**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Rafael Carvalho Mesquita

**ESTUDO DA AÇÃO DA CLORPROMAZINA NA TORÇÃO
TESTICULAR EM RATOS**

**Ribeirão Preto- SP
2016**

Rafael Carvalho Mesquita

**ESTUDO DA AÇÃO DA CLORPROMAZINA NA TORÇÃO
TESTICULAR EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do **Título de Mestre**.

Área de Concentração: Clínica cirúrgica

Orientador: **Prof. Dr. Silvio Tucci Junior**

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mesquita, Rafael Carvalho

Estudo da ação da clorpromazina na torção testicular em ratos, 2016.

91 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
Orientador: Tucci Jr., Silvio.

1.Torção testicular. 2. clorpromazina. 3. isquemia/ reperfusão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafael Carvalho Mesquita

ESTUDO DA AÇÃO DA CLORPROMAZINA NA TORÇÃO TESTICULAR EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Mestre**.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Epígrafe

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*

**Ricardo Reis, in "Odes"
Heterônimo de Fernando Pessoa**

Dedicatória

Dedico Este Trabalho....

A Deus, pelas oportunidades que me dá todos os dias para viver com saúde junto com a minha família e amigos e pela luz nos momentos de dificuldades.

A minha querida esposa Caroline, por todo amor, companheirismo e compreensão sem os quais não seria possível concluir esse trabalho.

Aos meus pais, Benicio e Maria Conceição, pelo exemplo de vida e perseverança que mostram que o caminho que percorri somente foi possível graças a eles.

A minha irmã Denise, pelo amor, amizade e compreensão nos momentos de ausência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Silvio Tucci Junior, meu orientador, mestre e amigo que sempre me apoiou na minha jornada tanto na formação como especialista, quanto na pós graduação. Sempre exemplo pela paciência, respeito e dedicação aos seus trabalhos e pacientes.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli, pessoa a quem devo muito deste trabalho, sempre se mostrou disposto a ajudar, contribuindo em muito com minha formação. Decisivo na elaboração das fotomicrografias e leitura das lâminas.

Aos Professores Antonio Carlos Pereira Martins, Adauto Jose Cologna, Haylton Jorge Suaid, Rodolfo Borges dos Reis e Carlos Augusto Fernandes Molina, pelos ensinamentos e conselhos que formaram minhas bases de Cirurgia e de Urologia.

A Sra. Sandra Lúcia Balero Penharvel Martins pelo apoio no laboratório de Cirurgia experimental na elaboração das lâminas e toda dedicação para que este trabalho fosse possível.

Ao Sr. Daniel Mazzetto, do laboratório de cirurgia experimental, pelo apoio nos experimentos com presteza e disponibilidade.

Ao Sr. Fermino Sanches Lizarte Neto, pela ajuda no uso das ferramentas estatísticas.

A Sra. Juliana Pischiotin da Silva Moraes, secretária da pós graduação, pela ajuda nesta jornada inédita para mim.

A Sra. Tânia Beatriz Chiari, pelo esmero em corrigir e adaptar este trabalho para normas atuais.

Aos animais de laboratório, vítimas solicitadas pela ciência para benefício da humanidade, o meu respeito e eterna gratidão.

E a todos que, de alguma forma não estão relacionados aqui, e que contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Mesquita, Rafael Carvalho. Estudo da ação da clorpromazina na torção testicular em ratos. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Introdução: A torção testicular permanece como uma emergência urológica, despertando grande interesse em fármacos que podem minorar a lesão testicular e suas repercussões na fertilidade e produção hormonal. No entanto, não há fármaco aprovado para uso clínico rotineiro. Uma droga estudada em isquemia celular é a clorpromazina, sendo conhecidos seus efeitos protetores na função e estrutura da membrana celular e mitocondrial. **Objetivos:** Avaliar a diferença na lesão de células germinativas após 1 e 6 horas de torção e a ação da clorpromazina administrada previamente à resolução da torção no testículo isquêmico. **Materiais e Métodos:** 54 ratos Wistar, machos, com peso corporal entre 220 e 260 gramas distribuídos em 5 grupos: *sham*, controle com isquemia de 1 hora(A), controle com isquemia de 6 horas(B), experimental com isquemia de 1 hora(C) e experimental com isquemia de 6 horas(D). Em 48 animais foi realizada torção unilateral do cordão espermático com duas voltas em torno do seu eixo (720 graus), fixando-se o testículo nessa posição, após o que cada subgrupo foi separado em avaliação imediata (orquiectomia bilateral ao final do período de torção = 1) e tardia (orquiectomia bilateral, uma semana após a resolução da torção = 2). O grupo experimental recebeu 3 mg/kg de clorpromazina administrada via endovenosa, 30 minutos antes da resolução da torção. O grupo controle recebeu apenas solução salina a 0,9% por via endovenosa. Outros 6 animais formaram o grupo *sham*, onde foi realizada apenas a manipulação do cordão espermático. Após retiradas as gônadas, foram preparadas para análise histológica pela microscopia de luz e imunohistoquímica. Um pequeno fragmento de cada testículo foi separado para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (MET). **Resultados:** Na análise por microscopia de luz foram notadas alterações devido à isquemia como, necrose de coagulação e edema intersticial, principalmente nos grupos com isquemia mais prolongada (6h – B e D). Na avaliação por imunohistoquímica, houve maior expressão da caspase-3 nas células e túbulos dos testículos com 6 horas de isquemia, quando comparados com o grupo *sham*. No entanto, a expressão de bcl-2 não foi expressiva em nenhum grupo. Os grupos B e D também demonstraram alterações mais expressivas na análise por MET. Em nenhuma das avaliações foi observado superioridade do grupo da clorpromazina em relação ao grupo controle. **Conclusão:** As lesões celulares intratubulares induzidas pela isquemia e reperfusão testicular foram semelhantes após 1 e 6 horas, as diferenças foram relacionadas à sua maior intensidade no grupo com 6 horas e a clorpromazina não foi efetiva na prevenção da lesão por reperfusão.

Palavras-Chave: Torção testicular, Clorpromazina, Isquemia/ reperfusão.

ABSTRACT

Mesquita, Rafael Carvalho. Role of chlorpromazine in a model of testicular torsion. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Introduction: Testicular torsion remains as a urology emergency arousing interest about medicine which can reduce testicular injury and its impact on fertility and hormone production. However, there is no drug approved for routine clinical use. A drug studied in cell ischemia is chlorpromazine, being known its protective effects on the function and structure of cellular membrane and mitochondrial. **Objective:** To evaluate the difference in lesion of germ cells after 1 and 6 hours and the action of chlorpromazine administered before the resolution of ischemic testicle due torsion. **Materials and methods:** 54 male Wistar rats weighing between 220 to 260 grams divided into five groups: sham, control with one hour of ischemia (A) control with six hours of ischemia (B) experimental with one hour of ischemia (C) and experimental six hours of ischemia (D). In 48 animals was performed unilateral torsion of the spermatic cord with two laps around its axis (720 degrees), keeping the testicle in this position. After that, each subgroup was divided into immediate evaluation (bilateral orchiectomy at end of the torsion period = 1) or later (bilateral orchiectomy after one week of torsion resolution = 2). The experimental group received 3 mg / kg chlorpromazine administered intravenously 30 minutes before the resolution of torsion. The control group received only saline 0.9% intravenously. Other 6 animals were in the sham group, which was held just handling the spermatic cord. After withdrawal, the gonads were prepared for histological analysis by light microscopy and immunohistochemistry. A small piece of each testis was separated for evaluation by electron microscopy. **Results:** In analysis by light microscopy, ischemic changes were rated as coagulative necrosis and interstitial edema mainly in groups with prolonged ischemia (6h - B and D). When analyzed by immunohistochemistry, there was greater expression of caspase-3 in cells and tubules of the testes with 6 hour of ischemia compared to the sham group. However, bcl-2 expression was not impressive in either group. B and D groups also showed more significant changes in the analysis by electron microscopy. None of the ratings has been shown superiority of chlorpromazine group over the control group. **Conclusion:** The germ cell damage induced by ischemia and reperfusion was similar after 1 and 6 hours, the differences were related to its greatest intensity in the group with 6 hours and chlorpromazine was not effective in preventing reperfusion injury.

Keywords: Testicular torsion, Chlorpromazine, Ischemia/reperfusion.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	ADENOSINA MONOFOSFATO
ATP	ADENOSINA TRIFOSFATO
BCL-2	B-CELL LYMPHOMA/LEUKEMIA 2
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO
FMRP-USP	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
IPDE5	INIBIDORES DA FOSFODIESTARASE TIPO 5
MDA	MALONDIALDEÍDO
RLO	RADICAIS LIVRES DERIVADOS DO OXIGÊNIO
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEÍCO

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das alterações histológicas nas células germinativas e região intersticial dos túbulos seminíferos - GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL	50
------------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Demonstração esquemática dos grupos.....	35
Gráfico 2 -	Comparação da expressão protéica de CASPASE 3 nos túbulos seminíferos entre todos os subgrupos estudados (One Way ANOVA, pós-teste de comparação múltipla de Dunn's: SxB1; SxB2; SxD1 e SxD2 (*); A1xB1; A1xB2; A1xD1(○); B1xC1 (◇);C1xD1 (●).....	55
Gráfico 3 -	Comparação da expressão protéica de CASPASE 3 nas células dos túbulos seminíferos entre todos os subgrupos estudados (One Way ANOVA, pós-teste de comparação múltipla de Dunn's: SxB1; SxB2; SxD1 e SxD2 (*); A1xB1; A1xD1(○); B1xC1 (◇);C1xD1.....	56
Gráfico 4 -	Comparação da expressão protéica de CASPASE 3 nas células dos túbulos seminíferos entre os subgrupos B2 e D2(One Way ANOVA, p= 1.667, pós teste de comparação múltipla de Dunn's).....	57
Gráfico 5 -	Comparação da expressão protéica de BCL2 nas células dos túbulos seminíferos entre todos os subgrupos estudados (One Way ANOVA, pós-teste de comparação múltipla de Dunn's: SxB1; SxC2 e SxD1(*)......	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Dissecção do testículo direito.....	36
Figura 2 -	Torção de 720 graus do cordão espermático a direita.....	37
Figura 3 -	Aspecto da perfusão testicular após a torção.....	37
Figura 4 -	Fixação do testículo.....	38
Figura 5 -	Fotomicrografia de animal do grupo <i>sham</i> mostrando padrão morfológico normal dos túbulos seminíferos (TS) e do espaço intersticial (setas). Tricrômico de Masson: 100x.....	41
Figura 6 -	Fotomicrografia de animal do grupo <i>sham</i> mostrando detalhe de um túbulo seminífero em corte transversal onde são identificadas algumas das suas células germinativas: espermatogônias basais (Sg); grande espermatócito (Sp) e espermatídes (St), envolvidas pela túnica própria (seta). Lúmen contendo espermatozóides (Lu) e espaço intersticial (Ei) contendo um vaso sanguíneo (cabeça de seta). Tricrômico de Masson: 400x.....	41
Figura 7 -	Fotomicrografia com visão geral dos túbulos seminíferos testiculares (animal 5 - subgrupo A2) escolhidos nas áreas de “ <i>hot spots</i> ” para a contagem dos túbulos seminíferos positivos (*) ou negativos para expressão de CASPASE 3. Aumento: 50x.....	42
Figura 8 -	Fotomicrografia de túbulo seminífero testicular (animal 6 - subgrupo B1) na área de “ <i>hot spot</i> ” para a contagem das células positivas e negativas à CASPASE 3. Espaço intertubular (EI); Lúmen (L). Aumento: 400x.....	43
Figura 9 -	Eletromicrografia da porção basal de um túbulo seminífero (animal do grupo <i>sham</i>) onde é observado uma célula de Sertoli (Se), uma espermatogônia (Sg), um espermatócito com seu grande núcleo (Sp), assim como uma espermatíde primária (St). Célula mióide (seta). 4000x.....	46
Figura 10 -	Eletromicrografia da porção central de um túbulo seminífero (animal do grupo <i>sham</i>) mostrando algumas espermatídes (St). Heterocromatina (seta). 4000x.....	46

Figura 11 -	Fotomicrografia do aspecto geral dos túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo A1 mostrando leve edema intersticial (E), um túbulo seminífero com desprendimento parcial das células germinativas (seta) e algumas células descamadas no lúmen de um TS (cabeça de seta). Vaso sanguíneo (V). Tricrômico de Masson: 100x.....	51
Figura 12 -	Fotomicrografia com aspecto geral dos túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo C1. Vaso sanguíneo com presença de neutrófilos intraluminais (cabeça de seta). Edema intersticial (E). Giemsa, 100x.....	51
Figura 13 -	Fotomicrografia do aspecto geral dos túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo A2 com pequeno foco hemorrágico (setas) e edema moderado intersticial (E). Notar dois vasos sanguíneos contendo neutrófilos intraluminais (cabeça de seta). Giemsa: 100x.....	52
Figura 14 -	Fotomicrografia de animal do subgrupo B1 mostrando alguns túbulos seminíferos (TS) com desprendimento das células germinativas (*) e a presença de células descamadas no lúmen de um túbulo seminífero (seta espessa). Edema (E). Tricrômico de Masson: 100x. Detalhe acima e à direita de parte de um vaso sanguíneo (V) com presença de neutrófilos intraluminais em azul entre as hemácias (setas delgadas). Giemsa:400x.....	52
Figura 15 -	Fotomicrografia de alguns túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo B1 com grande foco hemorrágico (setas espessas) no espaço intersticial. Notar pequeno desprendimento de células germinativas (setas delgadas), Edema (E). Tricrômico de Masson: 100x.....	53
Figura 16 -	Fotomicrografia de túbulos seminíferos (TS) de um animal do subgrupo B2 mostrando congestão vascular (setas delgadas) e vários túbulos seminíferos com células necróticas em degeneração (cabeça de seta). Edema (E). Tricrômico de Masson: 100x.....	53
Figura 17 -	Fotomicrografia de animal do subgrupo D2 onde pode ser observado grave edema (E) entre os túbulos seminíferos (TS). Tricrômico de Masson: 100x. Acima e à direita, detalhe mostrando parte de dois TS, um com desprendimento das células germinativas (*) e outro com a presença de grande quantidade de células descamadas no seu lúmen (De). Entre eles um vaso sanguíneo contendo neutrófilos intraluminais (setas) e pequeno infiltrado inflamatório intersticial (cabeça de seta). Giemsa: 400x.....	54

Figura 18 -	Fotomicrografia de animal do subgrupo B2 mostrando grande foco hemorrágico intersticial (Fh) e em alguns túbulos seminíferos desprendimento das células germinativas (setas delgadas). No detalhe acima e à direita, parte de um túbulo seminífero com seu lúmen (Lu) e vários neutrófilos aderidos às células adluminais (setas espessas). Giemsa: 100X; 400x.....	54
Figura 19 -	Fotomicrografia com visão geral dos túbulos seminíferos em corte transversal de animal do grupo experimental – subgrupo D1 mostrando contagem do número total de túbulos (asterisco amarelo) e marcação positiva à CASPASE 3 (setas) em alguns túbulos seminíferos. Espaço intertubular (EI). Aumento: 50x.....	58
Figura 20 -	Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo A1 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) com marcação nuclear nas células de um túbulo seminífero em corte transversal. Lúmen (L). Aumento: 400x.....	58
Figura 21 -	Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo A2 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) na região basal e principalmente no lúmen (células descamadas) de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.....	59
Figura 22 -	Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo B1 mostrando alta expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente na região central e apical de um túbulo seminífero em corte transversal. Lúmen (L). Aumento: 400x...	59
Figura 23 -	Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo B2 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente nas regiões central e apical (setas) de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.....	60
Figura 24 -	Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo C1 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) com pouca marcação basal nas células de um túbulo seminífero em corte transversal. Lúmen (L). Aumento: 400x.....	60
Figura 25 -	Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo C2 com expressão de CASPASE 3 (setas) na região basal de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.....	61
Figura 26 -	Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo D1 mostrando alta expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente na região central de túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.....	61
Figura 27 -	Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo D2 com alta expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente nas regiões central e apical (setas) de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.....	62

Figura 28 -	Fotomicrografia com visão geral dos túbulos seminíferos em corte transversal de animal do grupo controle – subgrupo A1, negativo à expressão de BCL2. Espaço intertubular (EI); Túbulo seminífero (TS). Aumento: 50x.....	63
Figura 29 -	Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo D2 com baixa expressão de BCL2 (setas) nos túbulos seminíferos em cortes transversais. Aumento: 400x.....	63
Figura 30 -	Eletromicrografia da porção basal de um túbulo seminífero (animal do subgrupo B2) mostrando o núcleo de uma célula de Sertoli (Se) e seu citoplasma com a presença de um grande número de vacúolos citoplasmáticos (*). Gota lipídica (Li); lâmina basal (setas); mitocôndrias (m); núcleo de uma espermatogônia (Sg). 6700x.....	64
Figura 31 -	Eletromicrografia da porção basal de um túbulo seminífero (animal do subgrupo B2) onde pode ser observado grandes vacúolos citoplasmáticos (*) em duas espermatogônias (Sg). Túnica própria do túbulo seminífero (seta); núcleo de um espermátócito (Sp). 4000x.....	65
Figura 32 -	Eletromicrografia mostrando a presença de vacúolos (*) no citoplasma de espermátides (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo D1). Observar complexo mitocondrial formado durante a espermiogênese (seta delgada) e um grânulo acrossômico no polo superior do núcleo (seta espessa). 6700x.....	65
Figura 33 -	Eletromicrografia mostrando aumento dos espaços intercelulares (setas) entre espermátides (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo B1). Observar eucromatina no interior do grande núcleo esférico de uma espermátide precoce. Complexo mitocondrial formado durante a espermiogênese (seta mais espessa). 6700x.....	66
Figura 34 -	Eletromicrografia mostrando espaços intercelulares (ei) e vacúolos citoplasmáticos (*) em espermátides precoces (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo D2). Observar grânulos acrossômicos (setas delgadas); aparelho de Golgi (g) e lisossomo (seta espessa). O flagelo (f) na região inferior direita da imagem pertence a uma espermátide alongada. 8000x.....	66
Figura 35 -	Eletromicrografia de detalhe da porção apical do epitélio germinativo testicular de um animal do subgrupo B2 com a presença de um grande vacúolo no interior de uma espermátide alongada (*). Várias espermátides alongadas (St) com a presença de flagelos (setas espessas) e axonemas envolvidos por uma bainha de mitocôndrias (m). Grânulos de glicogênio (setas delgadas). 4000x.....	67

- Figura 36 - Eletromicrografia com detalhe do citoplasma de algumas espermatídes alongadas (St) na porção apical do epitélio germinativo testicular de um animal do subgrupo D2 mostrando vacúolos (*) e aumento dos espaços intercelulares (ei). Notar a presença de alguns axonemas dos espermatozóides envolvidos por uma bainha de mitocôndrias (setas delgadas). Aparelho de Golgi (g); grânulos de glicogênio (setas espessas). 8000x..... 67
- Figura 37 - Eletromicrografia com detalhe da porção apical de algumas espermatídes alongadas em animal do subgrupo B2, mostrando aumento da descamação do citoplasma destas células (setas) próxima ao lúmen (Lu), além de alguns vacúolos citoplasmáticos (*). Aparelho de Golgi (g). Aumento: 8000x..... 68
- Figura 38 - Eletromicrografia com espaços intercelulares (ei) e vacúolos citoplasmáticos (*) em espermatídes precoces (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo A2). Observar no citoplasma das espermatídes: complexo mitocondrial (seta espessa) na célula à esquerda; pequenos grânulos pró- acrossômicos (estrela) junto a um aparelho de Golgi; aparelho de Golgi apresentando vesículas acrossômicas (g); cisternas de um aparelho de Golgi sem secreção (cabeça de seta); grânulo acrossômico próximo ao núcleo (seta delgada) à direita. 8000x..... 69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Procedimentos gerais	35
4.2 Avaliação do testículo	39
4.2.1 Análise Histológica.....	39
4.2.2 Análise Imunohistoquímica das proteínas CASPASE 3 E BCL2	42
4.2.3 Análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	44
4.2.4 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	49
5.1 Análise Histológica	49
5.2 Imunohistoquímica	55
5.2.1 Análise imunohistoquímica de CASPASE 3	55
5.3 Análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	64
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICES	84
Apêndice A - Tabela 2.....	84
Apêndice B - Tabela 3.....	85
Apêndice C - Tabela 4	86
Apêndice D - Tabela 5	87

Apêndice E - Tabela 6.....	88
Apêndice F - Tabela 7.....	89

ANEXOS 91

ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Experimentação em Animal	91
--	----

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

Escroto agudo é a denominação do quadro clínico cujos sinais e sintomas decorrem de processo inflamatório localizado na bolsa testicular. Assim, é frequente o paciente apresentar dor local de forte intensidade e início geralmente súbito, acompanhada de edema da pele e/ou aumento do volume testicular e hiperemia local. A principal causa deste quadro é a torção testicular, ocorrendo em 1 a cada 4000 homens abaixo dos 25 anos¹. Outras causas menos importantes para o paciente são as orquiepididimites e a torção dos apêndices testicular e epididimário.

Esse quadro, mais frequente em crianças e adolescentes e mais raramente observado em adultos jovens, apresenta-se como situação emergencial que necessita avaliação clínica rápida, com potencial de exploração cirúrgica imediata para preservar a função do testículo nos casos de torção testicular. A torção do cordão espermático é resultado da inserção anômala da túnica vaginal ao redor da gônada, permitindo ampla mobilidade do testículo. Esta anomalia do implante da túnica vaginal costuma ser bilateral.

Mais comumente, o testículo roda entre 3/4 de volta a 2 voltas completas (270 a 720 graus) em torno do eixo vascular, com obstrução do suprimento sanguíneo. A alteração hemodinâmica inicial consiste na diminuição do retorno venoso e edema, seguida da oclusão arterial e consequente infarto hemorrágico do testículo. Redução da fertilidade e produção hormonal alterada são consequências do dano testicular causado pela torção, seguido da destorção, com aumento significativo dos radicais livres derivados do oxigênio (RLO), resultando em dano testicular adicional².

Excluindo a exploração cirúrgica, ainda não existem dados de exame físico ou exame complementar que forneçam diagnóstico definitivo de torção testicular com total certeza, incluindo ultrassonografia com efeito Doppler. No entanto, informações obtidas do exame físico como posição anteriorizada do epidídimo e testículo horizontalizado sugerem o diagnóstico de torção testicular.

Como a intensidade da torção é variável, a exploração cirúrgica realizada até 6 horas após o início dos sintomas permite quase 100% de probabilidade de salvar o testículo, caindo para 70% entre 6 e 12 horas e 20% entre

12 e 24 horas. Na literatura, ainda há controvérsia se a manutenção da gônada isquêmica pode expor o paciente à autoimunização potencial e consequente lesão do testículo contralateral e comprometimento da fertilidade³. No atendimento mais tardio o infarto hemorrágico leva à perda do órgão⁴⁻⁷.

A preservação do testículo torcido é geralmente feita quando o paciente é avaliado e operado dentro das primeiras 6 horas do início do quadro clínico. Igualmente, essa é a conduta em pacientes onde são estimados tempos menores de torção. A não indicação de orquiectomia decorre da avaliação do aspecto da perfusão da gônada após a destorção. Adicionalmente, alguns cirurgiões realizam pequena incisão na albugínea para melhor observação da coloração sanguínea arterial.

O desenvolvimento de modelo experimental de torção testicular em ratos permitiu a realização de diversos estudos objetivando melhor conhecimento da lesão da gônada e a possibilidade de proteção funcional da mesma com diferentes drogas. Basicamente, ocorre no testículo a situação de isquemia e reperfusão do parênquima quando o paciente é operado e o testículo é preservado.

Isquemia e reperfusão são situações diferentes, onde cada uma tem seu papel importante na lesão tecidual. Durante a isquemia ocorre hipóxia ou anóxia, cessando a fosforilação oxidativa. Secundariamente, as reservas de adenosina trifosfato (ATP) são rapidamente consumidas e as funções celulares dependentes de energia são interrompidas.

A reperfusão muitas vezes pode acelerar os danos causados durante a fase de isquemia, expondo a célula a ambiente desfavorável à recuperação das funções mitocondrial e celular através da alteração do metabolismo dos fosfolípides da membrana, permitindo entrada de cálcio no interior da mitocôndria. Durante a isquemia o ATP é degradado em adenosina monofosfato (AMP) que, posteriormente, é catabolizado em hipoxantina. A entrada de cálcio ativa proteases citosólicas a produzir xantina oxidase. Durante a reperfusão, a hipoxantina é rapidamente oxidada a xantina com formação de radicais livres oxidrila, superóxidos e peróxido de hidrogênio. Este último reage com o ferro livre e forma o radical livre hidroxil, altamente reativo, aumentando a vulnerabilidade das membranas celulares e subcelulares a lesões por peroxidação lipídica. Os danos às

membranas subcelulares afetam profundamente a capacidade de restauração da homeostase celular^{8,9}.

O tratamento efetivo após a destorção testicular poderia proteger contra os efeitos deletérios da lesão de isquemia – reperfusão. Neste contexto, muitos agentes farmacológicos vêm sendo estudados em modelos animais tais como iPDE5, vitaminas, selênio, hormônios e extratos de plantas².

Uma droga já estudada em isquemia celular é a clorpromazina, sendo conhecidos alguns dos seus efeitos na função e estrutura da membrana celular e mitocondrial⁶. Vários estudos mostram a ação desta droga na recuperação da função mitocondrial no fígado⁹, medula espinhal¹⁰ e no rim¹¹. Alguns aspectos dos efeitos protetores no fígado e em outros tecidos incluem a estabilização da membrana celular, redução do sódio intracelular e redução da formação de radicais livres de oxigênio^{4,5,12,13}.

Nos estudos experimentais envolvendo a torção testicular várias metodologias podem ser utilizadas na avaliação dos eventos celulares durante o processo isquemia – reperfusão como microscopia óptica e eletrônica, dosagem de marcadores de lesão celular, imunohistoquímica e várias outras.

A microscopia óptica e a eletrônica permitem estudar detalhes e, importante, estabelecer graduação de intensidade das lesões o que permite a correlação com a viabilidade, ou não, do órgão.

Utilizando a imunohistoquímica, a escolha da CASPASE 3 como sinalizadora do mecanismo apoptótico para nosso estudo ocorreu pelo fato de ser uma caspase efetora, portanto, via comum de morte celular pelas suas duas vias (intrínseca e extrínseca) e dessa forma, a mais avaliada nos estudos envolvendo o mecanismo de apoptose¹⁴.

A família de proteínas BCL2 desempenha um papel crucial na regulação dos sinais intracelulares de transdução apoptótica, sendo a maior família de proteínas descritas. Esta família inclui tanto proteínas apoptóticas quanto anti-apoptóticas. O maior membro anti-apoptótico (BCL2) está localizado na membrana mitocondrial externa, no retículo endoplasmático e na membrana nuclear, sendo, portanto, a proteína anti-apoptótica mais estudada nos diversos tecidos¹⁵.

Pelo exposto, nota-se que a torção do testículo é, ainda, situação clínica que demanda estudos objetivando a proteção das gônadas. Neste sentido, foi

elaborado o presente trabalho experimental em ratos visando analisar aspectos da lesão das células tubulares na isquemia-reperfusão e a ação da clorpromazina na torção testicular. .

2. Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A torção testicular tem potencial de promover atrofia ou perda da gônada ou, então, induzir lesão testicular contralateral auto-imune. Embora seja possível a preservação do testículo quando a cirurgia é realizada dentro das primeiras 6 horas do início do quadro clínico, o processo de isquemia-reperfusão irá ocorrer. Assim, consideramos ser interessante estudar a variação das lesões celulares intra-tubulares nesse período

Outro ponto de interesse é o de avaliar se a utilização de medicamento endovenoso, administrado imediatamente antes do tratamento cirúrgico, poderia atuar na prevenção ou redução da lesão celular secundária à isquemia-reperfusão.

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

Utilizando modelo de torção testicular unilateral em ratos, o estudo tem o objetivo de responder às seguintes perguntas:

- Qual a diferença na lesão das células germinativas após 1 e 6 horas de torção?
- A administração endovenosa de clorpromazina previamente à resolução da torção é capaz de fornecer proteção ao parênquima testicular?

4. Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em 27 de junho de 2011 sob o número 053/2011.

O estudo foi conduzido em 54 ratos machos (*Rattus norvegicus*, ordem *Rodentia*, família *Muridae*, variedade *Wistar*) adquiridos do Serviço de Biotério da FMRP-USP e com peso corporal entre 220 a 260 gramas. Os animais foram abrigados em salas com controle de luz e temperatura e livre acesso à água e ração.

Os animais foram distribuídos em 5 grupos objetivando comparar as alterações histológicas com 1 e 6 horas de torção, avaliando-se a gônada ao término desse período e após 7 dias da destorção, com ou sem a administração intra-venosa de clorpromazina.

Grupos:

- **Grupo *sham*** 6 animais

Controle 24 animais, sendo:

- **Grupo A – torção com 01 hora de duração**
 - Subgrupo A1 – avaliação imediata (n=6)
 - Subgrupo A2 – avaliação após 01 semana (n=6)
- **Grupo B – torção com 06 horas de duração**
 - Subgrupo B1 – avaliação imediata (n=6)
 - Subgrupo B2 – avaliação após 01 semana (n=6)

Experimental – 24 animais:

(estes animais receberam 3 mg/kg de clorpromazina EV 30 minutos antes da resolução da torção).

- **Grupo C – torção com 01 hora de duração**
 - Subgrupo C1 – avaliação imediata (n=6)
 - Subgrupo C2 – avaliação após 01 semana (n=6)
- **Grupo D – torção com 06 horas de duração**
 - Subgrupo D1 – avaliação imediata (n=6)
 - Subgrupo D2 – avaliação após 01 semana (n=6)

Gráfico 1 - Demonstração esquemática dos grupos

4.1 Procedimentos gerais

Em 48 animais foi realizada torção unilateral do cordão espermático direito com duas voltas em torno do seu eixo (720 graus), fixando-se o testículo nessa posição. Após isso, foram separados em subgrupos a depender do tempo de observação que foi de 1 hora e de 6 horas de torção. Cada subgrupo foi ainda separado em: avaliação imediata (orquiectomia bilateral ao final do período de torção); ou tardia (orquiectomia bilateral uma semana após a resolução da torção).

O grupo experimental recebeu 3 mg/kg de clorpromazina administrada via endovenosa, 30 minutos antes da resolução da torção, ou da orquiectomia nos casos de avaliação imediata. O grupo controle recebeu apenas

solução salina a 0,9% por via endovenosa. No grupo *sham* (n=6), foi realizada manipulação do cordão espermático direito com orquiectomia bilateral após 1 hora de procedimento.

As cirurgias foram realizadas sob anestesia geral induzida pela associação de Ketamina® e Xilasina®, administradas por via intramuscular.

A cirurgia consistiu na dissecação do testículo da bolsa e rotação do cordão espermático com duas voltas em torno do seu eixo, fixando-se o cordão para mantê-lo torcido. As imagens abaixo ilustram a sequência cirúrgica descrita.

Figura 1 - Dissecação do testículo direito

Figura 2 - Torção de 720 graus do cordão espermático

Figura 3 - Aspecto da perfusão testicular após a torção

Figura 4 - Fixação do testículo

Nos animais dos grupos de avaliação imediata foi realizada orquiectomia bilateral 1 hora após o início da torção do cordão espermático, sendo que neste caso os animais foram mantidos anestesiados.

Nos animais distribuídos nos grupos de avaliação tardia a torção foi desfeita 1 ou 6 horas após sua indução, sendo o testículo colocado na bolsa em sua posição normal, fixando-se o cordão para prevenir torção acidental. Banamine® na dosagem de 2,5 mg/kg foi administrado via intraperitoneal, antes do fechamento da cavidade abdominal. Nestes animais a orquiectomia bilateral foi realizada após uma semana, sob nova indução anestésica.

Ao final do procedimento os animais foram mortos por hiperdosagem anestésica.

4.2 Avaliação do testículo

4.2.1 Análise Histológica

As amostras dos cortes transversais do tecido testicular direito dos animais de todos os grupos foram imersas na solução fixadora de paraformaldeído a 4%, durante 24 horas e posteriormente lavadas com solução de etanol a 70%, para auxiliar na remoção do excesso de líquido fixador. Em seguida, as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Histologia do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e submetidas às seguintes etapas:

- Desidratação: passagem das amostras em banhos de álcool etílico de concentrações crescentes de 70%, 80%, 90%, 95%I, 95%II, 100%I e 100%II (absoluto), durante o período de uma hora cada;
- Diafanização ou clareamento: banhos em álcool-xilol (20 minutos), xilol I (20 minutos) e xilol II (20 minutos) para tornar as peças translúcidas;
- Embebição em parafina: imersão em três cubas contendo parafina fundida na estufa a 60°C, por 30 minutos em cada uma das cubas;
- Inclusão em parafina: as amostras foram colocadas em recipientes contendo parafina fundida (parafina III) e orientadas na posição adequada para a obtenção dos cortes. Posteriormente, os recipientes foram deixados à temperatura ambiente para solidificação durante 24 horas.

Após a inclusão do material, cortes histológicos de 5µm de espessura foram realizados, utilizando-se um micrótomo rotativo Reichert Jung 2040 (Reichert Microscope Services, Depew, Nova Iorque, EUA) e os mesmos recolhidos em grupos de dois, em lâminas previamente identificadas. As secções foram coradas pelas técnicas de *Tricrômico de Masson* e *Giemsa* para posterior avaliação histológica do testículo direito nos animais do grupo *sham* e nos animais dos grupos controle e experimental.

As lesões histológicas foram avaliadas nos compartimentos tubulares e intertubular, utilizando método semi-quantitativo por Minutoli L, et al.¹⁶ para avaliação das alterações lobular e/ou extravasamento intersticial. As alterações tubulares focais ou difusas incluíram:

- a) desprendimento das células germinativas ou perda no compartimento tubular;
- b) necrose de coagulação e;
- c) presença de células descamadas no lúmen dos túbulos seminíferos.

Quanto às alterações intersticiais, foram avaliadas:

- a) edema intersticial;
- b) congestão vascular;
- c) hemorragia intersticial;
- d) neutrófilos no lúmen dos vasos sanguíneos e/ou;
- e) infiltrado inflamatório tecidual.

A avaliação dos itens d e e foi auxiliada pela utilização da técnica de Giemsa, para visualização dos leucócitos.

As alterações histológicas observadas tanto nas células germinativas dos túbulos seminíferos quanto no espaço intersticial foram classificadas como:

- a) 0 (ausentes);
- b) 1 (leves);
- c) 2 (moderadas) e
- d) 3 (graves)¹⁶.

Na análise e documentação fotográfica dos resultados obtidos foi utilizado microscópio Zeiss®, modelo Axioskop 2 plus. As imagens dos campos utilizados para a avaliação histológica foram registradas pela câmera digital AxioCamHrc® acoplada ao microscópio, sendo posteriormente analisadas pelo programa Axio Vision 4.6, utilizando aumentos de 100x e 400x.

Histologicamente, os túbulos seminíferos (Figuras 5 e 6) são envolvidos por uma túnica própria (Figura 6) constituída por uma camada de células mióides e pela membrana basal. O epitélio seminífero apresenta as células da linhagem espermatogênica (células germinativas) e as células de Sertoli. As células germinativas encontram-se em vários estágios da espermatogênese. Assim, as células mais próximas da membrana basal são as espermatogônias (Figura 6), células com núcleo esférico que são seguidas pelos espermatócitos primários e secundários (Figura 6). Estes se dividem originando as espermátides caracterizadas

como precoces e tardias, que não mais se dividem, mas amadurecem a espermatozóides e são liberados no lúmen (Figura 6)¹⁷.

Figura 5 - Fotomicrografia de animal do grupo *sham* mostrando padrão morfológico normal dos túbulos seminíferos (TS) e do espaço intersticial (setas). Tricrômico de Masson: 100x.

Figura 6 - Fotomicrografia de animal do grupo *sham* mostrando detalhe de um túbulo seminífero em corte transversal onde são identificadas algumas das suas células germinativas: espermatogônias basais (Sg); grande espermatócito (Sp) e espermátides (St), envolvidas pela túnica própria (seta). Lúmen contendo espermatozóides (Lu) e espaço intersticial (Ei) contendo um vaso sanguíneo (cabeça de seta). Tricrômico de Masson: 400x.

4.2.2 Análise Imunohistoquímica das proteínas CASPASE 3 E BCL2

Para a análise da expressão protéica foram utilizados seis animais do grupo *sham* e 24 animais de cada grupo controle e experimental. Para cada animal foram selecionados: (1) dois campos para a contagem do número total de túbulos seminíferos (Figura 7) utilizando-se aumento de 50x; (2) dois campos para a contagem do número total de células de um túbulo seminífero testicular em cada campo selecionado (Figura 8).

Nas duas análises foram escolhidos os campos com túbulos seminíferos contendo maior concentração de células positivas ou marcadas (áreas de “*hot spots*”) para as proteínas relacionadas ao mecanismo de apoptose (CASPASE 3 – pró-apoptótica e BCL2 – anti-apoptótica). Para a primeira avaliação foi contado o número de túbulos seminíferos positivos ou negativos para as proteínas estudadas. Na segunda avaliação, a partir da contagem do número total de células positivas e negativas em cada campo foi calculada a porcentagem de células positivas.

Figura 7 - Fotomicrografia com visão geral dos túbulos seminíferos testiculares (animal 5 - subgrupo A2) escolhidos nas áreas de “*hot spots*” para a contagem dos túbulos seminíferos positivos (*) ou negativos para expressão de CASPASE 3. Aumento: 50x.

Figura 8 - Fotomicrografia de túbulo seminífero testicular (animal 6 - subgrupo B1) na área de “hot spot” para a contagem das células positivas e negativas à CASPASE 3. Espaço intertubular (EI); Lúmen (L). Aumento: 400x.

As amostras foram submetidas à análise imunohistoquímica pelo método de avidina-biotina-peroxidase (*Novostain Super ABC Kit – universal, NCL-ABCu, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, Reino Unido*) – (*Kit mach 4 universal BIOCARE*).

Inicialmente, cortes de 3µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo Reichert Jung 2040 (Reichert Microscope Services, Depew, Nova Iorque, EUA) e montados em lâminas histológicas pré-tratadas com silano (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA*) diluído em acetona. Em seguida foi realizada a desparafinização com xilol e hidratação pela passagem sucessiva por soluções de etanol com concentrações decrescentes de 100 a 50%, terminando em água destilada. Na etapa seguinte, foi realizada a inativação de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (3% v/v), seguida pela recuperação antigênica por calor úmido com uma panela a vapor *Optistream Plus* (*Krups North America Inc., Millville, Nova Jérsei, EUA*) em tampão citrato a 10 mM com pH 6,0 por 35 minutos.

Para bloquear as ligações inespecíficas, as amostras foram imersas em soro normal de cavalo, diluído em uma solução de leite em pó Molico (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) a 1,5% em tampão fosfato a 0,001 M com pH 7,2

(*phosphate buffer solution* – PBS) por quatro horas, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com os anticorpos primários: CASPASE 3 (CP 229-B, *Biocare Medical*) e BCL2 (SC – 509/ mouse monoclonal Santa Cruz), ambos diluídos a 1:300 em solução de PBS em albumina bovina sérica (*bovine serum albumine* – BSA) a 1,5%.

Na sequência, foi realizado o bloqueio da biotina endógena (*Biotin Blocking System, Dako North America Inc., Carpinteria, EUA*) e, assim, os cortes foram incubados com anticorpo secundário do kit *MACH 4 Universal HRP-Polymer (M4BD534, Biocare Medical)* e em seguida, com avidina-biotina-peroxidase do mesmo kit (1/200 em PBS).

As reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina (3, 3' - *Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA*) e os cortes contracolorados com hematoxilina de *Harris*. Entre os passos descritos de incubação do anticorpo primário, bloqueio de biotina endógena, incubação do anticorpo secundário e complexo avidina-biotina-peroxidase, foram realizados quatro banhos com solução de *Tween 20 (Acros Organics, Geel, Bélgica)* a 0,3% em tampão Tris a 0,05 M com pH 7,6; seguidos de um banho de PBS por cinco minutos cada.

Por fim, o tecido foi desidratado em etanol, diafanizado com xilol e montado sobre lâminula com líquido *Permount (Fischer Scientific Company LLC, Fair Lawn, Nova Jérsei, EUA)*.

Após o término das reações imunohistoquímicas, as lâminas foram analisadas utilizando o microscópio Zeiss®, modelo *Axioskop 2 plus*, em aumento de 50 e 400 vezes. As imagens dos campos utilizados para quantificação das proteínas estudadas foram registradas pela câmara (*AxioCamHrc ®*) acoplada ao microscópio, sendo posteriormente arquivadas pelo programa *Axio Vision 4.6®*.

4.2.3 Análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a avaliação ultraestrutural, foram utilizadas amostras do tecido testicular direito de dois animais em cada subgrupo. As amostras foram coletadas em fragmentos de aproximadamente 1mm² e fixadas por imersão em solução de

glutaraldeído a 2,5% durante quatro horas a 4⁰C e lavadas em solução tampão fosfato a 0,1M por 24 horas. Em seguida, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato a 0,2 M por quatro horas a 4⁰C e lavadas com tampão fosfato a 0,1M por 24 horas. Na sequência, a desidratação foi realizada usando uma série crescente de acetona (30 a 100%). As amostras foram então embebidas em resina epóxi para a inclusão e, após a polimerização, os blocos foram cortados em secções de 0.5µm para a escolha das melhores áreas. Destas, cortes de 600 Å de espessura foram realizados em navalha de diamante. Os cortes foram corados em acetato de uranila e transferidos para grades de cobre. Um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM208 (Royal Philips Electronics, Amsterdã, Holanda) pertencente ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Agentes Patogênicos, da FMRP – USP, foi utilizado para a análise do tecido testicular.

Algumas características ultraestruturais normais do epitélio seminífero dos animais do grupo *sham* foram descritas a partir das figuras 9 e 10. Uma túnica própria constituída por tecido conjuntivo, uma camada de células mióides (Figura 9) e uma lâmina basal, circunda os túbulos seminíferos. O epitélio seminífero corresponde a um epitélio estratificado complexo formado por duas populações celulares: as células germinativas ou espermatogênicas e as células de Sertoli, não proliferativas.

As espermatogônias (Figura 9) correspondem a uma população de células-tronco espermatogênicas localizadas próximo à lâmina basal do túbulo seminífero com núcleo esférico e relativamente grande. Uma bicamada de células maiores com núcleos esféricos e cromatina granulosa corresponde aos espermatócitos primários (Figura 9). Estes sofrem divisão meiótica e dão origem aos espermatócitos secundários que são menores e rapidamente sofrem uma segunda divisão meiótica originando as espermátides (Figuras 9 e 10). Estas células caracterizadas como jovens e maduras estão no compartimento adluminal com núcleos alongados e associados aos acrossomos. Durante o período de transformação, as espermátides permanecem aderidas às células de Sertoli (Figura 9), células cilíndricas, altas e em menor quantidade que se apoiam na lâmina basal até o lúmen do túbulo seminífero. As espermátides amadurecem a espermatozóides que são liberados no lúmen.

Figura 9 - Eletromicrografia da porção basal de um túbulo seminífero (animal do grupo *sham*) onde é observado uma célula de Sertoli (Se), uma espermatogônia (Sg), um espermatócito com seu grande núcleo (Sp), assim como uma espermátide primária (St). Célula mióide (seta). 4000x.

Figura 10 - Eletromicrografia da porção central de um túbulo seminífero (animal do grupo *sham*) mostrando algumas espermátides (St). Heterocromatina (seta). 4000x.

4.2.4 Análise estatística

Foi realizada a comparação entre os grupos usando *one way* ANOVA com teste de Kruskal Wallis, utilizando o programa GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) considerando p igual ou menor 0,05.

5. Resultados

5 RESULTADOS

Foram utilizados no total 56 ratos devido à morte de 2 animais do grupo B2, que ocorreu após repique anestésico.

5.1 Análise Histológica

As alterações histológicas avaliadas segundo Minutoli et al. (2005)(16) foram observadas nos animais dos subgrupos A1, A2, C1 e C2, mas principalmente nos animais dos subgrupos B1, B2, D1 e D2 (Tabela 1).

Nos animais dos subgrupos A1 e C1 (torção testicular de 1 hora) as alterações histológicas observadas foram semelhantes e pouco intensas, destacando-se edema intersticial leve e necrose de coagulação leve das células germinativas, na maioria dos animais destes subgrupos (Tabela 1 e Figuras 11 e 12).

Nos animais dos subgrupos A2 e C2 (torção testicular de 1 hora e avaliação após uma semana) foram observadas alterações semelhantes, destacando-se a presença de edema moderado na maioria dos animais, neutrófilos intraluminais e, em apenas um animal do subgrupo A2, a presença de foco hemorrágico leve (Tabela 1 e Figura 13).

Após avaliação dos animais dos subgrupos B1 e D1 (torção testicular de 6 horas), as alterações observadas foram semelhantes, destacando-se: presença de edema moderado em todos os animais do subgrupo B1; grande número de túbulos seminíferos com desprendimento moderado de células germinativas na maioria dos animais; necrose de coagulação e reação inflamatória mais evidente, constatada tanto pela presença de neutrófilos intraluminais quanto pela presença de infiltrados inflamatórios leves (Tabela 1 e Figuras 14 e 15).

Tabela 1 - Classificação das alterações histológicas nas células germinativas e região intersticial dos túbulos seminíferos - **GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL**.

SUBGRUPOS	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
CÉLULAS GERMINATIVAS								
a)	0-1-0	0-0-0	2-2-1	2-2-2	1-0-0	0-1-0	1-2-2	2-2-2
Desprendimento das células / perda no compartimento tubular	1-0-1	0-1-0	2-1-2	2-1-3	0-0-1	0-0-0	2-2-2	2-1-2
b) necrose de coagulação	1-1-1	1-1-1	2-2-2	2-3-3	1-1-1	1-1-2	2-2-3	3-3-2
	1-1-1	1-2-1	3-2-3	3-2-3	1-1-1	1-1-1	2-2-2	3-2-3
c) células descamadas no lúmen	0-0-0	1-1-1	1-1-1	1-2-2	0-0-1	1-1-1	1-1-1	2-2-1
	1-0-0	0-1-1	1-1-1	2-1-2	0-0-0	0-0-1	1-0-1	2-2-1
REGIÃO INTERSTICIAL								
a) edema intersticial;	1-1-0	2-2-1	2-2-2	2-3-3	1-0-1	1-2-1	2-2-2	3-2-2
	0-1-1	1-2-2	2-2-2	2-2-3	1-0-1	2-2-1	2-1-2	3-3-2
b) congestão vascular	0-0-0	0-1-0	1-0-0	1-1-1	0-1-0	0-0-1	0-0-1	1-1-0
	1-0-0	1-0-0	0-1-1	1-0-1	0-0-0	0-0-0	1-0-0	1-1-0
c) hemorragia intersticial	0-0-0	0-0-0	0-0-1	1-1-1	0-0-0	0-0-0	1-0-1	1-1-0
	0-0-0	0-1-0	1-1-0	0-0-1	0-0-0	0-0-0	0-0-0	1-1-1
d) neutrófilos no lúmen dos vasos sanguíneos	0-1-0	1-1-0	1-1-1	1-0-1	1-0-0	1-1-1	2-1-1	1-0-1
	1-0-0	1-0-0	2-1-1	1-1-0	0-1-0	0-0-1	1-1-1	0-1-0
e) infiltrado inflamatório	0-0-0	0-1-0	0-1-1	2-1-1	0-0-0	0-0-1	1-1-0	1-1-1
	0-0-0	0-0-0	1-0-1	1-1-1	0-0-0	0-0-0	1-0-0	1-1-1

Para os animais dos subgrupos B2 e D2 (torção testicular de 6 horas e avaliação após uma semana), as alterações foram bem semelhantes. Observou-se a presença de necrose de coagulação grave na maioria dos animais; metade dos animais apresentando edema intersticial grave; presença de células descamadas no lúmen dos túbulos seminíferos de moderada intensidade na maioria dos animais e aumento dos infiltrados inflamatórios (Tabela 1 e Figuras 16 a 18). Na figura 16 observa-se um animal do subgrupo B2 apresentando congestão vascular e, na figura 18 (subgrupo B2), a presença de foco hemorrágico intersticial assim como neutrófilos junto às células adluminais de um túbulo seminífero.

Quando comparados os animais dos subgrupos A1xC1; A2xC2; B1xD1 e B2xD2, poucas diferenças histológicas foram observadas (Tabela 1).

Os animais do grupo *sham* não apresentaram alterações histológicas.

Figura 11 - Fotomicrografia do aspecto geral dos túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo A1 mostrando leve edema intersticial (E), um túbulo seminífero com desprendimento parcial das células germinativas (seta) e algumas células descamadas no lúmen de um TS (cabeça de seta). Vaso sanguíneo (V). Tricrômico de Masson: 100x.

Figura 12 - Fotomicrografia com aspecto geral dos túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo C1. Vaso sanguíneo com presença de neutrófilos intraluminais (cabeça de seta). Edema intersticial (E). Giemsa, 100x.

Figura 13 - Fotomicrografia do aspecto geral dos túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo A2 com pequeno foco hemorrágico (setas) e edema moderado intersticial (E). Notar dois vasos sanguíneos contendo neutrófilos intraluminais (cabeça de seta). Giemsa: 100x.

Figura 14 - Fotomicrografia de animal do subgrupo B1 mostrando alguns túbulos seminíferos (TS) com desprendimento das células germinativas (*) e a presença de células descamadas no lúmen de um túbulo seminífero (seta espessa). Edema (E). Detalhe acima e à direita de parte de um vaso sanguíneo (V) com presença de neutrófilos intraluminais em azul entre as hemácias (setas delgadas). Giemsa: 400x.

Figura 15 - Fotomicrografia de alguns túbulos seminíferos (TS) de animal do subgrupo B1 com grande foco hemorrágico (setas espessas) no espaço intersticial. Notar pequeno desprendimento de células germinativas (setas delgadas), Edema (E). Tricrômico de Masson: 100x.

Figura 16 - Fotomicrografia de túbulos seminíferos (TS) de um animal do subgrupo B2 mostrando congestão vascular (setas delgadas) e vários túbulos seminíferos com células necróticas em degeneração (cabeça de seta). Edema (E). Tricrômico de Masson: 100x.

Figura 17 - Fotomicrografia de animal do subgrupo D2 onde pode ser observado grave edema (E) entre os túbulos seminíferos (TS). Tricrômico de Masson: 100x. Acima e à direita, detalhe mostrando parte de dois TS, um com desprendimento das células germinativas (*) e outro com a presença de grande quantidade de células descamadas no seu lúmen (De). Entre eles um vaso sanguíneo contendo neutrófilos intraluminais (setas) e pequeno infiltrado inflamatório intersticial (cabeça de seta). Giemsa: 400x.

Figura 18 - Fotomicrografia de animal do subgrupo B2 mostrando grande foco hemorrágico intersticial (Fh) e em alguns túbulos seminíferos desprendimento das células germinativas (setas delgadas). No detalhe acima e à direita, parte de um túbulo seminífero com seu lúmen (Lu) e vários neutrófilos aderidos às células adluminais (setas espessas). Giemsa: 100X; 400x.

5.2 Imunohistoquímica

5.2.1 Análise imunohistoquímica de CASPASE 3

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína CASPASE 3 difusa nos túbulos seminíferos testiculares (aumento de 50x), com alguns focos apresentando túbulos seminíferos com maior marcação positiva (maior expressão), principalmente nos animais dos grupos B1 e D1. A marcação positiva à CASPASE 3 foi muito baixa nos animais do grupo sham.

Assim, foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de CASPASE 3 entre os seguintes subgrupos: SxB1 (****); SxB2 (**); SxD1 (***); SxD2 (*); A1xB1 e A1xD1(**); A1xB2(*); B1xC1 (**) e C1xD1 (*) (oneway ANOVA, pós-teste de Dunn's – Gráfico 2 e Tabelas 2 e 3, Apêndices A e B).

Gráfico 2 - Comparação da expressão protéica de CASPASE 3 nos túbulos seminíferos entre todos os subgrupos estudados (One Way ANOVA, pós-teste de comparação múltipla de Dunn's: SxB1; SxB2; SxD1 e SxD2 (*); A1xB1; A1xB2; A1xD1(◊); B1xC1 (◊); C1xD1 (●)).

Em aumento de 400x, quando analisado o número de células positivas e negativas em cada túbulo seminífero, não se identificou a presença de uma padronização na marcação positiva para CASPASE 3 (Figuras 20 a 27). Em

alguns campos analisados, principalmente nos animais dos subgrupos B1 e D1, a marcação positiva foi observada principalmente nas células centrais e apicais dos túbulos seminíferos (Figuras 20, 21, 24 e 25); enquanto em outros túbulos seminíferos a marcação positiva foi observada apenas nas células germinativas ou basais (Figuras 22 e 23). Em alguns túbulos seminíferos também pode ser observado a presença de células positivas adluminais à CASPASE 3 (Figura 20), algumas correspondendo à descamação de células espermatozóides (Figura 21).

Como descrito anteriormente para a expressão de CASPASE 3 nos túbulos seminíferos, a expressão desta proteína nas células dos túbulos seminíferos foi maior nos animais dos subgrupos B1 e D1 (Gráfico 2 e Tabelas 4 e 5, apêndices C e D). Nos demais subgrupos, a expressão de CASPASE 3 foi menor e muito semelhante entre si, com exceção do grupo sham (Gráfico 2), onde a expressão desta proteína foi muito baixa.

As diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os seguintes subgrupos: SxB1 e SxD1 (****); SxB2 e SxD2 (*); A1xB1 e A1xD1(*); B1xC1 (*) e C1xD1 (*) (oneway ANOVA, pós-teste de Dunn's – Gráfico 3 e Tabelas 4 e 5, Apêndices C e D).

Gráfico 3 - Comparação da expressão protéica de CASPASE 3 nas células dos túbulos seminíferos entre todos os subgrupos estudados (One Way ANOVA, pós-teste de comparação múltipla de Dunn's: SxB1; SxB2; SxD1 e SxD2 (*); A1xB1; A1xD1(○); B1xC1 (◇); C1xD1 (●)).

Quando comparada a expressão protéica de CASPASE 3 nas células dos túbulos seminíferos entre os subgrupos B2 e D2 (6 horas de torção, avaliação após uma semana com ou sem tratamento com clorpromazina, respectivamente); não foi observada diferença estatisticamente significativa (One Way Anova - teste de comparação múltipla de Dunn's, $p= 1.667$ – Gráfico 4).

Gráfico 4 - Comparação da expressão protéica de CASPASE 3 nas células dos túbulos seminíferos entre os subgrupos B2 e D2 (One Way ANOVA, $p= 1.667$, pós teste de comparação múltipla de Dunn's).

Figura 19 - Fotomicrografia com visão geral dos túbulos seminíferos em corte transversal de animal do grupo experimental – subgrupo D1 mostrando contagem do número total de túbulos (asterisco amarelo) e marcação positiva à CASPASE 3 (setas) em alguns túbulos seminíferos. Espaço intertubular (EI). Aumento: 50x.

Figura 20 - Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo A1 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) com marcação nuclear nas células de um túbulo seminífero em corte transversal. Lúmen (L). Aumento: 400x.

Figura 21 - Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo A2 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) na região basal e principalmente no lúmen (células descamadas) de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.

Figura 22 - Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo B1 mostrando alta expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente na região central e apical de um túbulo seminífero em corte transversal. Lúmen (L). Aumento: 400x.

Figura 23 - Fotomicrografia de animal do grupo controle subgrupo B2 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente nas regiões central e apical (setas) de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.

Figura 24 - Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo C1 mostrando a expressão de CASPASE 3 (setas) com pouca marcação basal nas células de um túbulo seminífero em corte transversal. Lúmen (L). Aumento: 400x.

Figura 25 - Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo C2 com expressão de CASPASE 3 (setas) na região basal de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.

Figura 26 - Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo D1 mostrando alta expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente na região central de túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.

Figura 27 - Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo D2 com alta expressão de CASPASE 3 (setas) principalmente nas regiões central e apical (setas) de um túbulo seminífero em corte transversal. Aumento: 400x.

Quando analisada a expressão protéica de BCL2 nas células dos túbulos seminíferos, foi observada baixa expressão desta proteína nos animais de todos os subgrupos quando comparada à expressão de CASPASE 3 (Figuras 24 e 25). Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas entre os subgrupos: SxB1 (***), SxC2 (**) e SxD1 (*) (Gráfico 5 e Tabelas 6 e 7, Apêndices E e F).

Gráfico 5 - Comparação da expressão protéica de BCL2 nas células dos túbulos seminíferos entre todos os subgrupos estudados (One Way ANOVA, pós-teste de comparação múltipla de Dunn's: SxB1; SxC2 e SxD1(*)).

Figura 28 - Fotomicrografia com visão geral dos túbulos seminíferos em corte transversal de animal do grupo controle – subgrupo A1, negativo à expressão de BCL2. Espaço intertubular (EI); Túbulo seminífero (TS). Aumento: 50x.

Figura 29 - Fotomicrografia de animal do grupo experimental subgrupo D2 com baixa expressão de BCL2 (setas) nos túbulos seminíferos em cortes transversais. Aumento: 400x.

5.3 Análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Foram observadas diversas alterações ultraestruturais nas células germinativas e no tecido basal após torção testicular, principalmente nos animais dos grupos B e D, e nenhuma nos animais do grupo *sham* (S).

Nos animais do grupo B (subgrupos B1 e B2) e D (subgrupos D1 e D2) foram observadas as seguintes alterações:

1. Presença de grande número de pequenos vacúolos no citoplasma de algumas células de Sertoli (Figura 30);
2. Presença de grandes vacúolos citoplasmáticos em várias espermatogônias (Fig. 31) e espermatídes precoces (Figuras 32 e 33);
3. Aumento dos espaços intercelulares (entre as espermatídes) (Figuras 34 e 35);
4. Presença de vacúolos citoplasmáticos (Figuras 36 a 38) e aumento dos espaços intercelulares (Figura 37) em espermatídes alongadas;
5. Aumento da descamação de espermatídes alongadas no compartimento adluminal dos túbulos seminíferos relacionados à maior presença de citoplasma residual dessas células (Figura 37).

Figura 30 - Eletromicrografia da porção basal de um túbulo seminífero (animal do subgrupo B2) mostrando o núcleo de uma célula de Sertoli (Se) e seu citoplasma com a presença de um grande número de vacúolos citoplasmáticos (*). Gota lipídica (Li); lâmina basal (setas); mitocôndrias (m); núcleo de uma espermatogônia (Sg). 6700x.

Figura 31 - Eletromicrografia da porção basal de um túbulo seminífero (animal do subgrupo B2) onde podem ser observados grandes vacúolos citoplasmáticos (*) em duas espermatogônias (Sg). Túnica própria do túbulo seminífero (seta); núcleo de um espermatócito (Sp). 4000x.

Figura 32 - Eletromicrografia mostrando a presença de vacúolos (*) no citoplasma de espermatídes (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo D1). Observar complexo mitocondrial formado durante a espermiogênese (seta delgada) e um grânulo acrossômico no polo superior do núcleo (seta espessa). 6700x.

Figura 33 - Eletromicrografia mostrando aumento dos espaços intercelulares (setas) entre espermatídes (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo B1). Observar eucromatina no interior do grande núcleo esférico de uma espermatíde precoce. Complexo mitocondrial formado durante a espermiogênese (seta mais espessa). 6700x.

Figura 34 - Eletromicrografia mostrando espaços intercelulares (ei) e vacúolos citoplasmáticos (*) em espermatídes precoces (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo D2). Observar grânulos acrossômicos (setas delgadas); aparelho de Golgi (g) e lisossomo (seta espessa). O flagelo (f) na região inferior direita da imagem pertence a uma espermatíde alongada. 8000x.

Figura 35 - Eletromicrografia de detalhe da porção apical do epitélio germinativo testicular de um animal do subgrupo B2 com a presença de um grande vacúolo no interior de uma espermátide alongada (*). Várias espermátides alongadas (St) com a presença de flagelos (setas espessas) e axonemas envolvidos por uma bainha de mitocôndrias (m). Grânulos de glicogênio (setas delgadas). 4000x.

Figura 36 - Eletromicrografia com detalhe do citoplasma de algumas espermátides alongadas (St) na porção apical do epitélio germinativo testicular de um animal do subgrupo D2 mostrando vacúolos (*) e aumento dos espaços intercelulares (ei). Notar a presença de alguns axonemas dos espermatozóides envolvidos por uma bainha de mitocôndrias (setas delgadas). Aparelho de Golgi (g); grânulos de glicogênio (setas espessas). 8000x.

Figura 37 - Eletromicrografia com detalhe da porção apical de algumas espermatídes alongadas em animal do subgrupo B2, mostrando aumento da descamação do citoplasma destas células (setas) próxima ao lúmen (Lu), além de alguns vacúolos citoplasmáticos (*). Aparelho de Golgi (g). Aumento: 8000x.

Nos animais dos subgrupos A1, A2, C1 e C2 algumas das alterações anteriormente descritas também foram observadas, mas em menor número e proporção.

A figura 38 mostra a presença de espaços intercelulares e de vacúolos citoplasmáticos no interior de algumas espermatídes precoces, observados em alguns animais dos subgrupos A e C. Nesta eletromicrografia também podem ser observadas algumas das fases da espermiogênese como:

- a) a formação do complexo mitocondrial e;
- b) algumas fases da formação do acrossomo no aparelho de Golgi:
 - b1) formação de pequenos grânulos pró-acrossômicos que mais tardiamente originam vesículas acrossômicas de vários tamanhos e eletron-densidades (b2) e que finalmente dão origem a um grande grânulo acrossômico (b3).

Figura 38 - Eletromicrografia com espaços intercelulares (ei) e vacúolos citoplasmáticos (*) em espermatídes precoces (St) no epitélio germinativo do túbulo seminífero (animal do subgrupo A2). Observar no citoplasma das espermatídes: complexo mitocondrial (seta espessa) na célula à esquerda; pequenos grânulos pró-acrossômicos (estrela) junto a um aparelho de Golgi; aparelho de Golgi apresentando vesículas acrossômicas (g); cisternas de um aparelho de Golgi sem secreção (cabeça de seta); grânulo acrossômico próximo ao núcleo (seta delgada) à direita. 8000x.

6. *Discussão*

6 DISCUSSÃO

O estudo experimental da torção testicular tem importância e interesse pela relativa frequência com que este quadro acomete pacientes de várias faixas etárias, mas com predomínio na infância. O rato é um animal que se presta à realização de estudos pela facilidade de acesso à gônada e pela reduzida necessidade de reposição secundária a óbito. Neste trabalho houve a necessidade de substituição de apenas dois animais que faleceram devido ao procedimento anestésico.

O modelo animal de torção testicular aqui empregado vem sendo utilizado há cerca de 30 anos^{18,19} associado a metodologias de avaliação como ressonância magnética²⁰ e ultrassonografia associada ao efeito Doppler²¹, demonstrando a eficácia na indução de isquemia com rotação de 720 graus. No entanto, não há padronização de tempo de isquemia entre os diversos estudos, variando desde 2 horas até 5 horas, o que pode influir nos diferentes resultados^{22,23}.

Como afirmado anteriormente, por ser uma urgência urológica com consequências importantes aos pacientes desperta interesse o eventual uso de fármacos que poderiam minorar a lesão testicular e, conseqüentemente, suas repercussões na fertilidade e produção hormonal^{24,25}. No entanto, não há medicamento aprovado para uso clínico rotineiro.

O processo de torção/destorção testicular é um evento isquemia/reperfusão que leva à produção de radicais livres derivados de oxigênio culminando com dano e morte celular por apoptose²⁶. Há vários mecanismos antioxidantes incluindo enzimas e antioxidantes não enzimáticos que se contrapõem ao estresse oxidativo. Nesse período ocorre aumento de metabólitos (MDA), aumento da permeabilidade de membrana ao cálcio levando sinalização de apoptose feita por meio da caspase – 3 e, geralmente, menor expressão de BCL-2.

Essas importantes modificações do meio intracelular promovem várias alterações como vacúolos intra-citoplasmáticos, aumento dos espaços intercelulares e descamação aumentada das espermátides que, dependendo da extensão e intensidade do comprometimento ocasionam redução ou perda da função testicular, ou seja, a produção hormonal e de espermatozóides². A avaliação após uma semana do evento isquêmico foi importante para observar lesão tecidual

subaguda/crônica, como já demonstrado em estudos anteriores, com diferenças entre grupos até após 60 dias²⁴, o que possibilita a análise com parâmetros associados à lesão de reperfusão que são o diâmetro do tubo seminífero, espessura da camada de células germinativas e o grau de maturação dos espermatozóides²⁴.

Utilizando-se o método semi-quantitativo de Minutoli et al.¹⁶, na análise histológica observamos alterações compatíveis com o processo de isquemia e reperfusão com achados mais acentuados nos grupos de maior tempo de isquemia (6h) como edema intersticial, focos de descamação celular intra-tubular e necrose de coagulação, e infiltrados inflamatórios esparsos. Embora exista necrose celular, muitos túbulos apresentam células viáveis. Excetuando a necrose, estes achados histológicos são, na sua maioria, passíveis de regressão, permitindo reorganização do parênquima restante. Este dado dá apoio à prática clínica onde o testículo é preservado quando o paciente é avaliado dentro desse período de tempo.

Algumas características da clorpromazina foram consideradas para despertar o interesse em sua utilização, pois parece prevenir a ocorrência de mudanças na membrana fosfolipídica devido ao aumento do cálcio intracelular. Tais alterações aumentam a permeabilidade celular e geram dano irreversível da atividade mitocondrial^{27,28}. Seu mecanismo de ação não está esclarecido, mas exerce fator protetor no rim, fígado, coração e sistema nervoso^{5,10,12,29-31}. No entanto, o tecido testicular tem por particularidade a constante meiose celular chamada espermatogênese, na qual a atividade mitocondrial muda de função sendo a glicólise anaeróbia fundamental para a motilidade espermática³²⁻³⁴.

Alguns estudos demonstraram vários fármacos com ação no estresse oxidativo após destorção testicular, com diminuição de metabólitos da peroxidação lipídica (MDA)^{35,36}. No entanto, não relatam alterações histopatológicas de relevância entre os grupos. Já a utilização de dehidroepiandrosterona causou diminuição dos componentes do estresse oxidativo e significância na análise histológica, dentre outras drogas^{24,37,38}.

Outro medicamento utilizado e que despertou interesse foram os inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (iPDE5)³⁹, cujo mecanismo pode estar correlacionado à abertura de canais de potássio, levando ao menor influxo de cálcio intramitocondrial e redução do estresse oxidativo^{40,41}.

Outro método recentemente estudado é o pré-condicionamento isquêmico com proteção conferida ao testículo afetado e também ao contra-lateral⁴².

Tal técnica já foi demonstrada em outros órgãos como coração e cérebro^{43,44}. Entretanto, a nosso ver, este processo chama mais a atenção pelo seu mecanismo de ação do que como processo terapêutico após torção testicular.

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão diversas alterações estruturais foram percebidas nos grupos com 1 e 6 horas de isquemia como a presença de vacúolos citoplasmáticos em várias espermatogônias e espermátides precoces, aumento dos espaços intercelulares e aumento da descamação de espermátides alongadas no compartimento adluminal dos túbulos. Esses achados também foram descritos com estudos prévios^{23,45}. São alterações secundárias à isquemia e reperfusão e a diferença entre os dois grupos esteve relacionada à maior intensidade observada nos animais com 6h de isquemia.

A administração prévia de clorpromazina não foi estatisticamente eficaz em reduzir as alterações ultraestruturais e também não conseguiu reduzir a marcação da CASPASE 3 nos animais que receberam esse medicamento, como demonstrado no gráfico 3, embora possa ser observada, no gráfico 2, leve tendência à redução da expressão dessa proteína. Uma possibilidade a ser considerada quanto à essa aparente falta de ação seria a manutenção da integridade da membrana basal do túbulo seminífero na torção com até 6h. Esta não teria sofrido alterações devido à isquemia de relativa curta duração impedindo, assim, sua passagem até as células intra-tubulares. Também deve ser considerado que o processo de apoptose é mais intenso dentro das primeiras horas que se seguem ao insulto isquêmico, decaindo progressivamente com o passar do tempo.

A importância da morte celular por apoptose após isquemia é muito discutida na literatura^{24;44;45}. Alterações celulares após o processo de isquemia/reperfusão são demonstradas por imunohistoquímica, tendo como principais marcadores a caspase-3 (indutora da apoptose) e BCL-2 (anti-apoptose). No estudo de CAYLI⁴³ o pico da expressão de caspase-3 e a baixa expressão de BCL-2 foram demonstrados após 12 horas do evento, dados que coincidiram com maior perda celular, mostrando maior tendência à apoptose nos tecidos onde houve isquemia mais prolongada.

A CASPASE 3 representa uma proteína que detecta a morte celular por apoptose, tanto pela via intrínseca quanto extrínseca. Neste estudo, a marcação positiva para CASPASE 3 foi mais discreta no grupo com 1 hora de torção e maior no grupo com 6 horas, mas sem que ocorresse um padrão definido de marcação.

Como pode ser observado no gráfico 2, com aumento de 50x, apenas pouco mais de 30% dos túbulos apresentaram-se comprometidos, ou seja, essa marcação foi esparsa indicando que a maioria do túbulos mantinham-se intactos.

A proteína BCL2 atua protegendo a célula da morte por apoptose quando esta ocorre pela via intrínseca, geralmente dependente de lesão mitocondrial. Assim, sua reduzida expressão pode ser um indicativo de que a apoptose nas células tubulares ocorre principalmente pela via extrínseca. A favor disto fica a demonstração de mitocôndrias praticamente sem lesões à microscopia eletrônica de transmissão.

A continuidade a ser feita neste trabalho será o estudo do testículo contralateral utilizando tanto a expressão da CASPASE 3 quanto a microscopia eletrônica de transmissão objetivando avaliar se o tempo de isquemia de 6 horas, seguido da reperfusão, também induz algum grau de lesão celular nessa gônada.

Finalmente, mesmo considerando que a intensidade das lesões das células dos túbulos seminíferos não seja extremamente grave e de padrão difuso após isquemia de 6 horas, seguida de reperfusão, o que permite a recuperação e manutenção funcional da gônada ainda que parcialmente, acreditamos ser útil aos pacientes a busca por um medicamento que possa preservar adequadamente o parênquima testicular nestes casos.

7. Conclusão

7 CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo, a análise dos resultados obtidos permite as seguintes conclusões:

1 – as lesões celulares intratubulares induzidas pela isquemia e reperfusão testicular são semelhantes após 1 e 6 horas e as diferenças estão relacionadas à sua maior intensidade no grupo com 6 horas;

2 – a clorpromazina não foi eficaz na prevenção da lesão celular intratubular após 1 e 6 horas de isquemia/reperfusão testicular.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williamson RC. Torsion of the testis and allied conditions. *Br J Surg*. 1976;63(6):465-76.
2. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol*. 2014;11(7):391-9.
3. Chiang G. Disorders of the penis and scrotum. *Pediatric Urology* 2010. p. 544-62.
4. Aktas BK, Bulut S, Baykam MM, Ozden C, Senes M, Yucel D, et al. The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*. 2010;26(3):293-8.
5. Else PL, Mansfield K. Activation of sodium transport and intracellular sodium lowering by the neuroleptic drug chlorpromazine. *Biochem Pharmacol*. 1997;54(2):275-81.
6. Hanci V, Erol B, Bektas S, Mungan G, Yurtlu S, Tokgoz H, et al. Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats. *Urol Int*. 2010;84(1):105-11.
7. Sader AA. Proteção farmacológica da medula espinhal isquêmica. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1996;11(2):10.
8. Haimovici H. Ischemia-reperfusion syndrome of skeletal muscle. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1990;31(3):318-9.
9. Roselino JE, Castro-e-Silva Junior O, Romanello LM, Ceneviva R. Effect of chlorpromazine and biliary drainage on portal blood flow and mitochondrial function during extrahepatic cholestasis. *Braz J Med Biol Res*. 1989;22(7):889-93.
10. Sader AA, Barbieri-Neto J, Sader SL, Mazzetto SA, Alves P, Jr., Vanni JC. The protective action of chlorpromazine on the spinal cord of rabbits submitted to ischemia and reperfusion is dose-dependent. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002;43(6):827-31.

11. Araujo WM. Animal model of renal ischemic injury, and chlorpromazine protector effect, evaluated by TC-99-MG₃ dynamic renal scan. *Acta Cir Bras.* 2002;17:5.
12. Chien KR, Abrams J, Pfau RG, Farber JL. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol.* 1977;88(3):539-57.
13. Godfraind T, Kaba A. Inhibition by cinnarizine and chlorpromazine of the contraction induced by calcium and adrenaline in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1969;35(2):P354-5.
14. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
15. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):897-907.
16. Minutoli L, Antonuccio P, Romeo C, Nicotina PA, Bitto A, Arena S, et al. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase in the development of testicular ischemia-reperfusion injury. *Biol Reprod.* 2005;73(4):730-6.
17. Ovalle WK. Netter. Bases da histologia: Elsevier editora Ltda; 2008.
18. Janetschek G, Schreckenberger F, Grimm W, Marberger M. Hemodynamic effects of experimental testicular torsion. *Urol Res.* 1987;15(5):303-6.
19. Kurpisz M, Mazurkiewicz I, Fernandez N. Morphological and immunological observations in experimentally induced torsion of testis in rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1985;9(4):129-35.
20. Kaipia A, Ryymin P, Makela E, Aaltonen M, Kahara V, Kangasniemi M. Magnetic resonance imaging of experimental testicular torsion. *Int J Androl.* 2005;28(6):355-9.
21. Kwon JW, Kim WS, Cheon JE, Kim CJ, Kim IO, Yeon KM. Evaluation of testicular viability by power Doppler ultrasonography in experimentally induced acute testicular torsion. *Invest Radiol.* 2005;40(10):682-7.

22. Parlaktas BS, Atilgan D, Ozyurt H, Gencten Y, Akbas A, Erdemir F, et al. The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. *Asian J Androl.* 2014;16(2):314-8.
23. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 2010;89(3):314-20.
24. Bozlu M, Acar D, Cayan S, Aktas S, Tunckiran A. Protective effect of trapidil on long-term histologic damage in a rat model of testicular ischemia-reperfusion injury. *World J Urol.* 2009;27(1):117-22.
25. Mestrovic J, Drmic-Hofman I, Pogorelic Z, Vilovic K, Supe-Domic D, Seselja-Perisin A, et al. Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Urology.* 2014;84(5):1194-8.
26. Yulug E, Turedi S, Karaguzel E, Kutlu O, Mentese A, Alver A. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Surg.* 2014;49(3):484-9.
27. Piccinato CE, Salles Roselino JE, Massuda CA, Cherri J. Lack of chlorpromazine effect on skeletal muscle metabolism after ischemia and a short reperfusion period. *Microsurgery.* 2004;24(3):194-9.
28. Tucci Junior S, Carvalho RM, Celini FM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tirapelli LF, et al. Renal ischemia and reperfusion injury: influence of chlorpromazine on renal function and lipid peroxidation. *Acta Cir Bras.* 2008;23 Suppl 1:42-6; discussion 6.
29. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation.* 1983;35(3):198-204.
30. Netto JMB. Chlorpromazine and mitochondrial function in kidney ischemia-reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2001;16:5.
31. Edoute Y, van der Merwe EL, Sanan D, Kotze JC, van Niekerk I, Lochner A. Normothermic ischaemic cardiac arrest and reperfusion of the isolated working heart: effect of chlorpromazine on functional, metabolic and morphological recovery. *J Mol Cell Cardiol.* 1983;15(9):603-20.

32. Amaral A, Paiva C, Baptista M, Sousa AP, Ramalho-Santos J. Exogenous glucose improves long-standing human sperm motility, viability, and mitochondrial function. *Fertil Steril*. 2011;96(4):848-50.
33. Hereng TH, Elgstoen KB, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skalhegg BS, et al. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2011;26(12):3249-63.
34. Amaral A, Lourenco B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013;146(5):R163-74.
35. Altunoluk B, Soylemez H, Bakan V, Ciralik H, Tolun FI. Protective effects of zofenopril on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Urol J*. 2011;8(4):313-9.
36. Akbas H, Ozden M, Kanko M, Maral H, Bulbul S, Yavuz S, et al. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. *J Int Med Res*. 2005;33(5):528-36.
37. Rifaioğlu MM, Motor S, Davarci I, Tuzcu K, Sefil F, Davarci M, et al. Protective effect of ebselen on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Andrologia*. 2014;46(10):1134-40.
38. Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M. Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*. 2008;40(1):38-43.
39. Ozgur BC, Telli O, Yuceturk CN, Sarici H, Ozer E, Surer H, et al. The effect of sildenafil and udenafil on testicular damage following ischemia-reperfusion injury in rats. *J Urol*. 2014;192(4):1272-7.
40. Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S, Akduman B, Yencilek F, et al. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. *Kaohsiung J Med Sci*. 2009;25(7):374-80.
41. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-66.

42. Shimizu S, Saito M, Dimitriadis F, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, et al. Protective effect of ischaemic post-conditioning on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury. *Int J Androl.* 2011;34(3):268-75.
43. Zhao H. The protective effect of ischemic postconditioning against ischemic injury: from the heart to the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2(4):313-8.
44. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Transpl Int.* 2008;21(4):364-71.
45. Kanter M. Protective effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 2011;91(3):708-13.

Apêndice A - Tabela 2

ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Experimentação em Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 053/2011, sobre o projeto intitulado “*Estudo da ação da clorpromazina na torção testicular em ratos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Silvio Tucci Junior** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de junho de 2011.

(We certify that the protocol nº 053/2011, about “*Clorpromazin effects on testicular torsion – an experimental study in rats*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 06/27/2011.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2011.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício