. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: 100x.

Fonte: MILHOMEM, 2013.



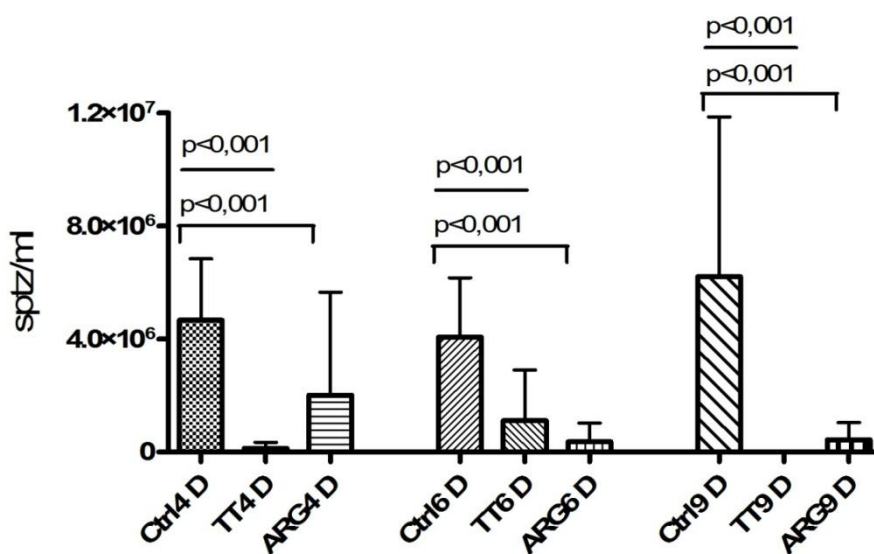
Tabela 3 - Avaliação espermática de ratos submetidos à torção testicular, animais do grupo torcido, controle e torcido tratados com L-arginina (4, 6 e 9 semanas de idade)

	CTRL4	TT4	ARG4
<b>Concentração espermática (sptz x10<sup>6</sup>/ml)</b>	4,66±2,166 <sup>a</sup>	0,13±0,2149 <sup>b</sup>	2,019± 3,63 <sup>b</sup>
<b>Motilidade espermática (%)</b>	51,10±16,21	10,60±18,09	10,30±11,90
<b>Viabilidade espermática (%)</b>	18,75± 5,018	3,20± 6,746	6,125± 8,64
	CTRL6	TT6	ARG6
<b>Concentração espermática (sptz x10<sup>6</sup>/ml)</b>	4,06± 2,10 <sup>a</sup>	1,12± 1,79 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,66 <sup>b</sup>
<b>Motilidade espermática (%)</b>	49,50±15,55	18,00±28,39	14,44±25,35
<b>Viabilidade espermática (%)</b>	22,75± 11,3	7,17± 10,0	9,00± 10,72
	CTRL9	TT9	ARG9
<b>Concentração espermática (sptz x10<sup>6</sup>/ml)</b>	6,200± 5,65 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,431± 0,61 <sup>b</sup>
<b>Motilidade espermática (%)</b>	41,70±20,12	-	6,625±9,531
<b>Viabilidade espermática (%)</b>	16,55± 4,34	-	4,50± 4,803

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 19 - Resultado Avaliação Espermática, concentração de espermatozóides



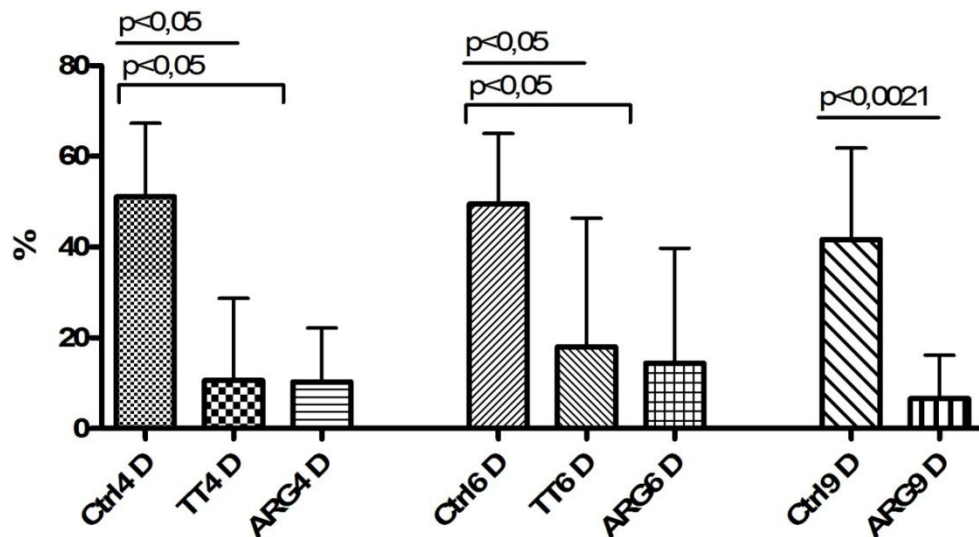
Legenda: Animais tratados com 9 semanas aumento na concentração, quando comparados com torcidos de mesma idade (amostras coletadas da cauda do epidídimo direito).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Nos parâmetros de motilidade e viabilidade, não foram avaliadas as amostras que não continham células espermáticas. Os resultados desta análise revelaram que os animais que sofreram TT, com 4 e 6 semanas de idade, sofreram diminuição da motilidade espermática, em 79,3% e 63,6% respectivamente (Figura 20). A viabilidade espermática também se mostrou diminuída nos animais que sofreram TT, em 82,9% no grupo de 4 semanas e 68,5% no de 6 semanas (Figura 21). Não houve diferença na avaliação de motilidade entre os animais que sofreram TT com 4 e 6 semanas de idade. Animais que sofreram TT e foram tratados com arginina, em fase pré-púbere (ARG4) não apresentaram diferença na motilidade e na viabilidade, quando comparados ao grupo de mesma idade somente torcido. A mesma tendência foi observada na motilidade do grupo ARG6, entretanto, não houve diferença significativa na viabilidade, quando comparados ao grupo controle de mesma idade (Figura 21). O testículo contralateral, dos animais tratados em idade pré-púbere (ARG4), apresentou aumento de 58% na concentração espermática, quando comparado com o contralateral do grupo controle (Figura 22).

Figura 20 - Resultado avaliação espermática, parâmetro de motilidade

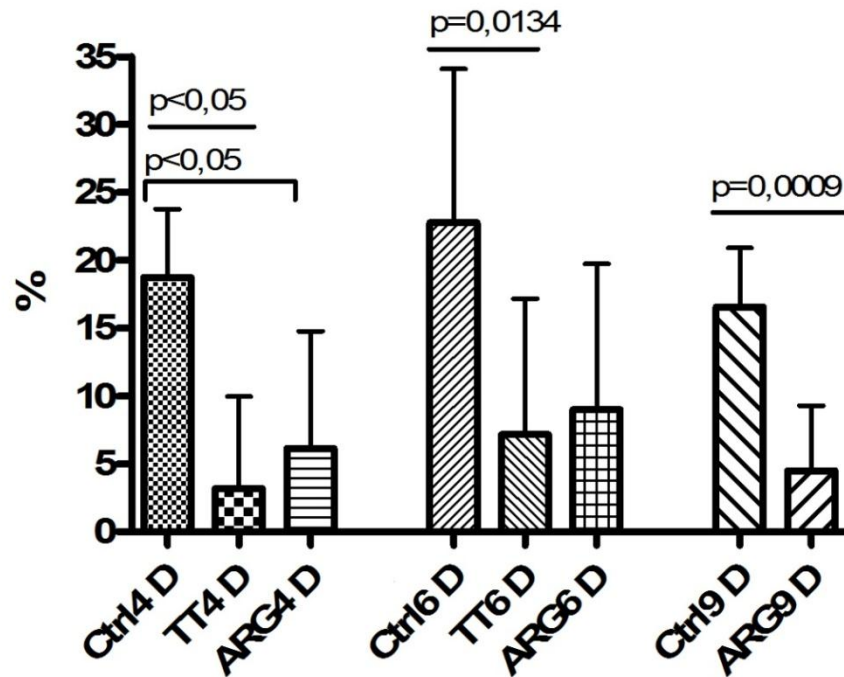


Legenda: Animais torcidos sofreram diminuição da motilidade espermática (amostras coletadas da cauda do epidídimo direito).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 21 - Resultado avaliação espermática, parâmetro de viabilidade

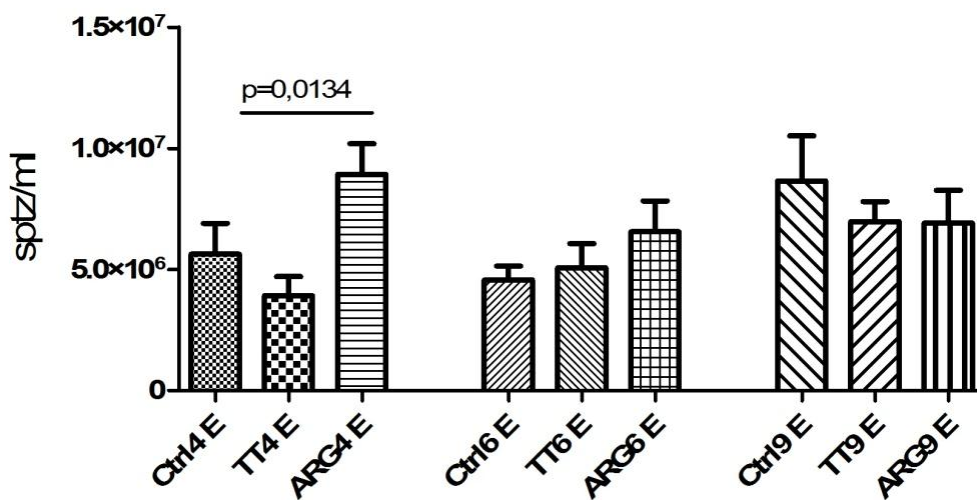


Legenda: Animais torcidos sofreram diminuição da viabilidade espermática. Animais tratados com 6 semanas, não apresentaram diferença significativa, quando comparados ao seu grupo controle (amostras coletadas da cauda do epidídimo direito).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 22 - Resultado da avaliação da concentração espermática no testículo contralateral



Legenda: Testículo contralateral de animais torcidos e tratados com arginina com 4 semanas de idade maior que controle da mesma idade (amostras coletadas da cauda do epidídimo esquerdo).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.3 Resultados das avaliações biométricas

Na avaliação biométrica, foi possível observar a diminuição do peso e volume dos testículos torcidos dos animais submetidos à torção, quando comparados com animais do grupo controle. Essa perda foi de 62,9% em peso e 64,3% em volume no grupo de 4 semanas, de 45,7% no peso e 48,1% no volume para animais de 6 semanas e de 45,1% no peso e 51,0% no volume de animais de 9 semanas (Figura 23). As médias dos resultados das avaliações biométricas foram organizadas na tabela 4. Não houve diferença entre o peso e volume testicular de animais torcidos em diferentes idades. Nos grupos torcidos e tratados com arginina com 4 e 9 semanas, o peso e volume testicular direito, mostrou-se estatisticamente semelhantes aos dos animais do grupo controle, como mostram as figuras 24 e 25. Entretanto, no grupo torcido e tratado com arginina com 6 semanas tais parâmetros acompanharam o padrão dos animais torcidos de mesma idade, com perda de 50,36% no peso e 54,3% no volume.

O volume do testículo contralateral de animais de 4 e 6 semanas, tratados com L-arginina (ARG4 e ARG6) apresentou-se maior ( $1,854 \pm 0,093$  e  $1,796 \pm 0,104$ ) do que o contralateral dos seus controles ( $1,516 \pm 0,083$  e  $1,562 \pm 0,176$ ) (Figura 26).

Em relação ao peso dos ratos, não foram encontradas diferenças entre os grupos, exceto animais do grupo tratado ARG4, que tiveram aumento no ganho de peso final, quando comparados com o grupo torcido de mesma idade (Figura 27).

Tabela 4 - Avaliações biométricas de ratos submetidos à torção testicular, animais do grupo torcido, controle e torcido tratados com L-arginina (4, 6 e 9 semanas de idade)

	<b>CTRL4</b>	<b>TT4</b>	<b>ARG4</b>
<b>Peso testicular direito(g)</b>	1,476±0,136 <sup>a</sup>	0,5470±0,55 <sup>b</sup>	0,967±0,72 <sup>a,b</sup>
<b>Peso testicular esquerdo(g)</b>	1,573±0,066	1,604±0,096	1,874±0,108
<b>Volume testicular direito(cm<sup>3</sup>)</b>	1,428±0,138 <sup>a</sup>	0,5100±0,54 <sup>b</sup>	1,017±0,73 <sup>a,b</sup>
<b>Volume testicular esquerdo(cm<sup>3</sup>)</b>	1,516±0,083 <sup>a</sup>	1,553±0,083 <sup>a</sup>	1,854±0,093 <sup>b</sup>
<b>Peso corporal(g)</b>	358,2±26,94 <sup>a,b</sup>	344,8±36,50 <sup>b</sup>	386,4±32,92 <sup>a</sup>
	<b>CTRL6</b>	<b>TT6</b>	<b>ARG6</b>
<b>Peso testicular direito(g)</b>	1,493±0,134 <sup>a</sup>	0,81±0,38 <sup>b</sup>	0,7411±0,364 <sup>b</sup>
<b>Peso testicular esquerdo(g)</b>	1,611±0,060	1,63±0,22	1,788±0,100
<b>Volume testicular direito(cm<sup>3</sup>)</b>	1,542±0,140 <sup>a</sup>	0,80±0,39 <sup>b</sup>	0,7044±0,368 <sup>b</sup>
<b>Volume testicular esquerdo(cm<sup>3</sup>)</b>	1,562±0,176 <sup>a</sup>	1,6±0,22 <sup>a,b</sup>	1,796±0,104 <sup>b</sup>
<b>Peso corporal(g)</b>	364,2±30,29	370±16,6	369,1±27,08
	<b>CTRL9</b>	<b>TT9</b>	<b>ARG9</b>
<b>Peso testicular direito(g)</b>	1,493±0,134 <sup>a</sup>	0,82±0,41 <sup>b</sup>	0,9588±0,460 <sup>a,b</sup>
<b>Peso testicular esquerdo(g)</b>	1,611±0,060	1,62±0,16	1,856±0,219
<b>Volume testicular direito(cm<sup>3</sup>)</b>	1,531±0,519 <sup>a</sup>	0,75±0,41 <sup>b</sup>	0,7044±0,36 <sup>a,b</sup>
<b>Volume testicular esquerdo(cm<sup>3</sup>)</b>	1,683±0,140	1,69±0,15	1,796±0,104
<b>Peso corporal(g)</b>	365,1±37,53	400±17,5	369,4±44,63

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

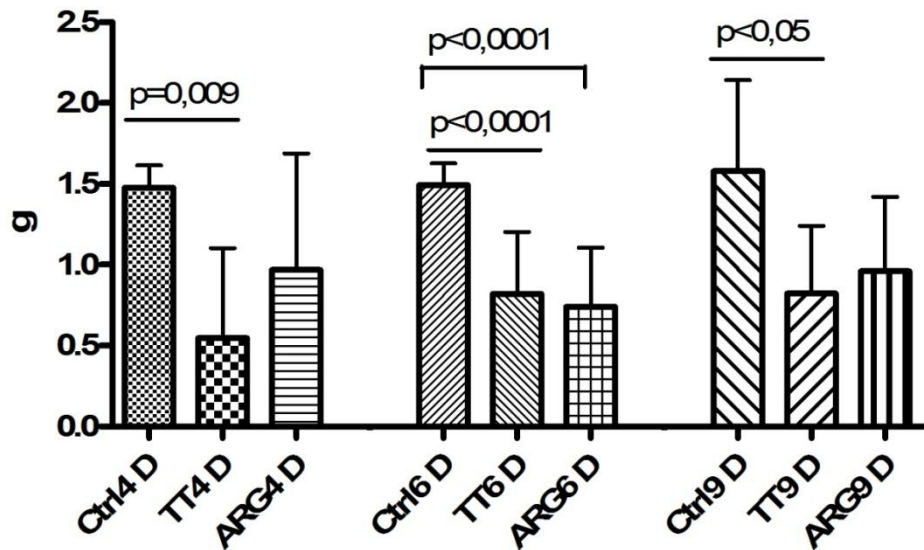
Figura 23 - Testículos de ratos adultos submetidos à torção testicular, com 4 semanas de idade



Legenda: Em **A**, da esquerda para direita, testículo contralateral, torcido e sua respectiva cauda do epidídimo (animal do grupo torcido e tratado com L-arginina). Em **B**, testículo de animal do grupo somente torcido, da esquerda para a direita, testículo, seu epidídimo e testículo contralateral. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 24 – Peso dos testículos ipsilaterais dos ratos

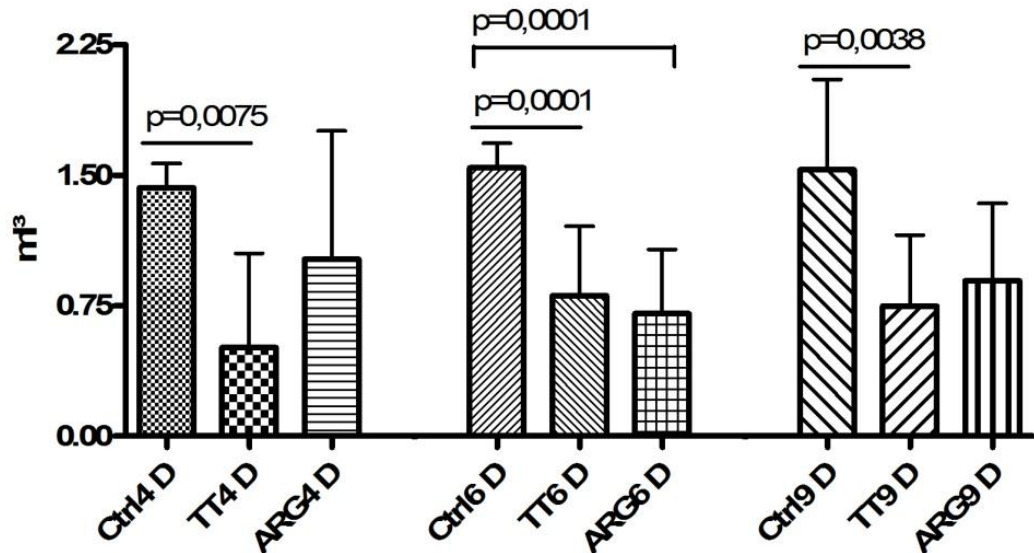


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, nas diferentes idades em que foram operados. Mostrando aumento do peso do testículo torcido, de animais do grupo torcido e tratado com 4 e 9 semanas de idade.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 25 - Volume dos testículos ipsilaterais dos ratos

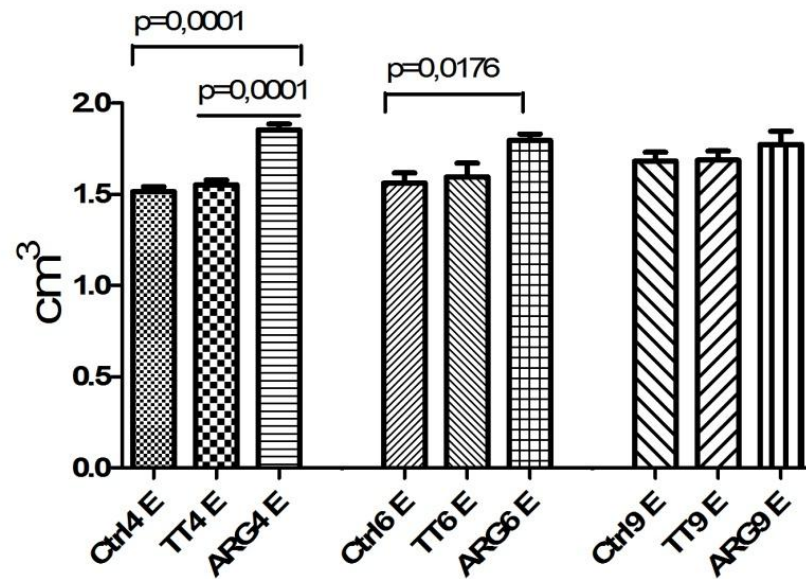


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, nas diferentes idades em que foram operados. . Mostrando aumento do volume do testículo torcido, de animais do grupo torcido e tratado com 4 e 9 semanas de idade.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 26 - Volume dos testículos contralaterais dos ratos

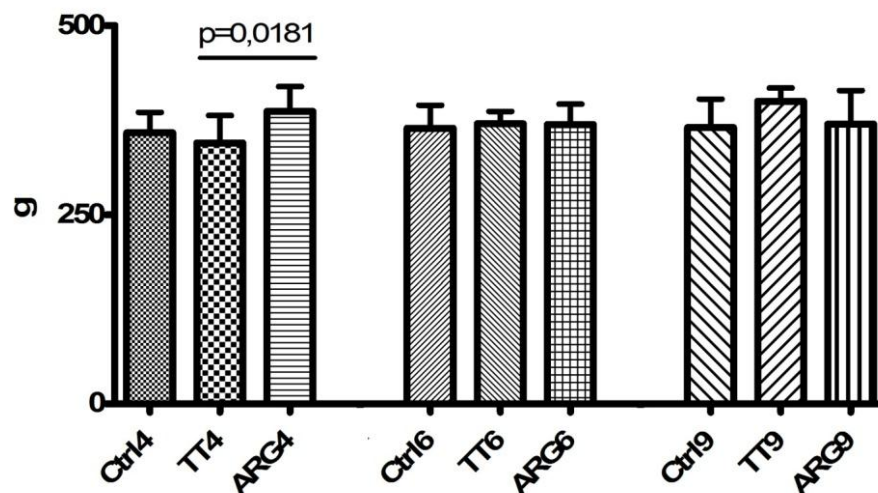


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, nas diferentes idades em que foram operados. Mostrando aumento do volume do testículo contralateral de ratos submetidos à torção e Tratamento com 4 e 6 semanas de idade.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 27 - Peso corporal final dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, nas diferentes idades em que foram operados. Mostrando ganho de peso maior em animais torcido e tratados com 4 semanas, quando comparados com seus controles.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.4 Resultados das análises estruturais

Os resultados destas análises morfométricas estão dispostos na tabela 5.

#### 3.4.1 Resultados do Diâmetro do túbulo seminífero

As análises histológicas revelaram alterações morfológicas (Figura 28), com diminuição do diâmetro do túbulo seminífero, nos testículos torcidos quando comparados com seus controles, de 38,6% para animais de 4 semanas, 33, 8% para os de 6 semanas e 30,3% para os de 9 semanas. Não houve diferença significativa entre o testículo contralateral dos grupos torcidos e animais dos grupos controles.

Tabela 5 - Avaliações morfométricas dos túbulos seminíferos, de testículo ipsilateral de animais do grupo torcido, controle e torcido tratados com L-arginina (4, 6 e 9 semanas de idade)

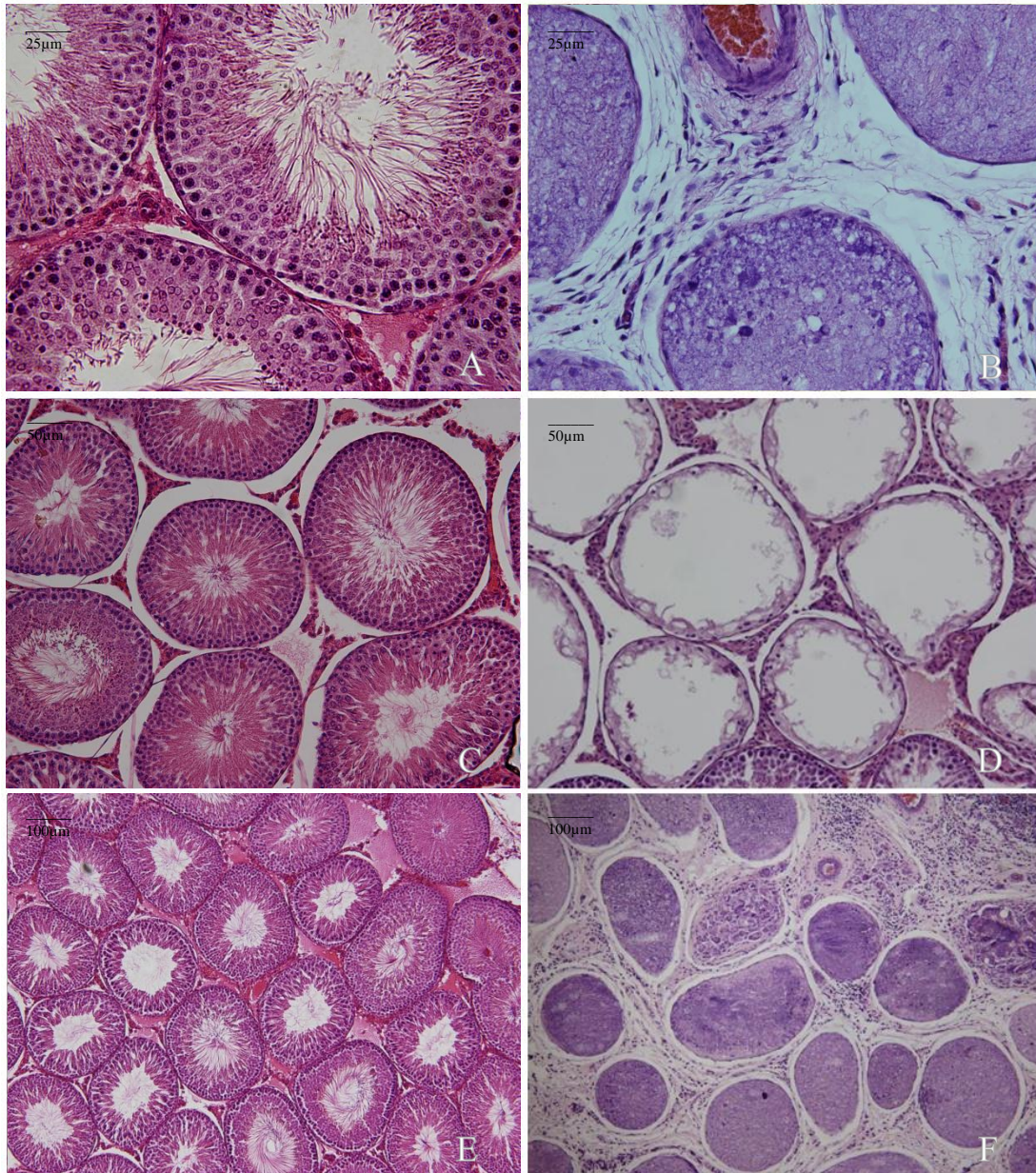
	<b>Crt14D</b>	<b>TT4D</b>	<b>ARG4D</b>	<b>Crt16D</b>	<b>TT6D</b>	<b>ARG6D</b>	<b>Crt19D</b>	<b>TT9D</b>	<b>ARG9D</b>
<b>Diâmetro do túbulo seminífero (µm)</b>	270±17,9 <sup>a</sup>	166±61 <sup>b</sup>	230,3±85,63 <sup>a</sup>	300±21,8 <sup>a</sup>	198±89,2 <sup>b</sup>	204,7±41,95 <sup>b</sup>	312±12,1 <sup>a</sup>	217±23,3 <sup>b</sup>	203,7±15,47 <sup>b</sup>
<b>Altura do epitélio seminífero (µm)</b>	47,6±5,81 <sup>a</sup>	15,3±20 <sup>b</sup>	26,59±20,45 <sup>a,b</sup>	48,3±7,56 <sup>a</sup>	15,6±19,8 <sup>b</sup>	17,14±13,86 <sup>b</sup>	54,7±2,63 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	20,8±15,5 <sup>b</sup>

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.



Figura 28 – Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos de testículo direito



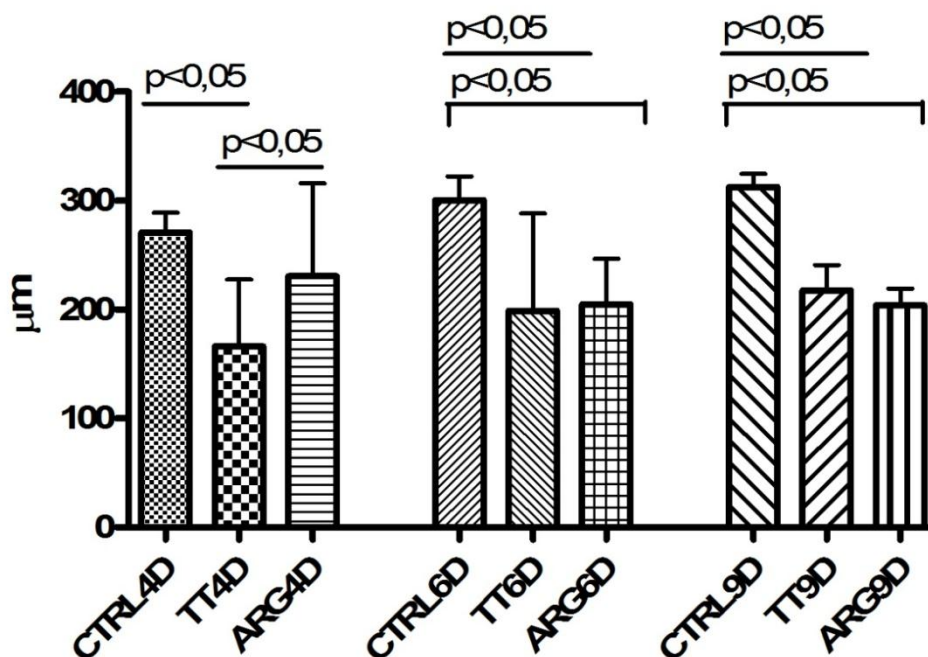
Legenda: Em **A**, animal do grupo controle, sem alterações, em **B**, animal torcido, com perda de arranjo morfológico, diminuição do diâmetro dos túbulos evidente e necrose de coagulação (Grupo 9 semanas). Em **C** e **D**, animais controle e torcido (6 semanas), com perda de epitélio, apresentando também diminuição do diâmetro e alguns túbulos preservados. Em **E** e **F**, animais dos grupos controle e torcido (4 semanas), mostrando o contraste na organização tecidual do compartimento tubular, com perda de diâmetro dos túbulos e alteração do arranjo intertubular. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: (**A** e **B**) H-E 400x, (**C** e **D**) H-E, 200x e (**E** e **F**) H-E, 100x.

Fonte: Milhomem, 2013.

Os resultados dos grupos, tratados com L-arginina, mostraram que o diâmetro do túbulo seminífero, de animais operados com 4 semanas (ARG4), apresentou considerável aumento de 27,8%, tornando-se estatisticamente semelhante ao grupo controle (Figura 29).

Figura 29 – Diâmetro do túbulo de testículos ipsilaterais dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, nas diferentes idades em que foram operados. Mostrando que animais torcidos e tratados com 4 semanas de vida, obtiveram aumento do diâmetro do túbulo, quando comparados aos torcidos em mesma idade.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

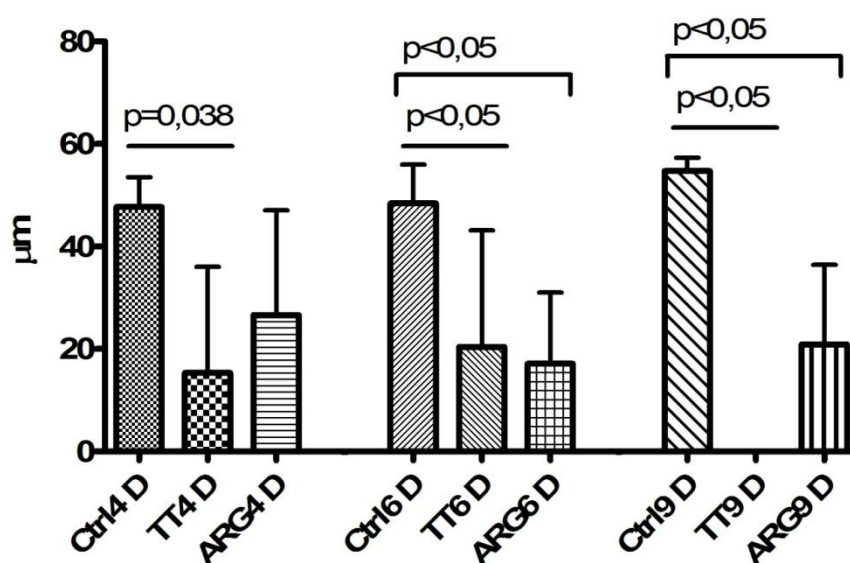
Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.4.2 Resultados da altura do epitélio seminífero

A partir da avaliação da altura do epitélio do túbulo seminífero, foi possível observar que os testículos ipsilaterais de animais que sofreram TT, com 4 e 6 semanas de idade, apresentaram diminuição significativa do epitélio testicular, de 67,9% e 57,9%, respectivamente, quando comparados com seus respectivos controles (Figura 30). Não houve diferença significativa entre o testículo contralateral dos grupos torcidos e animais do grupo controle. Animais submetidos à torção com 9 semanas, sofreram maior dano, não sendo possível aferir a altura do epitélio, no testículo torcido. Não houve diferença entre os animais

do grupo que sofreu a TT, independente da idade em que foram operados. Os resultados dos grupos tratados com arginina demonstraram que, a altura do epitélio em animais de 4 semanas de idade, não sofreu diferença significativa em relação ao grupo controle. Foi possível mensurar o epitélio de 6 dos 8 testículos submetidos à torção com 9 semanas de idade e tratamento com L-arginina e, neste caso, o mesmo apresentou-se 61,4% menor que o do testículo da cirurgia simulada.

Figura 30 – Altura do epitélio seminífero de testículos ipsilaterais dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, em diferentes idades. Mostrando diminuição significativa do epitélio testicular, no testículo de ratos submetidos à torção com 4 e 6 semanas de vida. Grupo ARG4 com aumento da altura do epitélio, quando comparado com o grupo torcido de mesma idade (TT4).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$

Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.4.3 Resultados da densidade volumétrica das diferentes estruturas testiculares

Em relação à densidade volumétrica testicular, foram avaliados o compartimento tubular (túnica própria, epitélio seminífero e lúmen do túbulo) e compartimento intertubular (interstício e vasos). Nos testículos torcidos de animais, de diferentes idades (4, 6 e 9 semanas), foram observadas diminuição significativa da densidade volumétrica do compartimento tubular (Figura 31 e Tabela 6 e 7) com diminuição do epitélio seminífero. Animais operados com 4, 6 e 9 semanas de idade, apresentaram diminuição significativa da

densidade do epitélio seminífero (Figura 32), quando comparados aos grupos controle ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6 - Resultados das análises estatísticas da densidade volumétrica, do compartimento tubular, de animais, do grupo torcido e controle, com 4, 6 e 9 semanas

	<b>CTRL4D</b>	<b>TT4D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Vv epitélio seminífero (%)</b>	32,3±5,3	8,75±11,9	0,0005
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,4±0,0	0,07±0,13	0,0001
<b>Vv túnica própria (%)</b>	6,6±2,0	5,83±1,83	0,3538
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,0±0,0	0,03±0,03	0,0010
<b>Vv lúmen tubular (%)</b>	32,6±7,1	33,2±6,3	0,8485
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,4±0,1	0,15±0,14	0,0001
<b>Vv compartimento tubular (%)</b>	71,6±7,9	47,8±17,0	0,0008
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,0±0,1	0,25±0,31	0,0001

	<b>CTRL6D</b>	<b>TT6D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Vv epitélio seminífero (%)</b>	45,3±4,9	25,9±17,5	0,0038
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,6±0,0	0,26±0,24	0,0001
<b>Vv túnica própria (%)</b>	6,6±1,9	5,76±0,93	0,2266
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,1±0,0	0,04±0,01	0,0001
<b>Vv lúmen tubular (%)</b>	38,6±7,7	38,8±11,4	0,9733
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,6±0,1	0,32±0,18	0,0023
<b>Vv compartimento tubular (%)</b>	90,6±2,9	73,4±17,9	0,0079
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,3±0,1	0,63±0,43	0,0013

	<b>CTRL9D</b>	<b>TT9D</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Vv epitélio seminífero (%)</b>	39,4±5,8	0,84±1,78	0,0001
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0,5±0,2	0,00±0,01	0,0001
<b>Vv túnica própria (%)</b>	5,1±1,0	3,72±2,53	0,2070
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0,0±0,0	0,02±0,02	0,0087
<b>Vv lúmen tubular (%)</b>	40,4±7,3	42,7±28,5	0,3277
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0,5±0,2	0,31±0,23	0,1119
<b>Vv compartimento tubular (%)</b>	85,6±1,7	47,3±31,2	0,0001
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	1,1±0,5	0,34±0,26	0,0016

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013

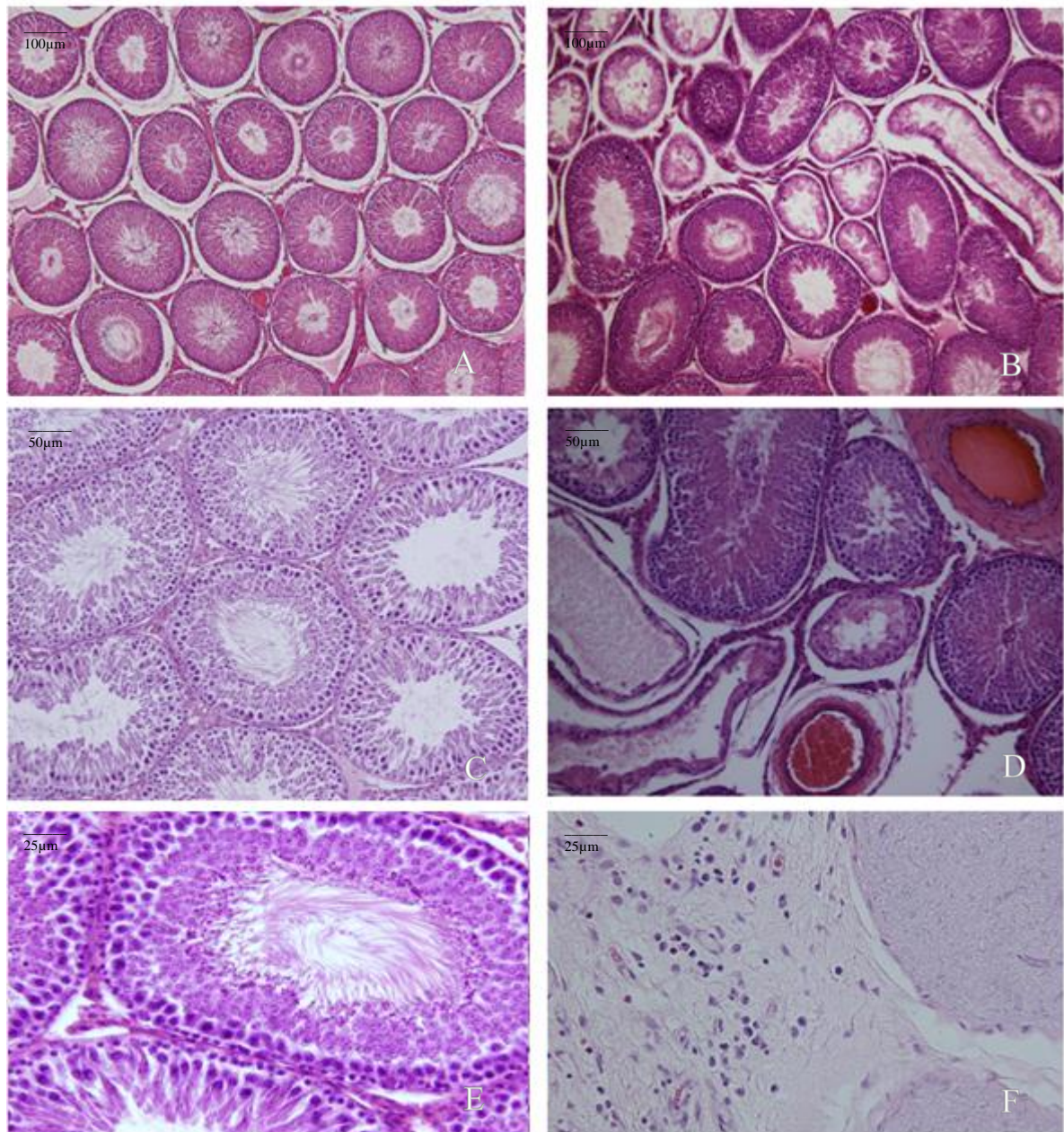
la 7 - Resultados das análises estatísticas da densidade volumétrica, do compartimento tubular, de animais, dos grupos tratados com 4, 6 e 9 semanas

	<b>ARG4D</b>	<b>ARG6D</b>	<b>ARG9D</b>
<b>Vv epitélio seminífero (%)</b>	15.23±18.07	6.23±8.84	0.04±0.14
<b>Volume absoluto epitélio seminífero (mL)</b>	0.275±0.324	0.06±0.10	0.005±0.011
<b>Vv túnica própria (%)</b>	3.31±1.74	4.87±1.26	3.30±0.52
<b>Volume absoluto túnica própria (mL)</b>	0.06±0.030	0.03±0.02	0.03±0.017
<b>Vv lúmen tubular (%)</b>	29.60±14.19	46.18±13.60	40.07±15.66
<b>Volume absoluto lúmen tubular (mL)</b>	0.54±0.25	0.33±0.20	0.36±0.24
<b>Vv compartimento tubular (%)</b>	48.15±28.08	57.28±18.52a	48.40±5.051
<b>Volume absoluto compartimento tubular (mL)</b>	0.88±0.49	0.43±0.30a	0.39±0.26

Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013

Figura 31 - Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos de testículo de rato

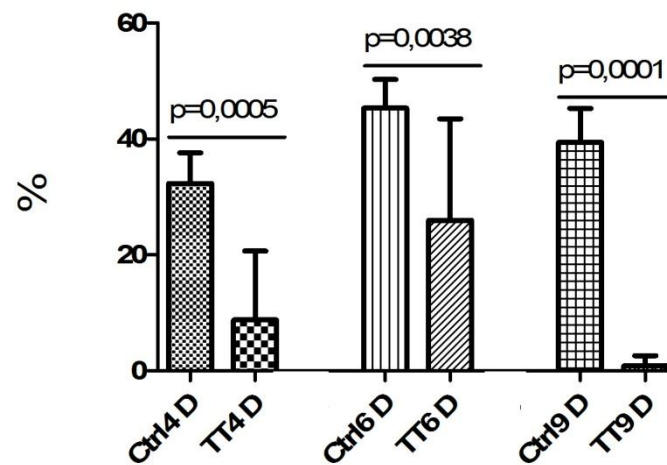


Legenda: A coluna da esquerda mostra testículos contralaterais de animais dos grupos torcidos com 4, 6 e 9 semanas de idade, evidenciando organização morfológica do compartimento tubular e intersticial (respectivamente **A**, **C** e **E**). Na coluna da direita temos testículo ipsilateral de animais torcidos com 4 e 6 semanas de idade, evidenciando túbulos preservados, onde foi possível mensurar a altura do epitélio seminífero (respectivamente **B**, **D**). **F** - Testículo ipsilateral de animais torcidos com 9 semanas de idade, evidenciando túbulos sem epitélio, onde não foi possível mensurar o epitélio. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: (A e B) H-E, 100x, (C e D) H-E, 200x e (E e F) H-E, 400x.

Fonte: Milhomem, 2013

Figura 32 – Densidade volumétrica do epitélio seminífero, em testículos ipsilaterais de ratos



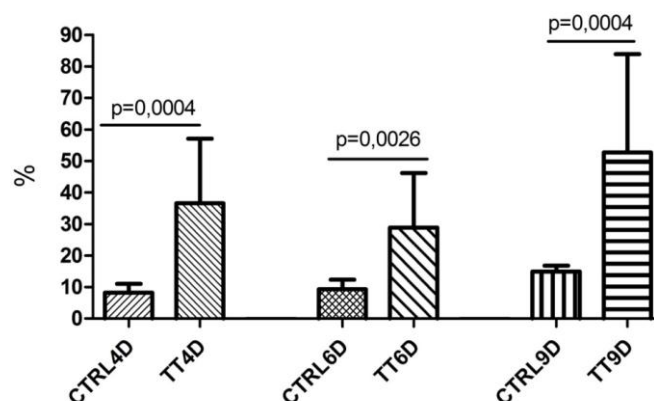
Legenda: Animais dos grupos controle e torcido, em diferentes idades. Mostrando diminuição da densidade volumétrica do testículo ipsilateral de ratos submetidos à torção com 4, 6 e 9 semanas de idade.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Não houve diferença entre a densidade volumétrica do lúmen do túbulo seminífero, quando comparados animais torcidos e controles, independente da idade. A densidade do compartimento intertubular dos testículos ipsilaterais de todos os grupos torcidos aumentou significativamente, quando comparados com seus grupos controles (Figura 33).

Figura 33 – Densidade volumétrica do compartimento intertubular



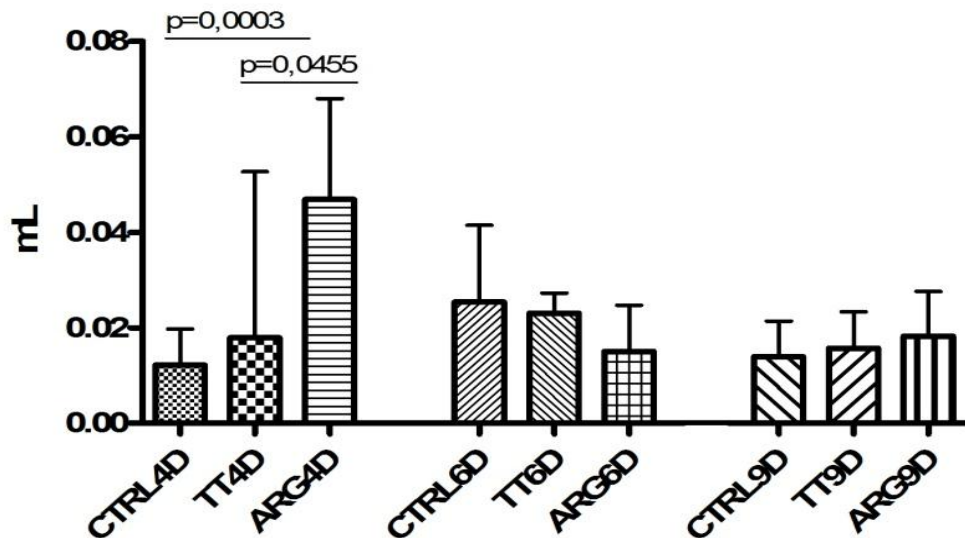
Legenda: Animais dos grupos controle e torcido, em diferentes idades. Mostrando aumento da densidade volumétrica do testículo ipsilateral de ratos submetidos à torção com 4, 6 e 9 semanas de idade.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

A densidade volumétrica, dos vasos se mostrou aumentada, nos animais torcidos em idade pré-púbere e adulta (TT4 e TT9), entretanto o volume absoluto dos vasos (mL) se apresentou significativamente maior apenas no grupo TT4, quando comparado com seus controles. Houve aumento do mesmo parâmetro, em animais torcidos e tratados com 4 semanas de idade (ARG4) (Figura 34 e 35). Os animais do grupo tratado apresentaram alterações nas análises do compartimento tubular e intertubular, quando comparados com os grupos torcidos. Em particular, o grupo tratado com 4 semanas de idade, sofreu um notável aumento do valor absoluto do componente vascular, presente no espaço intersticial. Não houve diferença entre os testículos contralaterais e os testículos torcidos.

Figura 34 – Resultados das análises estatísticas do volume absoluto de vasos



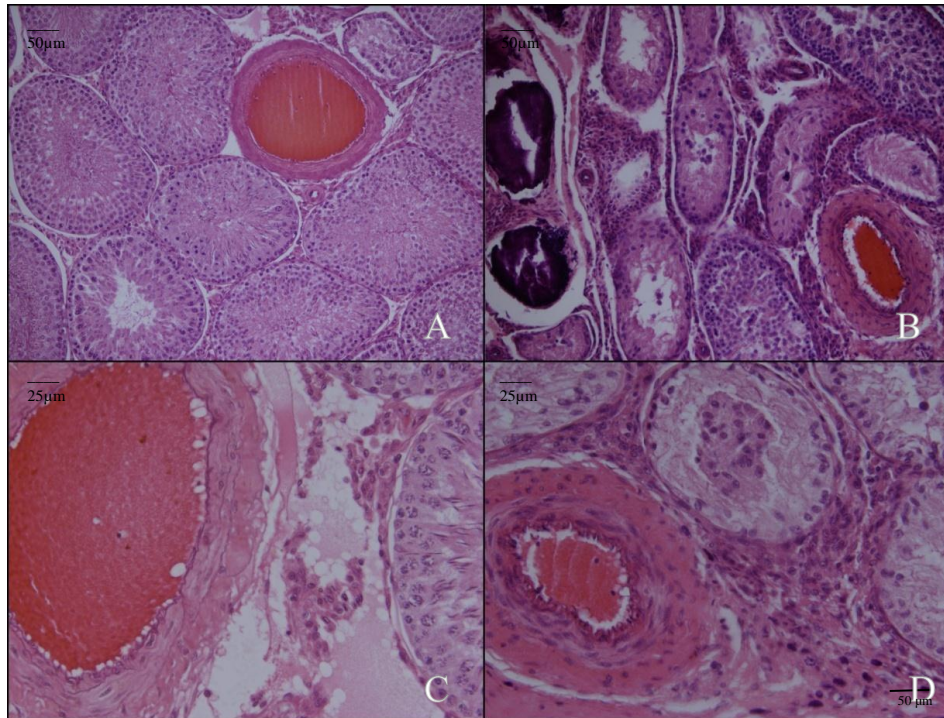
Legenda: Animais do grupo torcido, tratado e controle, com 4, 6 e 9 semanas.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.



Figura 35 - Fotomicrografias de secções transversais de túbulos seminíferos



Legenda: Em **A**, testículo contralateral de animal CTRL9, apresentando vaso sanguíneo evidente. Em **B**, testículo de animal TT9. Em **C** e **D**, testículo ipsilateral de animais torcidos com 4 semanas de idade, grupo tratado torcido respectivamente. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: (A e B) H-E, 200x e (C e D) H-E, 400x.

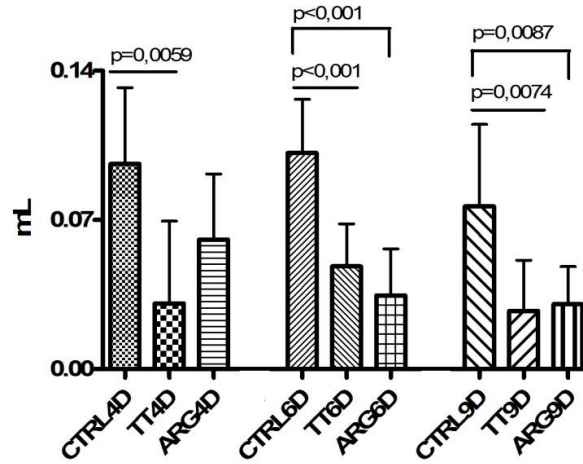
Fonte: MILHOMEM, 2013.

Em relação ao volume absoluto da túnica própria, não houve diferença entre animais torcidos e tratados nas idades púberes e adultos. Entretanto, o grupo tratado na idade pré-púberes apresentou um aumento do valor absoluto da túnica própria, não apresentando diferença significativa para o grupo controle (Figura 36).

O volume absoluto do epitélio seminífero em animais tratados na idade pré-púberes apresentou um aumento, não apresentando diferença significativa para o grupo controle, o que não foi observado em animais tratados em idade púberes e adulta. A média do volume absoluto do epitélio seminífero, de testículos torcidos, foi significativamente maior do que nos testículos do grupo tratado na idade púberes (Figura 37).

O volume absoluto do lúmen dos túbulos seminíferos se revelou maior em animais tratados com 4 semanas, quando comparados ao grupo torcido de mesma idade (Figura 38). Não houve diferença, em relação a este parâmetro, entre testículos ipsilaterais de animais torcido e tratado com 6 e 9 semanas. Além disso, nos grupos de 9 semanas de idade, não houve diminuição significativa do volume absoluto do lúmen em nenhum dos grupos submetidos à torção, quando comparados ao grupo controle.

Figura 36 – Resultados das análises estatísticas do volume absoluto da túnica própria

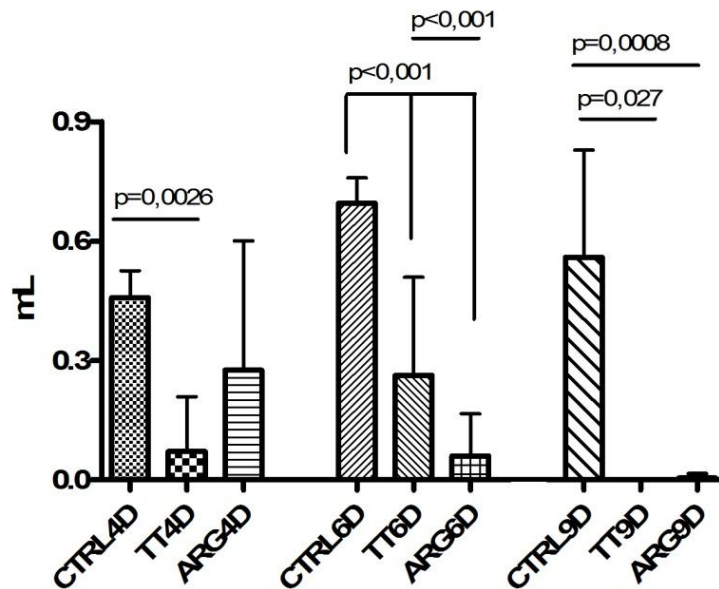


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, em diferentes idades. Mostrando preservação significativa da densidade da túnica própria, no testículo de ratos submetidos à torção e tratados com 4 e semanas de vida. Grupo ARG4 com aumentado, quando comparado com o grupo torcido de mesma idade (TT4).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p<0,05$

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 37 – Resultados das análises estatísticas do volume absoluto do epitélio

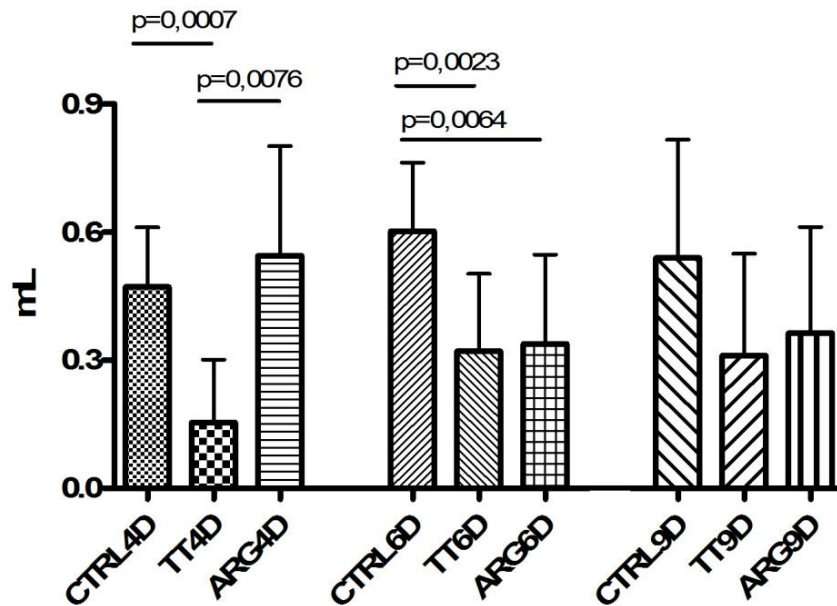


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, em diferentes idades. Mostrando preservação significativa da densidade do epitélio, no testículo de ratos submetidos à torção e tratados com 4 e semanas de vida. Grupo ARG4 com aumentado, quando comparado com o grupo torcido de mesma idade (TT4).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p<0,05$

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 38 – Resultados das análises estatísticas do volume absoluto do lúmen



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado, em diferentes idades. Mostrando preservação significativa da densidade do lúmen, no testículo de ratos submetidos à torção e tratados com 4 e semanas de vida. Grupo ARG4 com aumentado, quando comparado com o grupo torcido de mesma idade (TT4).

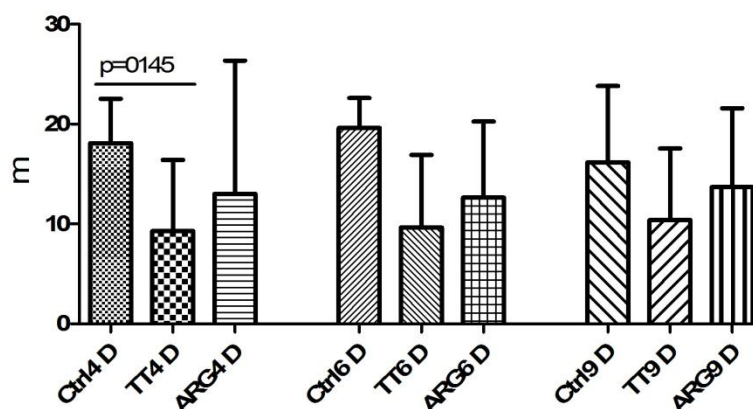
Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$

Fonte: MILHOMEM, 2013.

#### 3.4.4 Resultados do comprimento total dos túbulos seminíferos

O resultado do comprimento tubular revelou diminuição nos testículos ipsilaterais de animais submetidos à torção com 4 semanas de idade, quando comparados com seus controles. Animais de 6 e 9 semanas de idade não apresentaram diferença em relação ao seus controles. Em relação aos animais tratados em idade pré-púbere, o comprimento tubular apresentou um aumento, não apresentando diferença significativa para o grupo controle. Não houve diferença entre os animais dos grupos torcido, tratado e controle com 6 e 9 semanas de idade (Figura 39 e tabela 8).

Figura 39 – Comprimento tubular nos testículos ipsilaterais dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado (animais com 4, 6 e 9 semanas). Mostrando diminuição do comprimento tubular de ratos submetidos à Torção com 4 e 6 semanas de idade e a preservação, em animais torcidos e tratados em mesma idade (ARG4 e ARG6).

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Tabela 8 - Resultados das análises do comprimento tubular, do testículo direito, de animais, do grupo controle, torcido e torcido tratado com 4, 6 e 9 semanas

	Ctrl4 D	TT4 D	ARG4 D	Ctrl6 D	TT6 D	ARG6 D	Ctrl9 D	TT9 D	ARG9 D
<b>Comprimento tubular (m)</b>	18.0±4.45 <sup>a</sup>	9.29±7.11 <sup>b</sup>	13.01±13.36 <sup>ab</sup>	19.6±3.01	9.63±7.28	12.63±7.63	16.1±7.63	10.4±7.15	13.68±7.91

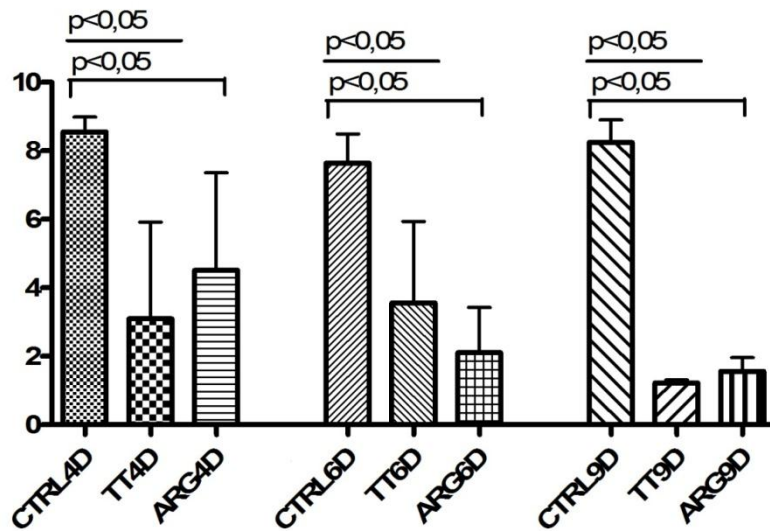
Dado expressos em média e desvio padrão, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013

### 3.4.5 Resultados do Escore de Johnsen

Os resultados das análises do escore de Johnsen mostraram que os testículos dos grupos torcidos sofreram diminuição significativa, independente da idade, quando comparados com seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ). Houve diferença significativa entre os testículos ipsilaterais entre os grupos torcidos com 6 e 9 semanas de idade, onde, os animais operados com 9 semanas obtiveram menor grau na escala. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os testículos contralaterais de nenhum dos grupos. Animais submetidos ao tratamento com arginina não demonstraram diferença significativa neste parâmetro, quando comparados com seus controles, bem como com os grupos torcidos (Figura 40).

Figura 40 – Escore de Johnseh de testículos ipsilaterais dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado torcido (animais com 4, 6 e 9 semanas). Mostrando diminuição do escore nos animais submetidos à torção, e torcido tratados em todas as idades.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.4.6 Resultados da Avaliação dos estágios do ciclo do epitélio seminífero

Animais torcidos com 9 semanas de idade não apresentaram epitélio seminífero, portanto não puderam ser avaliados. A análise do ciclo do epitélio revelou que houve diminuição do número de túbulos quantificáveis, entretanto, as estruturas preservadas, passíveis de mensuração não demonstraram grandes alterações, entre animais torcidos e o grupo controle, nas diferentes idades. Os animais que foram tratados com L-arginina com 9 semanas de idade e que apresentaram epitélio seminífero com possibilidade de avaliação só o mostraram nos estágios I, IV e VII. (Os resultados destas análises estão dispostos na tabela 9 e figuras 41, 42 e 43).

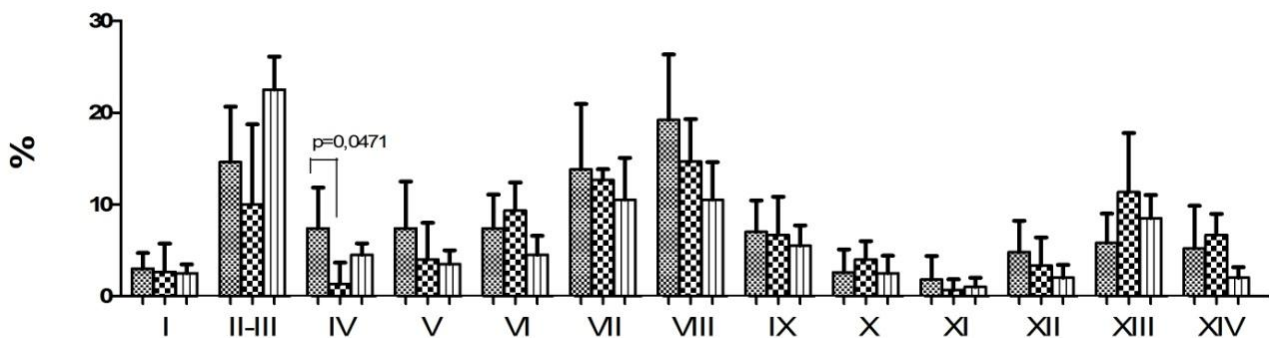
Tabela 9 - Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais (grupo torcido, torcido tratado e controle, com 4, 6 e 9 semanas)

	I	II - III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
<b>CTRL4D</b>	3,0	14,6	7,4	7,4	7,4	13,8	19,2	7	2,6	1,8	4,8	5,8	5,2
<b>TT4D</b>	2,7	10,0	1,3	4,0	9,3	12,7	14,7	6,7	4,0	0,7	3,3	11,3	6,7
<b>ARG4D</b>	2,5	22,5	4,5	3,5	4,5	10,5	10,5	5,5	2,5	1,0	2,0	8,5	2,0
<b>CTRL6D</b>	5,2	17,4	6,2	9,6	7,2	11	17	4,2	1,8	2,8	3,4	5,6	8,4
<b>TT6D</b>	4	13,5	4	10,5	4	8,5	16,5	4,5	1,5	0	2,5	10	5,5
<b>ARG6D</b>	1,3	6,7	2,7	4,7	4,0	8,7	4,7	3,3	0,7	2,0	2,0	2,7	2,7
<b>CTRL9D</b>	6,9	18,9	6,9	9,8	6,9	10,2	18,2	3,6	0,9	2,4	2,4	6,4	6,4
<b>TT9D</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>ARG9D</b>	2,0	0,0	1,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Dados expressos em média, com  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 41 - Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais de 4 semanas

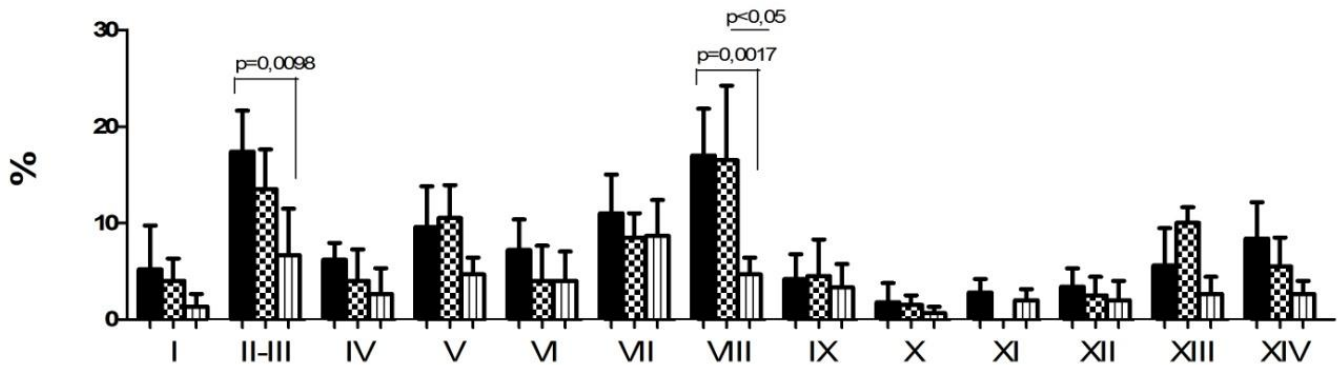


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido, e torcido e tratado. Colunas em preto representam animais do grupo controle. Colunas quadriculadas representam animais do grupo torcido e colunas listradas, animais torcidos e tratados. Mostrando diminuição da frequência do estágio IV em animais torcidos.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 42 - Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais de 6 semanas

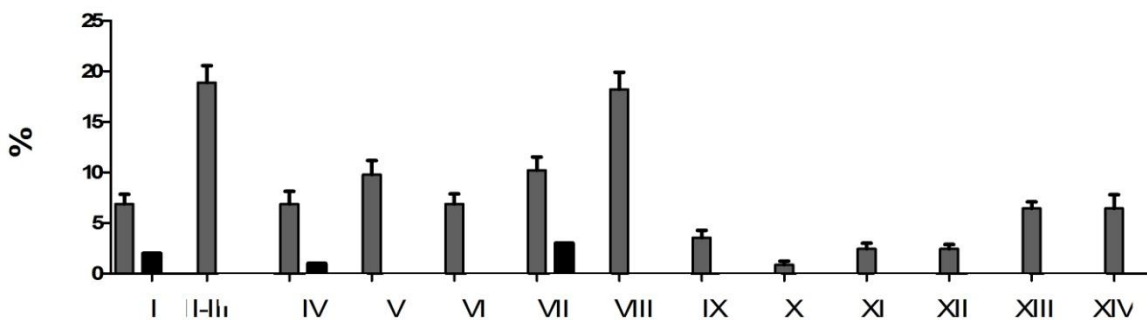


Legenda: Animais dos grupos controle, torcido, e torcido e tratado. Colunas em preto representam animais do grupo controle. Colunas quadriculadas representam animais do grupo torcido e colunas listradas, animais torcidos e tratados. Mostrando diminuição da frequência do estágio II- III e VIII em animais torcidos e tratados.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Figura 43 - Frequência dos Estágios do Ciclo do Epitélio de animais de 9 semanas



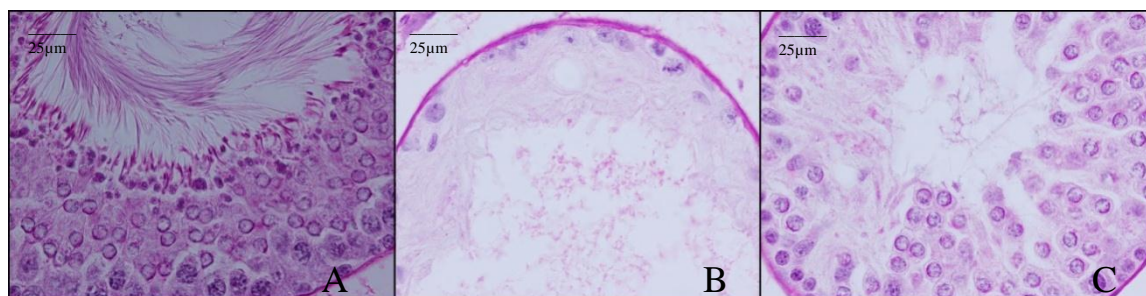
Legenda: Animais dos grupos controle e torcido e tratado. Colunas em preto, animais do grupo controle. Colunas em cinza representam animais do grupo torcido e colunas em preto, animais torcidos e tratados. Mostrando diminuição generalizada da frequência dos estágios em animais torcidos e tratados.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Animais submetidos ao tratamento com arginina apresentaram um aumento da frequência em relação ao estágio IV, no grupo de 4 semanas, não apresentando diferença significativa para o grupo controle. Entretanto animais tratados com 6 semanas de idade apresentaram diminuição da frequência do estágio VIII, quando comparados com o grupo controle e torcido de mesma idade, bem como do estágio II-III, quando comparado ao seu controle. A figura 44 exemplifica muito dos achados histológicos das análises, onde, apesar dos túbulos seminíferos dos grupos tratados possuírem epitélio, não foi possível distinguir o estágio, pois o ciclo estava incompleto.

Figura 44 - Fotomicrografia de secções transversais de túbulo seminíferos



Legenda: Em **A** estágio VIII do ciclo do epitélio de testículo preservado. Na imagem **B**, testículo comprometido, existem raras células da linhagem germinativa, mas não são encontradas espermatócitos ou espermátides. Em **C**, túbulo seminífero, de animal tratado, contendo epitélio em estágio indeterminado. Camada de espermatogônias preservadas, espermatócitos em paquíteno e espermátides jovens, em desenvolvimento acrossomal, na fase 7, não são observadas espermátides maduras. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: PAS 1000x

Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.5 Resultados das análises da proliferação celular

Os resultados da análise de proliferação celular foram organizados na tabela 10.

Tabela 10 – Análise da Proliferação celular, nos diferentes compartimentos do testículo de ratos (grupo torcido, torcido e tratado e controle, com 4, 6 e 9 semanas)

GRUPOS	Proliferação Celular (cels/mm <sup>2</sup> )	
	Compartimento tubular	Compartimento intertubular
<b>Ctrl4D</b>	1,3x10 <sup>3</sup> ±439 <sup>a</sup>	349±454
<b>TT4D</b>	343±426 <sup>b</sup>	601±291
<b>ARG4D</b>	841±658 <sup>a,b</sup>	236,4±162,9
<b>Ctrl6D</b>	1,2x10 <sup>3</sup> ±230 <sup>a</sup>	874±686 <sup>a</sup>
<b>TT6D</b>	723±394 <sup>a,b</sup>	821±247 <sup>a,b</sup>
<b>ARG6D</b>	293,2±489,0 <sup>b</sup>	175,9±123,2 <sup>b</sup>
<b>Ctrl9D</b>	1,7x10 <sup>3</sup> ±424 <sup>a</sup>	401±191 <sup>a</sup>
<b>TT9D</b>	267±233 <sup>b</sup>	828±219 <sup>a</sup>
<b>ARG9D</b>	168,8±226,8 <sup>b</sup>	173,8±109,7 <sup>b</sup>

Dados expressos em média, com  $p < 0,05$ .

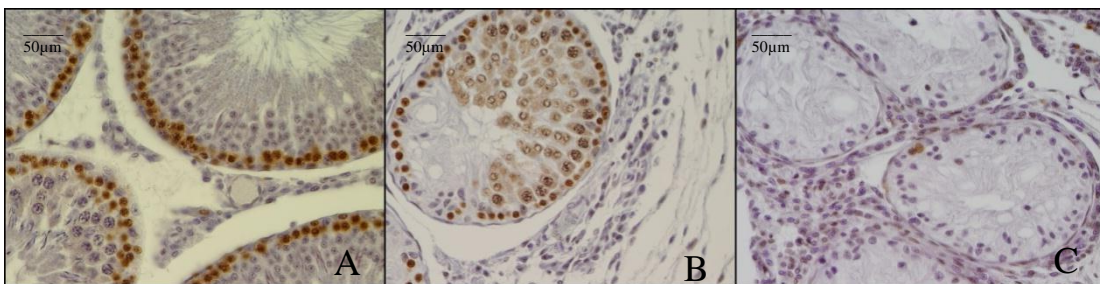
Fonte: MILHOMEM, 2013.



### 3.5.1 Proliferação celular da região tubular

Esta análise revelou diminuição significativa da proliferação celular do epitélio seminífero do testículo ipsilateral de animais submetidos à torção com 4 e 9 semanas de idade, quando comparados aos seus controles figura 45. Não foi encontrada diferença entre animais, do grupo torcido, de diferentes idades.

Figura 45 - Fotomicrografia de secções transversais de túbulo seminíferos



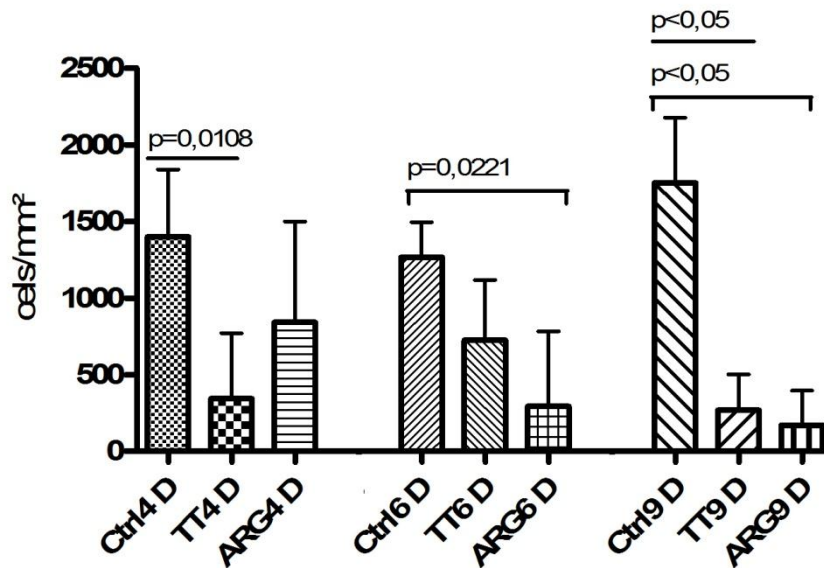
Legenda: Testículo ipsilateral, em lâminas imunomarcadas com PCNA. Em **A**, epitélio seminífero de animal controle, apresentando proliferação da camada germinativa. Em **B**, túbulo de animal tratado e em **C** de animal torcido. Laboratório Pesquisa Urogenital - Rio de Janeiro.

Nota: PCNA 200x.

Fonte: MILHOMEM, 2013.

Animais torcidos, submetidos ao tratamento com arginina com 4, 6 e 9 semanas de idade, apresentaram diminuição da proliferação celular do epitélio seminífero, quando comparados com os respectivos grupos controles. O grupo torcido e tratado com 4 semanas de idade apresentou aumento da proliferação celular do epitélio, não apresentando diferença significativa para o grupo controle (Figura 46).

Figura 46 - Proliferação celular do epitélio de testículos ipsilaterais dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado (animais com 4, 6 e 9 semanas). Mostrando diminuição da proliferação, nos testículos torcido em fase pré-púbere e adulta (TT4 e TT9). E aumento, nos ratos torcidos, tratados com 4 semanas de vida.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

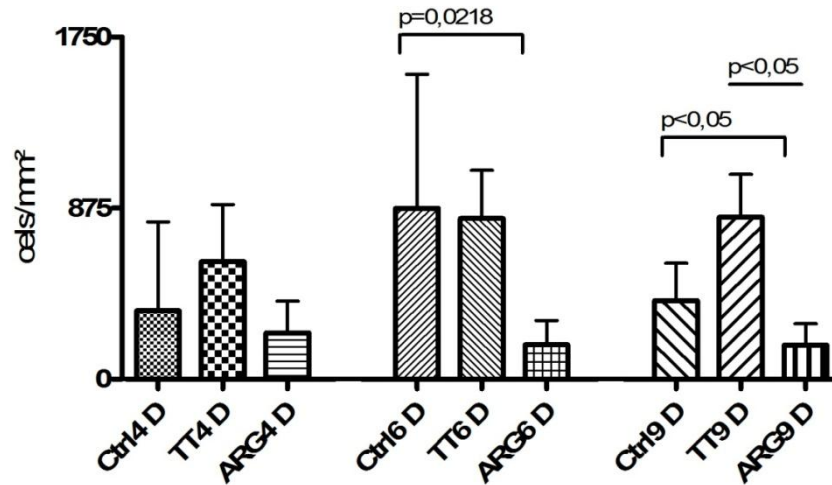
Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.5.2 Proliferação celular da região intersticial

O resultado desta análise revelou que não houve alteração significativa da proliferação celular da região intertubular dos testículos ipsilaterais, de animais submetidos à torção, quando comparados aos seus controles. Não foi encontrada diferença entre animais do grupo torcido com 4, 6 e 9 semanas de idade

O tratamento com L-arginina promoveu diminuição significativa da proliferação celular da região intersticial dos animais submetidos ao tratamento com 6 e 9 semanas de idade, como mostra a figura 47.

Figura 47 - Proliferação celular da região intersticial de testículos ipsilaterais dos ratos



Legenda: Animais dos grupos controle, torcido e tratado (animais com 4, 6 e 9 semanas). Mostrando diminuição da proliferação, nos testículos torcidos e tratados em fase púber e adulta (ARG6 e ARG9). E preservação, nos ratos torcidos e tratados com 4 semanas de vida.

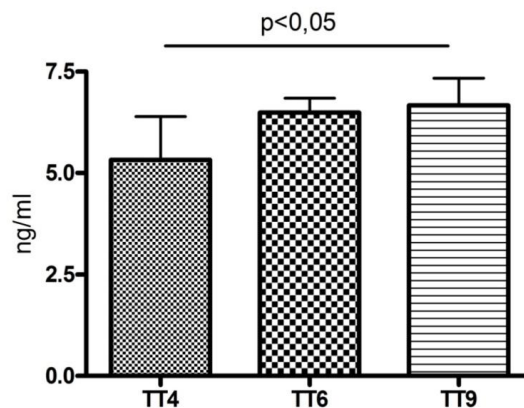
Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

### 3.6 Dosagem de testosterona sérica

Os resultados desta análise revelaram que, com 14 semanas de idade, os animais do grupo torcido com 9 semanas de idade apresentaram concentrações séricas de testosterona significativamente maiores do que os animais que sofreram TT com 4 semanas de idade, como ilustra a figura 48.

Figura 48 - Testosterona sérica dos ratos adultos



Legenda: Animais dos grupos torcidos (com 4, 6 e 9 semanas). Mostrando diminuição da concentração sérica de testosterona, em animais TT4, quando comparados com TT9.

Nota: Dados expressos em média e desvio padrão, onde  $p < 0,05$ .

Fonte: MILHOMEM, 2013.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que a TT de 720° com duração de 4 horas produz grandes danos morfofuncionais no testículo torcido de ratos, independente da idade em que ocorreu a torção. Entretanto as mesmas alterações não foram observadas, quando avaliamos os testículos contralaterais. A literatura mostra uma metodologia bastante variada, onde fatores como a espécie animal, idade, o modo de se produzir a isquemia, a duração e o tipo de avaliações, dificultam a comparação dos trabalhos (SILVA et al, 2010).

Os resultados do efeito da isquemia e reperfusão nos testículos contralaterais e ipsilaterais, provocados por torção testicular, em literatura, são controversos e discrepantes, mas corroborando nossos achados, alguns alegam não haver danos, no testículo contralateral em modelos animais de TT (FILHO et al, 2004; TURNER, 1985; BECKER; TURNER, 1995; NAGLER et al, 1984), enquanto outros, reportam severas alterações histológicas e bioquímicas, que induzem ao dano tecidual do testículo contralateral (CONSENTINO et al, 1985).

Lorenzine (2012) relata não haver alterações em testículos contralaterais, de ratos pré-puberes, submetidos à isquemia, por torção de 1080° do cordão espermático, em longo prazo (1, 5, 10 e 90 dias), onde foram avaliados critérios morfológicos (altura de epitélio, diâmetro do túbulo seminífero, escore de Johnsen e número de células germinativas nos túbulos em estágios VII e VIII, do ciclo do epitélio). Para corroborar esse relato, usando a torção unilateral, de ratos adultos, com 720° por uma, duas e quatro horas, Turner (1985) não observou alterações na espermatogênese do testículo contralateral, após 30 e 60 dias.

No presente trabalho, apesar do testículo contralateral não ter apresentado alteração morfofuncional, as alterações morfológicas que ocorreram nos testículos torcidos podem ter sido geradas pelos radicais livres, que oxidam o lipídio das membranas celulares, quando o tecido é submetido à hipóxia ou isquemia, respondem com aumento da permeabilidade vascular, edema intra e extracelular e finalmente com apoptose ou necrose celular (FILHO et al, 2004). A preservação da espermatogênese do contralateral é essencial para manutenção da fertilidade do paciente (LORENZINI et al, 2012). Em relação aos testículos torcidos, independente da idade em que ocorreu a torção, danos teciduais diversos foram encontrados após a TT de 720° por 4 horas, como a diminuição do diâmetro do túbulo, altura do epitélio, comprimento tubular, escore de Johnsen, e da proliferação epitelial. O estudo das frequências

dos estágios do ciclo de epitélio seminífero (VIGUERAS et al, 2003) foi utilizado na avaliação da espermatogênese do testículo contralateral, após torção e mostrou haver lesão, principalmente, em número considerável de túbulos seminíferos entre os estágios VI e XI. Ainda, neste estudo, constatou-se que os estágios IX e XI foram mais afetados quando comparados ao restante dos estágios. Já Jeffrey (2000) avaliou os estágios com base no grau de apoptose, e verificou que depois de 4 horas de torção testicular os estágios II e III do ciclo de epitélio seminífero foram os mais afetados. Em nosso estudo, somente o estágio IV dos animais pré-puberes que sofreram TT teve a frequência reduzida. Deste modo, não foi possível correlacionar as lesões testiculares às alterações de frequência dos estágios do ciclo de epitélio seminífero. Nos animais que sofreram torção testicular com 9 semanas de idade o dano no epitélio foi tão intenso, que não foi possível avaliar a frequência dos estágios do ciclo de epitélio seminífero.

Os relatos de Becker e Turner (1995) verificaram que a TT de  $720^\circ$  por 4 horas é suficiente para causar danos significativos no testículo torcido de ratos e outro estudo alega diminuição da função reprodutiva de todos os animais submetidos à torção de  $720^\circ$ , por 9 horas, seguido de destorção (PAKYZ et al, 1990). Sua análise Lorenzini et al. (2012) corroborou nossos achados, onde a contagem de células germinativas, de acordo com os critérios de análise do ciclo de epitélio, revelou não haver efeito, a longo prazo, sobre a espermatogênese do testículo contralateral, e que a orquiectomia do ipsilateral não é necessária para prevenção da espermatogênese contralateral. Entretanto os animais no estudo de Lorenzini não foram submetidos à reperfusão testicular. Em contrapartida, Heindel et al, (1990) e Parkyz et al (1990), com torção de  $1080^\circ$ , com reperfusão, encontraram danos, como redução da fertilidade e do diâmetro do túbulo no testículo contralateral.

Consentino et al.(1985), também demonstrou que a orquiectomia do testículo torcido causa menos disfunção reprodutiva que a destorção. Em relatado (PAKYZ et al, 1990).mostrou que ratos submetidos à torção, sem tratamento (ciclosporina e prednisona), tiveram redução do percentual de gravidez das fêmeas que foram submetidas ao acasalamento. Seus resultados afirmam que a taxa de fertilidade dos ratos do grupo orquiectomizado, pós-torção, não se mostrou diferente de animais hemicastrados, e do grupo controle. O que nos sugere que, ratos submetidos à orquiectomia unilateral, apesar de apresentarem índices reprodutivos mais baixos do que o grupo controle, conseguem manter a capacidade reprodutiva (PAKYZ et al, 1990). Apesar destes dois trabalhos utilizarem tempos de torção maiores, nossos achados, mostraram que não houve diminuição da função reprodutiva em ratos adultos que sofreram TT de  $720^\circ$  por 4 horas seguida de destorção,

independente da idade em que a torção ocorreu. Esta discordância pode ser justificada principalmente pela diferença no tempo de TT que foi de 4 horas no nosso trabalho e de 9 horas no trabalho de Pakyz et al. (1990) e 9 a 12 no estudo de Cosentino et al. (1985). Isto demonstra que o tempo de torção é um fator importante e que deve ser levado em consideração no prognóstico da TT.

Tais achados sugerem que os danos gerados pela isquemia, atuam de forma pontual, mostrando que um curto período de isquemia causa perda das células germinativas, enquanto que, longos períodos isquêmicos, levam primeiro à perda de células de Sertoli e depois das células de Leydig (BAKER e TURNER, 1994). Nosso estudo utilizou a torção do cordão espermático a 720°, por 4 horas, seguida de reperfusão e avaliação a longo prazo, com comprometimento do epitélio seminífero nos testículos torcidos, mas sem alterações nos testículos contralaterais que foram suficientes para manter a função reprodutiva. Muitas teorias vêm sugerindo a explicação da injúria da espermatogênese no testículo contralateral, como a indução autoimune, da necrose de células germinativas no testículo torcido (HEINDEL et al, 1990), produção de espécie reativas de oxigênio (Vigeras et al, 2004) e reflexo simpático do contralateral (TANDER et al, 1988). Um estudo de Arap et al. (2007) sugere que anticorpo antiespermático pode de ser usado como marcador de função testicular, pós-cirúrgica. Dondero et al. (1980) demonstrou *in vitro*, que linfócitos-T, isolados de testículos atrofícos humanos, secretam factor de inibição de macrófagos na presença de esperma.

O tratamento com a L-arginina no período de reperfusão a longo prazo, mostrou-se capaz de exercer um efeito protetor sobre os testículos torcidos, independente da idade de torção. Entretanto, tal efeito foi melhor observado em animais do grupo pré-púbere, onde as alterações causadas pela TT foram significativamente reduzidas em importantes parâmetros avaliados como no peso e volume do testículo torcido, diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio, comprimento tubular e proliferação celular do epitélio. Além disso, o tratamento com a L-arginina nos animais que sofreram a torção no período pré-púbere também foi capaz de aumentar o volume e a concentração espermática do testículo contralateral, o que certamente foi responsável pelo aumento da potência dos animais na avaliação de fertilidade. Tal fato sugere que, esse aminoácido atua estimulando o efeito compensatório, no testículo não lesionado. Segundo Garner e Hafez (2004), algumas espécies animais contêm quantidades variadas de histonas ricas em arginina, nos espermatozoides. Estas proteínas nucleares básicas são importantes para condensação e estabilização do DNA espermático.

Um achado importante em relação ao grupo de operado com 9 semanas de idade, no qual os testículos torcidos não tratados apresentaram-se aspérmicos com grande alteração tubular, o que impossibilitou a análise do epitélio, foi a recuperação parcial da espermatogênese após tratamento com a L-arginina. Animais de mesma idade apresentaram espermatozóides mensuráveis em análise de concentração, motilidade e viabilidade espermática. Não houve recuperação completa do parênquima testicular, contudo, foi possível avaliar a presença de alguns túbulos contendo epitélio parcialmente preservado e/ou preservado em estágios I, IV e VII. Contudo, o tratamento com a arginina não causou o mesmo efeito no testículo torcido do grupo operado com 6 semanas de idade, no qual foi possível observar um decréscimo de túbulos em estágios II-III e VIII, quando comparados ao grupo controle de mesma idade. Não houve diferença nos estágios do ciclo do epitélio do testículo contralateral

A L-arginina também atuou no ganho de peso dos animais do grupo pré-púbere, quando comparados com animais torcidos de mesma idade. Não houve diferença entre o peso dos animais púberes e adultos. Baseado nos pressupostos de que a infusão de aminoácidos pode aumentar a secreção de hormônio de crescimento (GH), e que o metabolismo deste hormônio está relacionado com a secreção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), Fayh et al. (2007), realizou estudo com humanos adultos (17 anos), demonstrando que a suplementação de L-arginina durante sete dias foi ineficaz para aumentar a secreção de GH e IGF-I em indivíduos adultos do sexo masculino. Isto sugere que o efeito da arginina no crescimento pode ser tardio e maior em animais mais jovens, pois os animais de 4 semanas de idade, além de receberem o aminoácido no período pré-púbere, foram avaliados 70 dias após o tratamento, diferente dos grupos tratados com 6 e 9 semanas de idade que foram avaliados respectivamente 56 e 35 dias após o tratamento. O ganho de peso corporal após o tratamento com a arginina do grupo pré-púbere foi acompanhado da recuperação do peso e do volume do testículo torcido, bem como do aumento do volume do contralateral. Além deste achado, também foi encontrado um aumento do diâmetro do túbulo, da densidade volumétrica dos vasos sanguíneos e do lúmen do compartimento tubular, em relação ao grupo torcido. Animais que sofreram a TT na idade adulta, também apresentaram recuperação no peso e volume testicular, e os que sofreram a TT na puberdade, aumento do volume do testículo contralateral.

Os animais tratados com L-arginina apresentaram maiores índices reprodutivos, apesar da TT não ter causado nenhuma disfunção significativa da função reprodutiva. O grupo que sofreu a TT e tratamento com a arginina com 9 semanas de idade foi o que apresentou mais

alteração no teste de fertilidade, mostrando maior potência. Este resultado pode estar relacionado com o efeito protetor mediado pelo NO, que atua como vasodilatador e melhora o fluxo sanguíneo após a torção (BARLAS et al, 2002).

A testosterona atua de maneira imperativa sobre a habilidade de cópula dos machos, através da libido. Apesar de haver diferença nas concentrações de testosterona sérica dos animais torcidos, onde pré-púberes sofreram diminuição significativa, quando comparados com os adultos, não houve diferença na potência entre animais deste grupo. Esse resultado revelou que houve prejuízo da função secretora das células de Leydig, mais evidente em animais pré-púberes, o que pode ser resposta à crescente produção de testosterona durante o desenvolvimento sexual dos machos (STANLEY et al, 2012), logo uma lesão no início do desenvolvimento gonadal pode gerar sequelas maiores do que em células já formadas. Com aproximadamente 20 dias, o espermatócito em fase de leptóteno, está presente no epitélio germinativo, e as divisões das células de Sertoli cessam e começa a maturação. Com 30 dias, as células de Leydig alcançam a maturidade (RAMALEY, 1979) e com 45 dias de idade, o rato atinge a puberdade, com espermatozóide aparecendo nos túbulos seminíferos e células de Sertoli maduras (CLERMONT; PEREY, 1957).

Em estudo com ratos pré-púberes, submetidos à torção e tratados com imunomoduladores, como a ciclosporina e prednisona, não houve diferença entre as concentrações séricas de testosterona, quando comparados com o grupo controle (PAKYZ et al, 1990). Heindel et al, 1990, afirmaram em seu estudo experimental, com ratos em diferentes idades (30 a 70 dias), submetidos à torção de 1080°, por 9 horas, seguido de destorção, que o grupo torcido com 70 dias, foi o único a sofrer redução da concentração sérica de testosterona, contradizendo os achados do presente estudo. O que nos indica que apesar de não haver proteção completa aos danos teciduais causados pela isquemia e reperfusão em nosso modelo experimental de TT, a L-arginina atuou como antioxidante no tecido do testículo torcido e contralateral, aumento parâmetro de fertilidade (potência) em animais torcidos na pré e puberdade e aumento da concentração espermática do contralateral em animais tratados.



## CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que 4 horas de torção testicular de 720°, em ratos, é capaz de gerar danos morfológicos aos testículos ipsilaterais, independente da idade e maturidade sexual em que a TT ocorreu. Houve diminuição do peso e volume testicular em todas as idades. Entretanto tais danos não geraram alteração da função reprodutiva em idade adulta.

O uso da L-arginina não foi capaz de melhorar significativamente os parâmetros espermáticos em ratos que sofreram torção testicular de 720° por 4 horas, independente da idade em que a TT ocorreu. Entretanto, recuperou a produção de espermatozoides no grupo que sofreu a TT em fase adulta e aumentou a concentração de espermática nos grupos tratados em fase pré-púbere e púbere, em relação ao controle de mesma idade.

O uso da arginina melhorou a morfologia testicular, recuperou o epitélio seminífero no grupo que sofreu a TT quando adultos e o grupo mais beneficiado com o tratamento foi o dos animais que foram submetidos à TT na pré-puberdade, agindo como antioxidante e protegendo o tecido contra os danos causados pelos radicais livres.

## REFERÊNCIAS

- Aktas BK, Bulut S, Baykam MM, et al. The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatric surgery international*. 2010; 26: 293.
- Amann RP, Shanbacher BD. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*. 1983; 57(2):380-403.
- Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, Arap S, Srougi M. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl*. 2007; 28(4):528-532.
- Baker LA and Turner TT. Leydig cell function after Experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J of Androl*. 1995;16:12-17.
- Becker EJ Jr., Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *Journal of andrology*. 1995; 16: 342-51.
- Barlas M, Hatiboglu C. The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *International urology and nephrology*. 2002; 34: 81.
- Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medic*. 1998; 58:350-6.
- Clermont Y and Perey B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *American Journal of Anatomy*. 1957; 100(2):241-67.
- Córdova A, Navas JF. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. *Rev Bras Med Esporte*. 2000; 6:204-8.
- Cosentino M J, Nishida M, et al. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *Journal of andrology*. 1985; 7(1): 23-31.
- Costa E, França AT, et al. Nitric oxide and bronquial asthma – review. *Rev. bras. alergía imunopatol*. Maio-jun, 1999; 22(3):83-93.
- Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, et al. Adult testicular torsion. *The Journal of urology*. 2002; 167: 2109.
- de Aguiar Picanco E, Lopes-Paulo F, Marques RG, et al. L-arginine and glycine supplementation in the repair of the irradiated colonic wall of rats. *International journal of colorectal disease*. 2011; 26: 561.

- Dokmeci D, Kanter M, Inan M, et al. Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Archives of toxicology*. 2007; 81: 655-63.
- Dokmeci D, Inan M, et al. Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell biochemistry and function*. 2007; 25(6): 611-618.
- Dondero F, Lenzi A, Picardo M, Pastore R, Valesini G. Cellmediated antisperm immunity in selected forms of male infertility. *Andrologia*. 1980; 12:25-29.
- Elshaari FA, Elfagih RI, Sherif DS, and Barassi IF. Oxidative and antioxidative defense system in testicular torsion/detorsion. *J UROL*. 2011; 27(4):479-84.
- Favorito LA, Cavalcante AG, Costa WS. Anatomic aspects of epididymis and tunica vaginalis in patients with testicular torsion. *Int Braz J Urol*. 2004;30:420-424.
- Fawcett DW, Neaves WB, and Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*. 1973; 9:500-532.
- Fayh A P T, Friedman R, Sapata K B, Oliveira A R. Efeito da suplementação de L-arginina sobre a secreção de hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina em adultos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007; 51(4):07-15.
- 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; 25:199-210.
- Francisco Neto A, Silva JC, Fagundes DJ, Percário S, Novo NF, Juliano Y, Moreira Neto AA. Oxidatives alterations, total antioxidant status and nitric oxide study in rats submitted to ischemia and reperfusion of hind limbs. *Acta Cir. Bras*. 2005; 20(2): 134-139.
- Garner DL, Hafez ESE. Espermatozóides e plasma seminal. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução animal*. 2004; 7 ed. Bauveri; Manole Ltda, 7:97-110.
- Gunther P, Schenk JP, Wunsch R, Holland-Cunz S, Kessler U, Troger J, Waag KL. Acute testicular torsion in children: The role of sonography in the diagnostic workup. *European radiology*. 2006;16:2527-2532.
- Heindel RM, Pakyz RE, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion. Contralateral testicular degeneration at various ages in the rat. *Journal of andrology*. 1990; 11: 506-13.
- Hekimoglu A Z, Kurcer et al. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2009; 218(2): 141-147.
- 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*. 2010;184:790-796.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, et al. 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; 70: 219-28.

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;1:2-25.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. 2011; Rio de Janeiro, 8 ed. Ed: Guanabara Koogan.

Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Experimental and molecular pathology*. 2010; 89: 314-20.

Kapoor S, Testicular torsion: a race against time. *Int. J. Clin. Pract.* 2008; 62(5) 821-827.

Kehinde EO, Anim JT, Moijiminiyi AO, Al-Awadi F, Shihab-Eldeen A, Omu AE, Fatiniku T, Prasad A, Abraham M. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int.* 2005; 96:175-180.

Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.* 1995; 221:220-35.

Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion - induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res.* 1994; 74:376-82.

Kutlu O, Mentese A, Turkmen S, Turedi S, Gunduz A, Yulug E, Alver A, Karahan SC. Investigation of the possibility of using ischemia-modified albumin in testicular torsion: An experimental study. *Fertility and sterility*. 2010, 95(4):1333-7.

Lavallee ME, Cash J. Testicular torsion: Evaluation and management. *Current sports medicine reports*. 2005;4:102-104.

Leblond CP, Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "Periodic acid-fuchsin sulfuric acid" Technique. *The American Journal of Anatomy*. 1952; 90:167-215.

Lorenzini F, Tambara Filho R, et al. Long-term effects of the testicular torsion on the spermatogenesis of the contralateral testis and the preventive value of the twisted testis orchiopididymectomy. *Acta cirurgica brasileira / Soc Br Desenvol Pesq em Cirurgia*. 2012; 27(6): 388-395.

Lysiak JJ, Turner SD, Turner TT. Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. *Biology of reproduction, - Soc Study Reprod*. 2000; 63:1465-1472.

Louis Hermo RP, Daniel GC, Charles ES. Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatocytes. *Microsc. Res. Tech.* 2010;73; 243-278.

Moore KL, Dalley AF. Anatomia orientada para a clínica. 2007; 5 ed. Rio de Janeiro - RJ: Ed. Guanabara Koogan.

Motrich RD, Ponce AA, Rivero VE. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertil Steril*. 2007; 88:452-461.

Nagler HM, White R. The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *J Urol*. 1982;128:1343-8.

Nagler HM, Deitch AD, de Ver White R. Testicular torsion: temporal considerations. *Fertil, Steril*. 1984; 42, 257-262.

Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl*. 1990; 11:401-8.

Piffer RC, Garcia PC, Gerardin DCC, Kempinas WG, and Pereira OCM. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. *Reprod. Fertil. Dev*. 2009; 21,634–639.

Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: A surgical emergency. *American family physician*. 1991;44:834-840.

Raju AB, Challa SR, Akula A, Kiran A, Harinadh GB. Evaluation of oxidant and anti-oxidant balance in experimentally induced testicular injury by ischemia reperfusion in rats. *European Journal of General Medicine*. 2011; 8 (2):117.

Ramaley JA. Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biol Reprod*. 1979; 20:1-31.

Russel L, Ettlin RA, Sinha A, and Clegg E. Histological and histopathological evaluation of the testis. 1990; Florida, 16(1):83.

Salmasi AH, Beheshtian A, Payabvash S, et al. Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: experimental study in testicular torsion rat model. *Urology*. 2005; 66:1338-1342.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57-60.

Sessions A E, Rabinowitz R, Hulbert WC, et al. Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. *The Journal of urology*. 2003; 169:663.

Shokeir AA, Baraka N, Hussein AM, Alada A, Abdel-Aziz A, and Abo-Elenin H. Role of combination of L-arginine and  $\alpha$ -tocopherol in renal transplantation ischemia/reperfusion injury: a randomized controlled experimental study in a rat model. *BJUI*. 2011; 108(4):612-8.

Silva RC, Costa GM, Andrade LM, et al. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*. 2010; 73: 157-67.

Sinha Hikim AP, and Swerdloff R S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of reproduction*. 1999; 4(1): 38-47.

Stanley E, Lin CY, Jin S, Liu J, Sottas CM, Ge R, Zirkin BR, Chen H. Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology*. 2012; 153:5002-5010.

Su J, Liu G, Zhao H, Chi C. Long-term influence of pubertal testicular torsion on spermatogenesis. *Urol Int*. 2006; 77(3):257-8.

Taha MO, Caricati-Neto A, Ferreira RM, Simões MdeJ, Monteiro HP, Fagundes DJ. L-arginine in the ischemic phase protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir*. 2012; 27(9):616-623.

Tander B, Sarica K, Baskin D, Abbasoglu L. Division of the genitofemoral nerve and late orchiectomy: effects on the contralateral testis in ipsilateral torsion. *Pediatr Surg Int*. 1988; 14(1-2):14-6.

Tucci JRS, Bessa JRJ, Baptistussi MD, Martins ACP. Patologia escrotal aguda: uma urgência cirúrgica. *J Pediatr*. 1993; 69: 290-292.

Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect contralateral testis. *J Androl*. 1985; 6(65-73).

Vigeras RM, Reyes G, Rojas-Castaneda J, Rojas P, Hernández R. Testicular torsion and its effects on the spermatogenic cycle in the contralateral testis of the rat. *Lab Anim*. 2004; 38(3):313-20.

Wang W W, Qiao S. Y, Li DF. Amino acids and gut function. *Amino acids*. 2009; 37: 105.

Wong GKT, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nefrol Dial Transplant*. 1996; 11:215-20.

Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE and Yin Y: Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2008; 37:153-168.

Wu G. - Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009; 37: 1-17.

**APÊNDICE A – Soluções utilizadas no experimento****SOLUÇÃO DE BOUIN**

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

**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

**PBS****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

**PBS / BSA 0,5%**

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

**SOLUÇÃO HIPO-OSMÓTICA**

- |   |         |
|---|---------|
| • Citrato de sódio dihidratado (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O)..... | 0,735g  |
| • Frutose.....  | 1,351 g |
| • Água destilada.....   | 1000ml  |

## **APÊNDICE B – Protocolo de análise de testosterona sérica 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.



## APÊNDICE C – Protocolo de coloração histoquímica

### 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

### 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

**APÊNDICE D** – Protocolo de coloração imunohistoquímica 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 e 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)

## APÊNDICE E – Artigo publicado

### Effect of Antioxidants on Outcome of Testicular Torsion in Rats of Different Ages

Carina T. Ribeiro, Raquel Milhomem, Diogo B. De Souza,\* Waldemar S. Costa, Francisco J. B. Sampaio and Marco A. Pereira-Sampaio

From the Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro (CTR, RM, DBDS, WSC, FJBS, MAP-S), Rio de Janeiro and Department of Morphology, Fluminense Federal University (MAP-S), Niterói, Brazil

#### Abbreviations and Acronyms

ARG = TT and arginine  
 ARG4 = 4-week-old ARG  
 ARG6 = 6-week-old ARG  
 ARG9 = 9-week-old ARG  
 Av = absolute volume  
 R = right testicle  
 RES = TT and resveratrol  
 RES4 = 4-week-old RES  
 RES6 = 6-week-old RES  
 RES9 = 9-week-old RES  
 SH = sham operation  
 SH4 = 4-week-old SH  
 SH6 = 6-week-old SH  
 SH9 = 9-week-old SH  
 TT = testicular torsion  
 TT4 = 4-week-old TT  
 TT6 = 6-week-old TT  
 TT9 = 9-week-old TT  
 Vv = volumetric density

**Purpose:** We assessed reproductive and testicular function in adult rats after testicular torsion created before, during and after puberty, and with vs without resveratrol or arginine treatment.

**Materials and Methods:** Age matched rats were divided into groups, including simulated surgery without testicular torsion, 720-degree testicular torsion for 4 hours, testicular torsion with resveratrol treatment and testicular torsion with arginine treatment. To study reproductive function at age 12 weeks each rat mated with 3 females. The males were sacrificed at age 14 weeks. Spermatozooids were collected from the epididymal tail and evaluated for concentration, motility and viability. Testicular samples were collected for morphological analysis.

**Results:** Reproductive function was not altered by testicular torsion but antioxidants improved potency. Compared to sham operated and contralateral samples all spermatozoid parameters from testicular torsion samples were inferior. Resveratrol and arginine did not improve spermatozoid quality or quantity in torsed testes but contralateral samples were improved by each drug. The seminiferous epithelium of rats submitted to testicular torsion during puberty was least affected. Each antioxidant partially to totally prevented the morphological alterations found in rats with untreated testicular torsion. Rats submitted to testicular torsion before puberty that were treated with antioxidants showed the fewest changes.

**Conclusions:** Testicular morphology was altered less in rats when torsion occurred earlier in life, that is during puberty. Treatment with antioxidants improved contralateral spermatozoid production and some fertility parameters. Each antioxidant also prevented testicular morphology alterations after testicular torsion. Prepubertal rats benefited most from antioxidant treatment.

**Key Words:** testis, spermatic cord torsion, puberty, resveratrol, arginine

Accepted for publication September 30, 2013.  
 Study received local ethics committee approval.

Supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development, Coordination for Improvement of Post-Graduated Students and Foundation for Research Support of Rio de Janeiro, Brazil.

\* Correspondence: Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87-Fundos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20551-030 (telephone and FAX: + 55 21 2968-8399; e-mail: [diogobenchimol@gmail.com](mailto:diogobenchimol@gmail.com)).

TESTICULAR torsion is a urological emergency that induces biochemical and morphological changes.<sup>1</sup> TT can affect males of any age but it occurs more often in neonates, boys and young men.<sup>2</sup> To our knowledge the impact on prognosis of age at TT is unknown.

The prognosis of TT is related to the duration and degree of torsion, resulting in different levels of parenchymal injury by oxidative stress.<sup>3</sup> Therefore, beyond rapid diagnosis and treatment several methods have been investigated to minimize the injury caused by TT.<sup>4,5</sup> Although rat

testes differ somewhat from human testes, rats have been widely used as experimental models in TT studies because lesions in rat testes are comparable to those in human testes after torsion.<sup>6</sup>

Several antioxidants have been investigated with promising results in rats submitted to TT. Of these antioxidants resveratrol and arginine have shown good results when used in testicular ischemia and reperfusion situations.<sup>7,8</sup> Arginine, an amino acid with antioxidant properties, is important for nitric oxide synthesis.<sup>9</sup> Resveratrol is a potent antioxidant present in many food sources that has inhibitory activity against reactive oxygen species and also enhances nitric oxide bioavailability.<sup>10</sup>

Although some groups reported beneficial results using these drugs, no quantitative evaluation of testicular parenchyma was performed. Also, to our knowledge no study has addressed morphological damage to the torsed testis, spermatozoid production or reproductive function after resveratrol and arginine treatment in rats submitted to TT at different ages.

We quantitatively assessed testicular morphology, spermatozoid parameters and reproductive function in adult rats that underwent TT before, during and after puberty. We also evaluated the effect of resveratrol and arginine treatments.

## MATERIALS AND METHODS

We used 106 male Wistar rats for TT experiments. Three unrelated females per male (total 318) were used for the fertility tests described. The rats remained with the mother until week 3 of life. They were then kept in a room with a controlled temperature (mean  $\pm$  SD 25C  $\pm$  1C) and artificial dark-light cycle (lights on from 7:00 am to 7:00 pm), and had free access to standard rat chow and water. All experiments were done by blinded observers according to the Brazilian law for scientific use of animals and they were approved by the local ethics committee.

Male rats were randomly assigned to 12 groups. The 3 age groups were prepuberty (4 weeks), puberty (6 weeks) and adulthood (9 weeks). The treatment groups were SH, TT without antioxidant therapy, RES and ARG. The SH group included 10 prepubertal, pubertal and adult rats each. The TT group included 10 prepubertal, 9 pubertal and 9 adult rats. The RES and ARG groups included 8 prepubertal, pubertal and adult rats each.

After general anesthesia induction TT was induced by opening the scrotum and the lamina parietalis of the tunica vaginalis, and twisting the right testis 720 degrees clockwise. The torsed testicle was fixed in position by sutures and torsion was maintained for 4 hours with the rat under general anesthesia. Rotation duration and degree were based on a previous study showing that they produced significant damage in the rat testis.<sup>11</sup> After this period the organs were untwisted and fixed in anatomical position. In SH rats the same surgical approach was used to open the tunica vaginalis. The testicle was sutured in anatomical position for the same period but not twisted.

RES4, RES6 and RES9 rats received resveratrol (30 mg/kg) intraperitoneally 30 minutes before testicle detorsion. For 7 days postoperatively resveratrol was administered daily by gavage at the same dose.<sup>12</sup> ARG4, ARG6 and ARG9 rats received arginine (650 mg/kg) by gavage for 7 days postoperatively.<sup>13</sup>

At age 12 weeks all male rats were mated with 3 estrous females to determine fertility parameters.<sup>14</sup> Females were sacrificed on day 20 of gestation. The uterus was opened, pregnancy was confirmed and the number of fetuses and implantation sites was recorded. The ovaries were observed under magnification and the number of corpora lutea was counted. Potency was calculated as the percent of female rats with confirmed copulation divided by the number exposed for mating. The fertility index was calculated as the percent of implantation sites divided by the number of corpora lutea. The fecundity of each group was considered the percent of male rats that generated at least 1 fetus divided by the total number of male rats in the same group. We also calculated preimplantation and postimplantation losses.

All males were sacrificed at age 14 weeks by anesthetic overdose. Just after sacrifice spermatozoids were collected from the epididymal tail to determine concentration and motility in a Neubauer chamber.<sup>15</sup> Spermatozoid viability was assessed by the hypo-osmotic test.<sup>16</sup> In this analysis 200 spermatozoids were evaluated per rat. Samples were collected and analyzed from the right torsed and the contralateral epididymides.

After sacrifice each testicle was dissected from the appendix and weighed. Volume was measured using the Scherle method.<sup>17</sup> The organ was then fixed and processed for paraffin embedding to obtain 5  $\mu$ m histological sections. Morphometric analysis was performed on hematoxylin and eosin stained slices and captured on a BX51 microscope with a coupled DP70 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

Testicular structure Vv was assessed by the point counting method.<sup>17</sup> Using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) we superimposed a test grid with 100 points over the testicular photomicrographs. Each structure touched by a point was counted and density was determined as a percent of the analyzed field.<sup>18</sup> For each testicle 25 fields were evaluated under 400 $\times$  magnification. We recorded the Vv of the tunica propria, seminiferous epithelium, tubular lumen, seminiferous tubule (the sum of these 3 structures), the vessels and the intertubular compartment, including vessels.

We calculated the Av of each mentioned structure by dividing testicular volume by structure Vv, expressed in ml.<sup>19</sup> Total tubular length was calculated as previously described.<sup>20</sup>

The diameter of 125 seminiferous tubules per rat was measured in each testis by applying a straight line that crossed the tubule. For this purpose we used ImageJ, which was previously calibrated to 100 $\times$  magnification. The line was applied in such a manner that it always passed through the center of the tubule. For this analysis we excluded tubules with an irregular shape.<sup>31</sup> Also, using this software the seminiferous epithelium height of randomly selected tubules was measured in each testis.

In this analysis 125 tubules per animal were assessed in images photographed at 200× magnification.

Cellular proliferation was evaluated separately in the interstitial and tubular spaces. Histological sections were immunostained with proliferation cell nuclear antigen antibodies (180110) with Histostain®-Plus labeling (859643, Invitrogen™). These sections were photographed under 400× magnification. The number of positive cells per mm<sup>2</sup> in the interstitium and seminiferous tubules was quantified using ImageJ.

We compared results in TT4, TT6 and TT9 rats to determine the possible role of age at TT onset in adult testicular function and morphology. Results in the SH, TT, RES and ARG groups were compared to verify whether antioxidant treatment could prevent testicular damage.

For each parameter results were initially analyzed by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Parametric data were then compared by 1-way ANOVA with the Bonferroni post test. Nonparametric data were compared by the Kruskal-Wallis test with the Dunn post test. All analysis was done in Prism® 4.0. Mean differences were significant at  $p < 0.05$ . All results are shown as the mean ± SD.

## RESULTS

### Age at TT Onset and Influence on Adult Testicle Function and Morphology

No statistical difference was found among the groups in the fertility test parameters investigated. Table 1 lists the numerical results of the fertility tests.

On spermatozoid analysis all rats with TT had lower concentration, motility and viability than SH rats regardless of age. TT9R samples completely lacked of spermatozoids. However, statistical analysis of the spermatozoid concentration indicated no difference among the TT groups. Since there were no spermatozoids in TT9R specimens, motility and viability analyses were performed only in TT4R and TT6R samples with no statistical difference noted. Table 2 lists the numerical results of spermatozoid analyzed parameters.

Testicular volume and weight also did not differ among TT4R, TT6R and TT9R specimens. However, the seminiferous epithelium histological parameters Av and Vv were greater in TT6R than in TT4R or TT9R samples (fig. 1). Table 3 shows the numerical results of morphological analysis.

### Antioxidant Treatment Influence on TT

Fertility tests demonstrated some improvement in the groups treated with antioxidants. RES4 and RES6 rats showed 52% and 142% increased potency, respectively, compared to untreated rats. The ARG4, ARG6 and ARG9 groups also showed an increase in this parameter (66%, 187% and 113%, respectively). Interestingly, in ARG6 rats potency was even

**Table 1. Fertility test data by age at onset**

	Mean ± SD SH	Mean ± SD TT	Mean ± SD RES	Mean ± SD ARG
<i>Prepubertal</i>				
Potency	0.61 ± 0.15	0.50 ± 0.23	0.76 ± 0.22*	0.83 ± 0.23*
Fertility	0.89 ± 0.15	0.77 ± 0.29	0.93 ± 0.09	0.95 ± 0.07
Fecundity	1.00 ± 0.00	0.90 ± 0.31	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Losses:				
Preimplantation	0.10 ± 0.15	0.12 ± 0.06	0.06 ± 0.09	0.04 ± 0.07
Postimplantation	0.10 ± 0.14	0.05 ± 0.07	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.04
Fetuses/litter	11.0 ± 2.57	11.31 ± 1.62	11.83 ± 1.44	11.68 ± 1.28
<i>Pubertal</i>				
Potency	0.56 ± 0.31	0.33 ± 0.28	0.80 ± 0.26*	0.95 ± 0.11*,†
Fertility	0.83 ± 0.12	0.85 ± 0.19	0.98 ± 0.07	0.89 ± 0.08
Fecundity	0.90 ± 0.31	0.66 ± 0.47	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Losses:				
Preimplantation	0.13 ± 0.09	0.17 ± 0.18	0.01 ± 0.07	0.10 ± 0.08
Postimplantation	0.21 ± 0.39	0.11 ± 0.11	0.10 ± 0.11	0.05 ± 0.10
Fetuses/litter	10.57 ± 2.27	10.75 ± 2.36	10.94 ± 1.65	10.94 ± 2.34
<i>Adult</i>				
Potency	0.60 ± 0.34	0.37 ± 0.30	0.66 ± 0.27	0.79 ± 0.24*
Fertility	0.89 ± 0.12	0.78 ± 0.35	0.88 ± 0.16	0.96 ± 0.05
Fecundity	0.90 ± 0.31	0.55 ± 0.52	1.00 ± 0.00*	1.00 ± 0.00*
Losses:				
Preimplantation	0.12 ± 0.12	0.08 ± 0.08	0.11 ± 0.16	0.03 ± 0.05
Postimplantation	0.06 ± 0.08	0.04 ± 0.09	0.03 ± 0.07	0.07 ± 0.05
Fetuses/litter	9.62 ± 3.81	7.77 ± 5.96	10.95 ± 2.71	10.66 ± 1.69

\*Statistically different vs same age TT.

†Statistically different vs same age SH.

greater than in rats of the same age with SH. Each antioxidant also improved fecundity in TT9 rats.

Protection was considered total when TT results differed from SH results and antioxidant results were similar to those of SH but differed from TT results. Protection was considered partial when TT results differed from SH results and antioxidant results were similar to those in the TT and SH groups.

TT induced a marked decrease in spermatozoid production and quality in torsed testicles regardless of age at TT. Spermatic damage was not prevented by antioxidant treatment. RES6R spermatozoid viability was the only improvement associated with antioxidant treatment. In this group results revealed partial protection since viability did not statistically differ from that in SH6R or TT6R samples. Interestingly, each antioxidant improved contralateral spermatozoid quantity and quality.

TT induced a 46% to 64% decrease in testicular weight and volume regardless of age at TT. Resveratrol treatment prevented this decrease in the TT4 group while arginine provided partial protection from atrophy in TT6 and TT9 rats.

Resveratrol prevented changes in tubular lumen Av, blood vessel Vv and total tubular length in RES4R samples (fig. 2). In RES9R samples resveratrol prevented cellular proliferation in the interstitial space (fig. 3). It was also partially effective in preventing changes in tubular compartment Av, intertubular compartment Vv and tubular cellular

**Table 2.** Spermatozoid analysis by age at onset

	Mean $\pm$ SD Rt Testis			Mean $\pm$ SD Contralat Testis		
	Concentration ( $10^6$ /ml)	% Motility	% Viability	Concentration ( $10^6$ /ml)	% Motility	% Viability
Prepubertal:						
SH	4.6 $\pm$ 2.1	51.1 $\pm$ 16.2	18.7 $\pm$ 5.0	5.6 $\pm$ 4.0	44.4 $\pm$ 7.0	29.1 $\pm$ 7.8
TT	0.1 $\pm$ 2.1*	10.6 $\pm$ 18.0*	3.20 $\pm$ 6.74*	3.9 $\pm$ 2.5	53.9 $\pm$ 15.2	26.1 $\pm$ 6.24
RES	0.6 $\pm$ 1.2*	12.0 $\pm$ 18.5*	1.35 $\pm$ 2.94*	8.9 $\pm$ 6.3†	44.4 $\pm$ 7.01	21.1 $\pm$ 3.12
ARG	2.0 $\pm$ 3.6*	10.3 $\pm$ 11.9*	6.1 $\pm$ 8.6*	8.9 $\pm$ 3.9†	41.0 $\pm$ 8.1	40.0 $\pm$ 8.7†
Pubertal:						
SH	4.0 $\pm$ 2.1	49.5 $\pm$ 15.5	22.7 $\pm$ 11.3	4.5 $\pm$ 1.8	57.1 $\pm$ 16.0	24.6 $\pm$ 11.2
TT	1.1 $\pm$ 1.7*	18.0 $\pm$ 28.3*	7.16 $\pm$ 10.0*	5.0 $\pm$ 3.0	50.4 $\pm$ 23.6	21.6 $\pm$ 8.23
RES	0.4 $\pm$ 1.0*	12.3 $\pm$ 23.3*	8.7 $\pm$ 16.2	8.4 $\pm$ 2.9*	68.6 $\pm$ 8.3	33.9 $\pm$ 3.11
ARG	0.4 $\pm$ 0.7*	14.4 $\pm$ 25.3*	9.0 $\pm$ 10.7†	6.5 $\pm$ 3.8	71.4 $\pm$ 9.6	34.4 $\pm$ 4.1
Adult:						
SH	6.2 $\pm$ 5.6	41.7 $\pm$ 20.1	16.5 $\pm$ 4.34	8.6 $\pm$ 4.5	42.1 $\pm$ 10.5	17.5 $\pm$ 3.59
TT	0.00 $\pm$ 0.00*	Not assessed	Not assessed	6.9 $\pm$ 2.4	47.1 $\pm$ 10.5	18.5 $\pm$ 9.35
RES	0.8 $\pm$ 2.3*	7.1 $\pm$ 15.2*	5.35 $\pm$ 12.4*	7.5 $\pm$ 2.1	36.7 $\pm$ 8.5	31.9 $\pm$ 5.6†
ARG	0.4 $\pm$ 0.6*	6.6 $\pm$ 9.5*	4.5 $\pm$ 4.8*	6.9 $\pm$ 2.5	48.0 $\pm$ 22.4	33.9 $\pm$ 7.86†

\* Statistically different vs same age SH.

† Statistically different vs same age TT.

‡ Statistically different vs same age SH and TT.

proliferation in RES4R samples. In RES6R specimens resveratrol partially prevented changes in intertubular compartment Vv. In RES9R samples resveratrol partially prevented the epithelial height reduction. However, resveratrol had a negative effect on some parameters. It decreased tunica propria Vv in testes torsed at ages 4 and 6 weeks, and also decreased the tubular compartment Vv in testes torsed at age 6 weeks.

Arginine partially prevented changes in seminiferous tubule diameter, seminiferous epithelium height, Vv and Av, blood vessel Vv, tunica propria Av and tubular compartment cellular proliferation in ARG4R specimens. In ARG9R samples arginine prevented increased cellular proliferation in the interstitial space. In ARG9R specimens it also partially prevented a decrease in epithelial height. However, arginine had a negative effect on some parameters. It decreased tunica propria Vv and blood vessel Av in ARG4R samples, decreased seminiferous epithelium Vv and Av in ARG6R samples, and increased blood vessel Vv in ARG9R

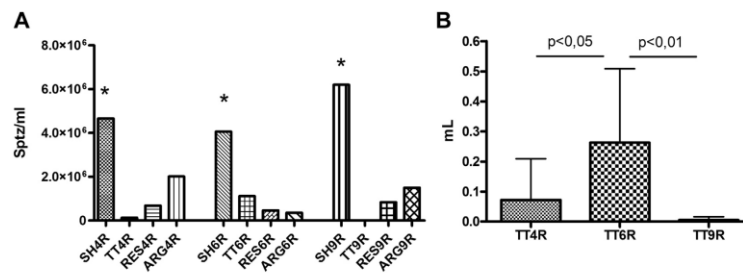
samples. Table 4 shows the histological parameters protected by antioxidant treatment.

## DISCUSSION

To our knowledge we evaluated for the first time all of certain variables together, including the TT effect on morphological, spermatid and fertility parameters. We compared rats of different ages and the effect of treatment with 2 different antioxidants.

Although TT may occur at any age, these age related prognoses have never been reported previously.<sup>11</sup> Our results revealed a significant decrease in sperm concentration without a statistical difference by age at TT onset. Nevertheless, adults were most affected by TT with azoospermia apparent in the torsed testis. Morphological data support these findings since TT9R specimens showed almost complete epithelial loss. The epithelium of pubertal rats was least affected by TT.

Also, spermatozoid parameters in TT6 rats were higher than in TT4 and TT9 rats, although this



**Figure 1.** A, Mean  $\pm$  SD spermatozoid (Sptz) concentration in SHR, TTR, RESR and ARGR epididymal tail. Asterisk indicates significant difference between SHR and other groups at same age. B, Mean  $\pm$  SD Av of right testis seminiferous epithelium.

Table 3. Right testis histological analysis

	Mean ± SD Prepubertal				Mean ± SD Pubertal				Mean ± SD Adult			
	SH	TT	RES	ARG	SH	TT	RES	ARG	SH	TT	RES	ARG
Seminiferous tubular diameter (µm)	270 ± 17.9	166 ± 61.0*	182 ± 59.6*	230.3 ± 85.63*	300 ± 21.8	198 ± 89.2*	202 ± 15.0*	204.7 ± 41.95*	312 ± 12.1	217 ± 23.3*	232 ± 23.0*	203.7 ± 15.47*
Seminiferous epithelium												
Ht (µm)	47.6 ± 5.61	15.3 ± 20.7*	27.9 ± 12.4*	26.59 ± 20.45	48.3 ± 7.56	15.6 ± 19.8*	23.5 ± 15.3*	17.14 ± 13.98*	54.7 ± 2.63	0.00 ± 0.00*	17.4 ± 20.5	20.9 ± 15.5*
% Vv	32.3 ± 5.30	8.75 ± 11.9*	8.97 ± 9.84*	15.23 ± 18.07	45.3 ± 4.95	25.9 ± 17.5*	6.58 ± 13.5*	6.23 ± 8.84*,†	39.4 ± 5.86	0.84 ± 1.76*,‡	3.88 ± 10.5*	0.04 ± 0.14*
Av (µm)	0.45 ± 0.06	0.07 ± 0.13*	0.09 ± 0.10*	0.275 ± 0.324	0.69 ± 0.06	0.26 ± 0.24*,†	0.08 ± 0.11*	0.06 ± 0.10*,†	0.55 ± 0.26	0.00 ± 0.01*,§	0.01 ± 0.04*	0.005 ± 0.011*
Tunica propria:												
% Vv	6.67 ± 2.06	5.83 ± 1.83	3.12 ± 0.75*,†	3.31 ± 1.74*,†	6.66 ± 1.95	5.76 ± 0.93	3.42 ± 0.58*,†	4.87 ± 1.26	5.19 ± 1.09	3.72 ± 2.53	3.30 ± 1.53	3.30 ± 0.52
Av (µm)	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.03*	0.03 ± 0.01*	0.06 ± 0.030	0.10 ± 0.02	0.04 ± 0.01*	0.02 ± 0.01*	0.03 ± 0.02*	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.02*	0.02 ± 0.01*	0.03 ± 0.017*
Tubular lumen:												
% Vv	32.6 ± 7.13	33.2 ± 6.37	35.9 ± 13.3	29.60 ± 14.19	38.6 ± 7.76	38.8 ± 11.4	45.9 ± 8.07	46.18 ± 13.60	40.4 ± 7.32	42.7 ± 28.5	37.2 ± 15.2	40.07 ± 15.66
Av (µm)	0.47 ± 0.13	0.15 ± 0.14*	0.46 ± 0.21§	0.54 ± 0.25§	0.60 ± 0.16	0.32 ± 0.18*	0.37 ± 0.11*	0.33 ± 0.20*	0.53 ± 0.27	0.31 ± 0.23	0.30 ± 0.17	0.36 ± 0.24
Tubular compartment:												
% Vv	71.6 ± 7.90	47.8 ± 17.0*	52.9 ± 9.71*	48.15 ± 28.08*	90.6 ± 2.98	73.4 ± 17.9*	57.9 ± 12.3*	57.28 ± 18.52*	85.6 ± 1.76	47.3 ± 31.2*	44.2 ± 20.8*	48.40 ± 5.051*
Av (µm)	1.02 ± 0.18	0.25 ± 0.31*	0.58 ± 0.29	0.88 ± 0.49§	1.38 ± 0.14	0.63 ± 0.43*	0.47 ± 0.17*	0.43 ± 0.30*	1.17 ± 0.55	0.34 ± 0.26*	0.34 ± 0.26*	0.39 ± 0.26*
Inter-tubular compartment:												
% Vv	8.23 ± 2.85	36.5 ± 20.5*	24.2 ± 13.4	35.71 ± 26.65*	9.34 ± 2.88	28.8 ± 17.2*	19.1 ± 13.9	25.80 ± 18.36*	14.9 ± 1.83	52.6 ± 31.2*	39.9 ± 22.7*	40.63 ± 21.07*
Av (µm)	0.11 ± 0.03	0.15 ± 0.25	0.29 ± 0.11	0.71 ± 0.51*,†	0.14 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.18 ± 0.21	0.16 ± 0.13	0.20 ± 0.10	0.40 ± 0.44	0.35 ± 0.19	0.37 ± 0.20
Blood vessel:												
% Vv	0.87 ± 0.57	4.37 ± 3.99*	1.51 ± 0.94§	2.533 ± 1.187	1.68 ± 1.02	3.36 ± 1.91	1.90 ± 1.26	2.00 ± 0.91	1.10 ± 0.34	2.26 ± 0.75	3.24 ± 1.53*	2.13 ± 0.81*
Av (µm)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.046 ± 0.0211*,†	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.009	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.019 ± 0.009
Tubular length (µm)	18.0 ± 4.45	9.29 ± 7.11	18.3 ± 4.01	13.01 ± 13.36	19.6 ± 3.01	9.63 ± 7.28*	7.41 ± 2.41*	12.63 ± 7.83	16.1 ± 7.63	10.4 ± 7.15	9.80 ± 5.77	13.66 ± 7.91
Compartment cellular proliferation (cells/mm <sup>2</sup> ):												
Tubular	1.3 × 10 <sup>3</sup> ± 439	343 ± 426*	716 ± 476	841 ± 658	1.2 × 10 <sup>3</sup> ± 230	723 ± 394	403 ± 456	293.2 ± 488.0*	1.7 × 10 <sup>3</sup> ± 424	267 ± 233*	308 ± 570*	168.8 ± 226.8*
Inter-tubular	349 ± 454	601 ± 291	714 ± 718	236.4 ± 162.9	874 ± 686	621 ± 247	389 ± 273	175.9 ± 123.2*,†	401 ± 191	628 ± 219*	260 ± 3641	173.8 ± 109.71

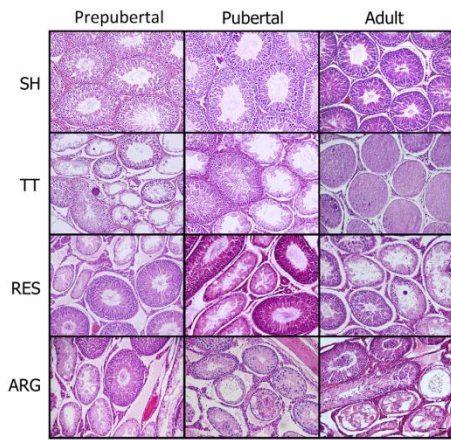
\* Statistically different vs same age SH.

† Statistically different vs same age TT.

‡ Statistically different vs prepubertal TT.

§ Statistically different vs pubertal TT.





**Figure 2.** Photomicrographs show right testis seminiferous tubular damage in SH, TT, RES and ARG prepubertal, pubertal and adult rats. H&E, reduced from  $\times 200$ .

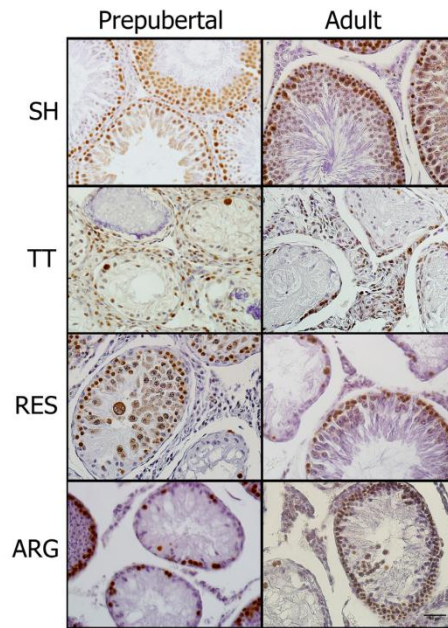
difference was not statistically significant. This indicates that when TT occurs during puberty, the prognosis is better than in earlier or later life.

These results suggest that more effort should be given to decrease the time from the beginning of ischemia to surgical resolution in adults who present with TT. Also, more research about adjuvant therapies that could ameliorate testicular damage would be of special importance for adults.

Spermatozoid parameters were not statistically improved by antioxidant treatment. However, in rats that underwent TT in adulthood each drug aided in the recovery of some viable spermatozoids in the torsed testis, which seems promising for clinical use.

Rats submitted to TT before puberty were most benefited by antioxidants, showing significant protection of tubular structures. In contrast, treatments were of little help in rats operated on during puberty. It is difficult to explain these findings but the pubertal testicle, which is in a changing state, may possibly be more tolerant to disruption while prepubertal testicles would be more susceptible to oxidative stress and, thus, be more protected by antioxidants. Regardless of the mechanisms of how these antioxidants act on TT, they could help preserve testicular function. This may have a more prominent effect in infants.

Although TT did not affect fertility in any rat, antioxidant treatment promoted improved fecundity and potency. Antioxidants also improved some spermatozoid parameters of the contralateral testis.



**Figure 3.** Photomicrographs reveal proliferating cells in tubular and interstitial spaces of right testis seminiferous tubules in SH, TT, RES and ARG prepubertal and adult rats. Proliferation cell nuclear antigen immunostaining, reduced from  $\times 400$ .

Nitric oxide protects the contralateral testis after TT,<sup>22,23</sup> which could explain the positive effects of arginine and resveratrol on the contralateral testis since each enhances nitric oxide bioavailability.<sup>13,24</sup>

**Table 4.** Histological parameters partially or totally protected by antioxidants

	Protection*				
	RES4	RES6	RES9	ARG4	ARG9
Seminiferous tubular diameter	—	—	—	Partial	—
Seminiferous epithelium:					
Ht	—	—	Partial	Partial	Partial
Vv	—	—	—	Partial	—
Av	—	—	—	Partial	—
Tunica propria Av	Total	—	—	Partial	—
Tubular:					
Length	Total	—	—	Partial	—
Lumen Av	Total	—	—	Partial	—
Compartment Av	Partial	—	—	Partial	—
Intertubular compartment Vv	Partial	Partial	—	—	—
Blood vessel Vv	Total	—	Partial	Partial	—
Compartment cellular proliferation:					
Tubular	Partial	—	—	Partial	—
Intertubular	—	—	Total	—	Total

\* ARG6 rats were not protected.

A limitation of this study is the anatomy of the rat spermatic cord, which is thinner, longer and fatter than the human spermatic cord. This could minimize the effects of TT but ischemia was visually confirmed in all rats with TT. The suture applied to the testicle could promote testicular injury.<sup>25,26</sup> However, we used a SH group to avoid this bias. We also evaluated all rats at age 14 weeks. Thus, the time between TT and the assessment of its effects differed in each group. This was done intentionally to assess the impact of TT in adulthood when TT occurred at different ages.

## CONCLUSIONS

Age at TT did not influence spermatozoid production or fertility in adulthood. However, testicular morphology was less affected in rats that underwent TT during puberty. Treatment with resveratrol or arginine did not enhance spermatozoid parameters in the torsed testicle but it improved the contralateral testicle and some fertility parameters. Each antioxidant also ameliorated testicular morphology after TT. Prepubertal rats benefited most after each antioxidant treatment.

## REFERENCES

1. Sinha HKim AP and Swerdloff RS: Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; **4**: 38.
2. Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D et al: Adult testicular torsion. *J Urol* 2002; **167**: 2109.
3. Sessions AE, Rabinowitz R, Hulbert WC et al: Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. *J Urol* 2003; **169**: 663.
4. Aktas BK, Bulut S, Baykam MM et al: The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 2010; **26**: 293.
5. Dokmeci D, Kanter M, Inan M et al: Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol* 2007; **81**: 665.
6. Lee JW, Kim JI, Lee YA et al: Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2012; **47**: 736.
7. Barlas M and Hatiboglu C: The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *Int Urol Nephrol* 2002; **34**: 81.
8. Uguralp S, Usta U and Mizrak B: Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr* 2005; **15**: 333.
9. Wang WW, Qiao SY and Li DF: Amino acids and gut function. *Amino Acids* 2009; **37**: 106.
10. Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S et al: Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; **24**: 618.
11. Becker EJ Jr and Turner TT: Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl* 1995; **16**: 342.
12. Uguralp S, Mizrak B and Bay Karabulut A: Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 2005; **15**: 114.
13. Costa WS, Ribeiro MN, Cardoso LE et al: Nutritional supplementation with L-arginine prevents pelvic radiation-induced changes in morphology, density, and regulating factors of blood vessels in the wall of rat bladder. *World J Urol* 2013; **31**: 653.
14. Motrich RD, Ponce AA and Rivero VE: Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertil Steril* 2007; **88**: 452.
15. Seed J, Chapin RE, Clegg ED et al: Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 1996; **10**: 237.
16. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M et al: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; **70**: 219.
17. Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C et al: Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Pressure Res* 2011; **34**: 424.
18. de Souza DB, Silva D, Cortez CM et al: Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl* 2012; **33**: 735.
19. Ariyaratne HB and Chamindrani Mendis-Handagama S: Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 2000; **62**: 680.
20. Silva RC, Costa GM, Andrade LM et al: Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology* 2010; **73**: 157.
21. Ribeiro CT, De Souza DB, Medeiros JR Jr et al: Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. *Acta Cirurg Bras* 2013; **28**: 419.
22. Dokucu AI, Ozturk H, Ozdemir E et al: The protective effects of nitric oxide on the contralateral testis in prepubertal rats with unilateral testicular torsion. *BJU Int* 2000; **85**: 767.
23. Shiraishi K, Yoshida K and Naito K: Activation of endothelial nitric oxide synthase in contralateral testis during unilateral testicular torsion in rats. *Arch Androl* 2003; **49**: 179.
24. Wong RH, Coates AM, Buckley JD et al: Evidence for circulatory benefits of resveratrol in humans. *Ann N Y Acad Sci* 2013; **1290**: 52.
25. Surur I, Demirbag S, Ozturk H et al: Effects of testicular fixation on oxidative stress-related parameters in prepubertal rat testis. *Arch Androl* 2006; **52**: 71.
26. Frank JD and O'Brien M: Fixation of the testis. *BJU Int* 2002; **89**: 331.

## EDITORIAL COMMENT

The authors add to the growing body of literature on the beneficial effects of antioxidants in the setting of testicular torsion/detorsion. Restoring blood flow is associated with the generation of free radicals.

Antioxidants truncate the damaging chain reactions that follow. The current study is the first to investigate antioxidants for prepubertal, pubertal and postpubertal testicular torsion in the rat.

Torsion/detorsion reduced the sperm concentration in all groups but the adult group was the only azoospermic cohort. It is possible that this finding represents the increased vulnerability of the adult testis but also possible that the finding stems from the fact that this group had a shorter interval between torsion and evaluation. Similarly, the noted improvement in tubular structures in the prepubertal group could potentially be related to a longer recovery period. Potency was improved by antioxidant therapy, a finding consistent with the fact that each agent increases nitric oxide, as the authors note. No statistically significant fertility benefit was observed in any group. Fecundity was improved in treated adults. The contralateral testis and not

the twisted testis may be the primary beneficiary of antioxidants. Each antioxidant statistically improved the quantity and quality of spermatozoid from the contralateral but not the ipsilateral testis.

Other potential interventions include cyclooxygenase-2 inhibition,<sup>1</sup> sildenafil<sup>2</sup> and short-term post-conditioning (clamping spermatic vessels for 5-second intervals).<sup>3</sup> Finally, hypothermia has proved to decrease reperfusion associated free radical formation in patients with brain injury.<sup>4</sup> Perhaps we should apply ice before and after testicular detorsion.

**Dan McMahon**

*Akron Children's Hospital  
Northeast Ohio Medical University  
Rootstown, Ohio*

## REFERENCES

- Gürocağ S, Yılmaz A, Alp E et al: Inflammation and oxidative stress in testicular torsion: do they deserve intensive treatment to save both the guilty and innocent testes? *Urology* 2011; **78**: 164.
- Yıldız H, Durmuş AS, Şimşek H et al: Dose-dependent protective effect of sildenafil citrate on testicular injury after torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, suppl., 2012; **44**: 300.
- Özkısacık S, Erdem AO, Durmaz O et al: The long term protective effects of short-interval postconditioning in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2012; **47**: 743.
- Polderman KH: Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: indications and evidence. *Intensive Care Med* 2004; **30**: 556.

## ANEXO - 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/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