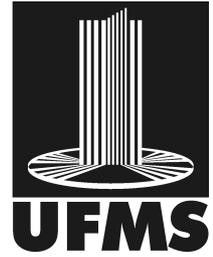


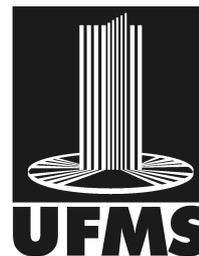
**LUÍS FERNANDO DIP**



**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA EM TESTÍCULOS DE RATOS  
SUBMETIDOS A TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO**

**CAMPO GRANDE  
2011**

**LUÍS FERNANDO DIP**

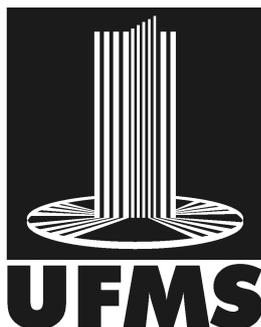


**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA EM TESTÍCULOS DE RATOS  
SUBMETIDOS A TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Departamento de Clínica Cirúrgica, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Brochado Antonioli da Silva

CAMPO GRANDE  
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E  
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

COORDENADOR: **PROF. DR. RICARDO DUTRA AYDOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTOR: **Luís Fernando Dip**

ORIENTADORA: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Brochado Antonioli Silva**

TÍTULO: **Efeitos da n-acetilcisteína em testículos de ratos submetidos a torção do cordão espermático.**

BANCA EXAMINADORA:

**1 – Presidente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva**

MEMBROS EFETIVOS

**1 – Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Marchetti Chaves Thomaz - UFMS**

**2 – Dr. Marcelo Luiz Brandão Vilela – ABCG / Santa Casa de Campo Grande**

MEMBROS SUPLENTE

**1 – Prof. Dr. Roberto Antonioli**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

LUÍS FERNANDO DIP

### EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA EM TESTÍCULOS DE RATOS SUBMETIDOS A TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Departamento de Clínica Cirúrgica, para obtenção do Título de Mestre.

Resultado: \_\_\_\_\_

Campo Grande (MS), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

#### BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva

Instituição: UFMS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Marchetti Chaves Thomaz - UFMS

Instituição: UFMS

Dr. Marcelo Luiz Brandão Vilela

Instituição: ABCG / Santa Casa de Campo Grande

## DEDICATÓRIA

Aos meus filhos  
**SOFIA, DAVI e LARA,**  
frutos de um amor verdadeiro  
e motivadores do meu viver.

A minha esposa  
**MARIZE,**  
uma pessoa amável,  
e de imenso caráter, lealdade,  
amizade e compreensão.

A minha família,  
**LUIZA, NELSON,**  
**ANA E CARLOS RENATO**  
que muito amo, e que sempre acreditaram  
e confiaram em mim.

Ao meu pai, **NELSON DIP,**  
que emblema em sua alma mais uma  
conquista, reflexo de seu  
inestimável caráter e dedicação  
como médico e pai.

A minha avó, **IRACEMA**,  
que ensinou-me a ser honesto, prestativo,  
e a respeitar ao próximo,  
e que amarei  
até o último dia de minha vida.

A meus sogros,  
**HÉLCIO E CONCEIÇÃO**,  
um exemplo de vida; que nos apoiaram nos  
momentos mais difíceis com muito amor e  
afeto, especialmente durante minha  
universidade e residência médica.

## **AGRADECIMENTOS**

A **DEUS**, por dar-me saúde, amigos e uma família maravilhosa, e por estar sempre ao meu lado nos momentos que pensei em desistir ou fraquejar.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL (UFMS)**, que proporcionou-me a possibilidade de realização desse trabalho.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE**, por intermédio de seus professores e funcionários, que ajudaram-me na concretização de um sonho.

Ao Prof. Dr. **RICARDO DUTRA AYDOS**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, que nos apresentou o curso e nos permitiu integrá-lo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **ANDRÉIA BROCHADO ANTONIOLLI DA SILVA**, minha orientadora, por seus valiosos ensinamentos, e por sua inesgotável persistência e paciência durante a elaboração e conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **ALEXANDRE NAKAO ODASHIRO**, Professor do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS, Professor da Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS e Patologista do LAC (Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia) de Campo Grande, pela preparação e análise histológica das lâminas, assim como pelas orientações gerais.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **ELENIR ROSE JARDIM CURY PONTES**, Professora da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFMS e da Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, pela orientação e paciência com as análises estatísticas.

A **JOSÉ CARLOS MARTINS COSTA**, chefe do Programa de Residência Médica em Urologia da Santa Casa de Campo Grande (ABCG), que permitiu e incentivou essa conquista, entendendo e valorizando a sua importância.

A **NELSON GASPAR DIP JÚNIOR**, meu irmão, Coordenador do Programa de Residência Médica em Urologia da Santa Casa de Campo Grande (ABCG) e pós-graduando (Doutorado) pela Universidade de São Paulo, pelos seus ensinamentos constantes e pela confiança na sincronia dos meus trabalhos.

A **DANIEL NUNES E SILVA**, Médico Cirurgião Plástico, Mestre e Pós-graduando (Doutorado) em Cirurgia pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo grande apoio, críticas e orientações em todas as fases desse trabalho.

Aos meus amigos de Residência Médica em Urologia, **DANIEL ABE**, pós-graduando (Doutorado) pela Universidade de São Paulo; **GUILHERME STANGARLIN**, **GUSTAVO BATTISTETTI**, **RAFAEL TIBYRIÇÁ**, **GUSTAVO DIAS** e **WILSON RICARDO ROSOLEM**, residentes de urologia da Santa Casa de Campo Grande (ABCG) e do Hospital Universitário da UFMS, pelo cooperativismo e compreensão durante este projeto, e pelos quais tenho grande carinho e respeito.

A **WILLIAM SALAZAR**, Médico Veterinário e Mestre pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela ajuda e orientação durante os procedimentos anestésico-cirúrgicos.

A **LUIZ GUSTAVO ORLANDI DE SOUSA**, Médico Anestesiologista e Preceptor da Residência Médica em Anestesiologia da Santa Casa de Campo Grande (ABCG), pelas orientações quanto ao manejo e à farmacologia dos anestésicos e sedativos utilizados.

A **ELANE FABRÍCIO DE JESUS**, Médica Veterinária e responsável pelo Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela ajuda e orientação durante os procedimentos anestésico-cirúrgicos.

A **ROSEANA LEITE**, auxiliar do biotério e da disciplina de técnica cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFMS, pela atenção e cuidados pré e pós operatórios com os animais utilizados no experimento.

Ao meu mais novo amigo **RICARDO MARTINEZ BELENTANI**, médico urologista, que vem compartilhando diariamente comigo, no Sudoeste do Paraná, as conquistas e os desafios da vida, fora e dentro da urologia.

Aos meus eternos amigos, que prezam e zelam por amizades verdadeiras, fortificando minha alma.

A todas as pessoas que, perto ou distantes, ajudaram-me direta ou indiretamente durante essa simples e árdua conquista.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação  
Abraçar a vida e viver com paixão  
Perder com classe e viver com ousadia.  
Pois o triunfo pertence a quem se atreve  
E a vida é muito curta para ser insignificante”

**Charles Chaplin**

## RESUMO

**Dip, LF. Efeitos da n-acetilcisteína em testículos de ratos submetidos a torção do cordão espermático.** Campo Grande; 2011. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da n-acetilcisteína em testículos de ratos submetidos a torção do cordão espermático (TCE).

**Métodos:** Foram utilizados quarenta e oito ratos, distribuídos em quatro grupos com 12 animais cada. Os animais dos grupos I e II foram submetidos a torção do cordão espermático; sendo que no grupo II, receberam NAC. Os animais dos grupos III e IV, foram submetidos à exposição dos testículos e imersão em solução fisiológica; sendo que no grupo IV, receberam NAC. Nos grupos I e II, os testículos foram destorcidos após 45 minutos de isquemia, sendo que em todos os grupos, os testículos foram reposicionados na bolsa escrotal após 60 minutos. Passados 60 dias, os animais foram submetidos a orquiectomia bilateral com avaliação histopatológica dos testículos.

**Resultados:** Na comparação entre os testículos direito e esquerdo em cada grupo isoladamente, houve diferença estatisticamente significativa no grau de lesão histológica em todos os grupos avaliados. Na avaliação inter-grupos, quando analisados os testículos direitos, não houve diferença estatisticamente significativa para os grupos III e IV, isto é, para os testículos que não sofreram torção do cordão espermático, a administração do medicamento não mostrou benefício. Na análise dos testículos direitos dos grupos I e II, onde houve a torção do cordão espermático, a diferença para GIII e GIV foi significativa ( $p < 0,001$ ). Observou-se também, diferença entre GI e GII ( $p < 0,001$ ), mostrando efeito protetor da N-Acetilcisteína nos testículos torcidos (GII), com diminuição dos graus de lesão no segundo.

Para o testículo esquerdo, houve diferença estatística entre os grupos I e II, quando comparados aos grupos III e IV ( $p = 0,023$ ). Não houve diferença entre GI e GII, assim como entre GIII e GIV. Isso demonstra que a torção no testículo direito provocou alterações histológicas no testículo contra-lateral, sem efeito benéfico no grupo que recebeu N-Acetilcisteína ( $GI = GII > GIII = GIV$ ), enquanto que nos grupos sem torção, as alterações histológicas foram pouco significativas.

**Conclusões:** A N-acetilcisteína mostrou efeito protetor na morfologia celular dos testículos ipsilaterais de ratos submetidos à torção do cordão espermático seguido de reperfusão, e também observou-se alterações histológicas nos testículos contralaterais.

**Palavras-chave:** n-acetilcisteína, torção testicular, isquemia-reperfusão.

## ABSTRACT

**Dip, LF. Effects of n-acetylcysteine in testes of rats subjected to torsion of the spermatic chord.** Campo Grande; 2011. [Dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

**Background:** Evaluate the effects of NAC in testes of rats subjected to ischemia-reperfusion through torsion and detorsion of the spermatic chord.

**Methods:** Forty-eight rats, divided into four groups with 12 animals each. The animals in groups I and II were subjected to twisting of the spermatic cord, and in group II received NAC. The animals in groups III and IV were exposed to the testicles and immersion in saline solution, and in group IV, received NAC. In groups I and II, the testes were distorted after 45 minutes of ischemia, and in all groups, the testes were repositioned in the scrotum after 60 minutes. After 60 days, the animals underwent bilateral orchiectomy with histopathological evaluation of the testes.

**Results:** When comparing the right and left testicles in each group separately, there was statistically significant in histopathological degree changes in all groups. In assessing inter-groups when analyzing the right testicles, there was no statistically significant difference for groups III and IV, so the testes that did not undergo twisting of the spermatic cord, the drug showed no benefit. In the analysis of the right testicles in groups I and II, where there was torsion of the spermatic cord, the difference for GIII and GIV was significant ( $p < 0.001$ ). There was also difference between GI and GII ( $p < 0.001$ ), showing the protective effect of N-acetylcysteine in the testicles twisted (GII).

To the left testicle was no statistical difference between groups I and II compared to groups III and IV ( $p = 0.023$ ). There was no difference between GI and GII and between GIII and GIV. This shows that the torsion of the right testicle caused histological changes in contralateral testis, with no beneficial effect in the group receiving N-acetylcysteine ( $G I = G II > G III = G IV$ ), while groups without torsion, the histological changes were not significant.

**Conclusions:** N-acetylcysteine showed a protective effect on cell morphology of the ipsilateral testes of rats after spermatic cord torsion followed by reperfusion, and was observed histological changes in contralateral testis.

**Key words:** n-acetylcysteine, testicular torsion, ischemia-reperfusion.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática do desenho do estudo.....46
- Figura 2. Fotografias demonstrando o ato operatório. A) Incisão cirúrgica em região inguinal direita. B) Animal posicionado com tensores elásticos.....48
- Figura 3. Fotografia ilustrando Testículo e cordão espermático direito exteriorizado por meio de inguinotomia.....49
- Figura 4. Fotografias A e B mostrando os animais do grupo III anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico.....50
- Figura 5. Fotomicrografias da histologia de dois animais do grupo II. Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 40x.....54
- Figura 6. Fotomicrografias da histologia de um animal do grupo I. Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 40x.....54
- Figura 7. Fotomicrografias da histologia de dois animais do grupo II. Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 100x.....55
- Figura 8. Fotomicrografias da histologia de dois animais do grupo I. Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 100x.....55
- Figura 9. Fotomicrografias da histologia de dois animais do grupo II. Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x.....56
- Figura 10. Fotomicrografias da histologia de dois animais do grupo I. Coloração: Hematoxilina e Eosina; aumento 400x.....56

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Representação da análise estatística do peso (g) médio dos animais, no primeiro dia do estudo.....53
- Tabela 2. Representação dos resultados da análise estatística intra-grupo e inter-grupos.....53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BIREME	Biblioteca Regional de Medicina
CAT	Catalase
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
g	gramas
GSH	Glutathiona / Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HE	Hematoxilina-eosina
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
I.P	Intra-peritoneal
I/R	Isquemia-reperfusão
IRAi	Insuficiência Renal Aguda isquêmica
Kg	quilogramas
LDH	Desidrogenase láctica
MDA	Malondialdeído
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
NAC	N-acetilcisteína
NO	Óxido Nítrico
RLO	Radicais livres de oxigênio
SDO	Superóxido dismutase
TD	Testículo direito
TE	Testículo esquerdo
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassom
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
µm	micrômetros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Embriologia Testicular.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Torção do Cordão Espermático.....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Epidemiologia.....	24
2.2.2	Etiologia.....	25
2.2.3	Quadro Clínico.....	27
2.2.4	Diagnóstico Diferencial.....	28
2.2.5	Exames Complementares.....	30
2.2.6	Tratamento.....	32
<b>2.3</b>	<b>Dano no Testículo Contra-lateral.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4</b>	<b>O Fenômeno Isquemia-reperfusão.....</b>	<b>34</b>
2.4.1	O Endotélio.....	35
2.4.2	O Óxido Nítrico.....	36
2.4.3	Os Radicais Livres.....	37
<b>2.5</b>	<b>As Drogas Antioxidantes e a N-Acetilcisteína.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Amostra.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Procedimentos.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Estudo Histológico.....</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>52</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A torção do cordão espermático (TCE) trata-se de uma entidade clínica freqüente em unidades de pronto-atendimento, acometendo crianças, adolescentes e adultos jovens, com incidência anual estimada de 1 em cada 4000 homens, e 1 em cada 158 homens com idade até 25 anos. Tem seu pico de incidência em neonatos e adolescentes entrando na puberdade, caracterizando uma emergência cirúrgica, podendo levar a subfertilidade e infertilidade (ANDERSON, WILLIAMSON, 1986; BLANK, 1993; DAVENPORT, 1996; KOLETTIS, 1996; CUMMINGS, 2002; SESSIONS *et al*, 2003). Minutoli *et al*. (2009) refere que a TCE requer diagnóstico e tratamento imediatos para evitar subsequente lesão testicular e infertilidade.

Em uma retrospectiva histórica sobre torção de órgãos escrotais, Noske *et al*. (1998) considerou essa ocorrência como emergência urológica, e segundo Silva *et al*. (2005), além de ser uma afecção frequente, se não diagnosticada e tratada precocemente, pode levar à orquiectomia em 50 à 70% dos casos. Haynes *et al*. (1983) e Bozlu *et al*. (2009) referem que a taxa de recuperação corresponde ao intervalo decorrido entre o início dos sintomas e a intervenção, de modo que a taxa de salvamento está relacionada com o diagnóstico precoce seguido pela destorção cirúrgica do cordão espermático, sendo este o manejo atualmente aceito e padronizado para a preservação da espermatogênese e da fertilidade.

Uma variedade de fatores predisponentes (aumento do volume testicular, criptorquidia, testículo horizontalizado), parecem estar associados ao desenvolvimento da TCE, sendo que na maioria das vezes, a túnica albugínea é volumosa e insere-se mais alta no cordão espermático, permitindo maior liberdade de rotação do cordão espermático. Outros fatores possivelmente implicados são atividade sexual e trauma escrotal (BLANK *et al*, 1993; CUMMINGS, 2002; RINGDAHL *et al*, 2006).

Os fatores mais importantes determinantes do dano testicular são a duração e o grau de torção do cordão espermático (SESSIONS *et al*, 2003; GUIMARÃES *et al*, 2007; MINUTOLI *et al*, 2009), ambos relacionados diretamente à isquemia tecidual. O restabelecimento do fluxo sanguíneo após isquemia, conhecido como fenômeno isquemia-reperfusão (I/R), embora seja essencial para a sobrevivência dos tecidos isquêmicos, também pode ser prejudicial por desencadear uma cascata

fisiopatológica que inclui a ativação de neutrófilos e citocinas inflamatórias (tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), adesão de moléculas com aumento da trombogenicidade, liberação de Cálcio (Ca<sup>++</sup>) intracelular e produção de radicais livres de oxigênio (RLO), também conhecidos como espécies reativas de oxigênio ou EROs (CAMPOS, YOSHIDA, 2004; UGUR *et al*, 2005; BOZLU *et al*, 2009).

O mecanismo oxidativo decorrente do processo isquemia-reperfusão (I/R) contribui para os danos celulares e funcionais observados após a instalação dessa síndrome. A produção intensificada de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) promove, entre outras alterações, a desestruturação do esqueleto celular e desarranjo da membrana, com disfuncionalidade das bombas e ativação de enzimas oxidantes, além de alterações mitocondriais que limitam ainda mais a oferta de ATP para a célula (CAMPOS, YOSHIDA, 2004; ANDRADE *et al*, 2004). Em condições fisiológicas, os efeitos dos radicais livres são contrabalanceados pelo sistema antioxidante endógeno, impedindo a formação ou eliminando os RLO já produzidos (GUIMARÃES *et al*, 2007). Associando-se esses fatores agressores: radicais livres de oxigênio, agentes quimiotáxicos e agregação leucocitária, induz-se a peroxidação de lipídeos com lise de membranas, perda da integridade endotelial e aumento de permeabilidade vascular, resultando em dano tecidual e morte celular. Portanto, para tentar-se amenizar esse dano tecidual, por vezes reversível, deve-se atuar na eliminação de radicais livres já formados ou, então, impedindo que eles se formem (CAMPOS, YOSHIDA, 2004; GUIMARÃES *et al*, 2007).

A disfunção endotelial decorrente da I/R e conseqüente à produção de EROs (sendo as principais o radical superóxido, radical hidroperóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil), interfere em alguns processos biológicos, como por exemplo, a diminuição ou inativação do óxido nítrico (NO) o qual é liberado fisiologicamente por células endoteliais, sugerindo que este seja consumido pelas EROs (UGUR *et al*, 2005; Üstün *et al*, 2008). Esta relação entre EROs e disfunção endotelial tem sido observada em vários órgãos, e embora o mecanismo fisiopatológico da lesão testicular não seja completamente conhecido, quando a torção do cordão espermático ocorre, o fluxo sanguíneo é interrompido. Edema, hemorragia, obstrução arterial e hipóxia desenvolvem-se (ALI ÇAY *et al*, 2006). Após a reperfusão, quando a produção de EROs excede a capacidade de defesa do organismo, o estresse oxidativo é gerado, contribuindo para a injúria celular, a qual pode ser reversível ou irreversível (GUIMARÃES *et al*, 2007).

Portanto, com base na experiência científica acumulada ao longo do tempo, evidenciando o papel das EROs na patogênese das lesões decorrentes da I/R, diversos trabalhos surgiram propondo-se atenuar as repercussões hemodinâmicas e fisiopatológicas da restauração vascular pós-isquêmica em alguns tecidos e órgãos. As estratégias adotadas são principalmente: suplementação de antioxidantes endógenos, antioxidantes exógenos ou componentes enzimáticos, bloqueio de metais de transição ( $Fe^{++}$ ) e da atividade leucocitária, neutralização da ação da hipoxantina, anti-inflamatórios, vasodilatadores, antiagregantes plaquetários, anticorpos monoclonais contra glicoproteína de adesão do neutrófilo e a suplementação de doadores de NO (CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

Algumas substâncias anti-oxidantes vêm sendo estudadas nos últimos anos com a proposta de atuar nestes mecanismos oxidativos agressores, dentre elas: propofol, alopurinol, ácido acetil salicílico, ácido ascórbico, selênio, diclofenaco, dexpanthenol, trimetazidina, inibidores da enzima conversora de angiotensina e do receptor da angiotensina tipo II, inibidores da 5 fosfodiesterase, eritropoetina, trapidil, n-acetilcisteína, entre outras.

A N-acetilcisteína (NAC) foi introduzida como uma droga mucolítica em 1960 e, mais tarde, foi descoberto seu efeito anti-oxidante por ser um agente que consome radicais livres e ser precursora da glutathiona (GSH), a qual provê ao organismo um mecanismo de defesa crucial contra os agentes oxidativos.

A NAC é uma substância de baixo peso molecular, doadora do grupo sulfidril (tiol), e tem sido usada em estudos clínicos e experimentais para diminuir a lesão por reperfusão. Ela pode ser benéfica por meio de sua ação antioxidante direta através da reação com peróxido de hidrogênio, e, portanto, diminuindo a produção de hidroxilas altamente reativas. Também aumenta a reversão citoplasmática de glutathiona reduzida (GSH), com ação na defesa celular e extracelular contra espécies reativas de oxigênio (ANDRADE *et al*, 2004; PORTELLA *et al*, 2004; ALI ÇAY *et al*, 2006).

Segundo Andrade *et al*. (2004), a NAC também tem sido relacionada à intensificação dos efeitos biológicos do NO por combinação desse à forma S-nitrosotiol, sendo esta a mais estável forma do NO. Ela ainda exerce um efeito antioxidante indireto por facilitar a biossíntese da Glutathiona (GSH) por meio da enzima glutathiona peroxidase, uma das três enzimas necessárias à sobrevivência celular por ser um antioxidante endógeno. A NAC penetra facilmente na membrana

celular, com toxicidade muito baixa, sendo amplamente utilizada em estudos referentes à isquemia-reperfusão, e em alguns referentes a TCE em ratos (ALI ÇAY *et al*, 2006; PAYABVASH *et al*, 2007; AKTAS *et al*, 2010).

Kondala Rao *et al.* (2002), avaliaram a morte de células germinativas induzida por ácido metoxiacético (MMA), e os benefícios da NAC como antioxidante pré-apoptótico. Concluíram que, se a depleção de GSH é a causa das alterações precoces da apoptose, a suplementação de substâncias precursoras de GSH pode ser capaz de impedi-las. A NAC, como precursora da biossíntese de GSH, aumentou os níveis de GSH no plasma e nas células germinativas, e foi capaz de prevenir vários eventos pré-apoptóticos, incluindo a fragmentação do DNA e, finalmente, a morte celular. Outros estudos do mesmo autor mostram que, quando as células germinativas estão envolvidas, a GSH desempenha um papel muito importante durante o estresse oxidativo. Portanto, considerando-se a via mitocondrial da apoptose, acredita-se que a NAC pode ser usada para tratar uma variedade de doenças em humanos.

No entanto, apesar da busca por meio de vários experimentos buscando algum agente antioxidante que possa reduzir os efeitos prejudiciais da reperfusão em testículos torcidos, conforme revisão sistemática realizada na literatura em bases de dados da BIREME nos últimos anos, atualmente não existe nenhuma droga aceita e padronizada como complemento ao tratamento cirúrgico desta afecção (para redução dos danos da reperfusão tecidual). Portanto, a exploração cirúrgica imediata, com destorção do testículo comprometido e orquidopexia, é a única maneira de se tentar resgatar a função testicular, atuando apenas na isquemia tecidual.

E embora a NAC tenha sido amplamente utilizada em estudos referentes a I/R de outros órgãos, tais como fígado, rins, coração, músculo esquelético, intestino e cérebro (EVORA *et al*, 1996; DEMIR; ERDEN, 1998; CUZZOCRE *et al*, 2000), os prováveis efeitos anti-oxidantes da NAC em testículos submetidos a I/R são ainda pouco consistentes, com resultados escassos (ALI ÇAY *et al*, 2006; PAYABVASH *et al*, 2007; AKTAS *et al*, 2010), tornando pertinente a realização de um estudo para avaliar o uso da NAC, em dose terapêutica, contra o estresse oxidativo, em um modelo animal (ratos) de torção/destorção testicular, assim como determinar seus efeitos na apoptose de células germinativas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Embriologia Testicular

A origem embriológica e o desenvolvimento testicular começam precocemente na vida fetal, e embora o cromossomo sexual seja determinado no momento da fusão dos gametas (pela presença ou ausência do cromossomo Y), a diferenciação sexual masculina não se inicia até que a diferenciação testicular seja iniciada (na sétima semana de gestação), quando hormônios são produzidos pelos testículos fetais e sustentam o desenvolvimento masculino normal, ao passo que a ausência do hormônio testicular resulta no desenvolvimento do sexo feminino.

Os hormônios que controlam a diferenciação sexual masculina incluem andrógenos testiculares, produzidos pelas células de Leydig, e a substância inibidora mulleriana, produzidas pelas células de Sertoli. Os andrógenos (testosterona e diidrotestosterona) mediam a diferenciação dos ductos de Wolff em vesículas seminais, epidídimos, vasos deferentes e ductos ejaculatórios. A masculinização da genitália externa tem influência similar dos andrógenos testiculares. Ambos os hormônios (testosterona e substância inibidora mulleriana) são secretados a partir da oitava semana de gestação, independente da regulação hormonal hipofisária. A testosterona é convertida, através da enzima 5 $\alpha$ -redutase, em diidrotestosterona (DHT), a qual é responsável direta pela indução da diferenciação dos ductos de Wolff (KAVOUSSI *et al*, 2007).

O gubernáculo aparece na sétima semana de gestação (no desenvolvimento do embrião), como uma condensação de tecido mesenquimal dentro de uma fáscia subserosa, de cada lado da coluna vertebral, que estende-se da gônada à fáscia entre os músculos oblíquo externo e interno. A porção cranial do gubernáculo envolve a cauda do epidídimo e o pólo inferior do testículo (na túnica albugínea), dirigindo-se no sentido caudal para dentro do canal inguinal, onde é fortemente aderido. Após, o gubernáculo sofre um aumento significativo de seu comprimento e largura, devido à deposição de glicosaminoglicanas na matriz extracelular, com posterior abaixamento testicular. Entretanto, observa-se que o gubernáculo tem um importante valor na fixação do testículo no anel inguinal antes do descenso, mas, como regra, o descenso testicular através do canal inguinal para a bolsa escrotal ainda precisa de mais esclarecimentos (JONES, 1961; KAVOUSSI *et al*, 2007). A

túnica vaginal desenvolve-se como uma herniação do peritônio no anel inguinal profundo e reclinase na porção anterior do gubernáculo. Esta encontra a parede abdominal anterior, em suas três camadas, pelo hiato do músculo transverso abdominal, de onde serão originados três folhetos: fáscia espermática interna, fáscia cremastérica e fáscia espermática externa, constituintes do cordão espermático (TANAGHO, MCANINCH, 2010).

A genitália externa desenvolve-se entre a 8 e 16 semanas de gestação, induzida pela DHT. Neste momento, os testículos são intrabdominais, permanecendo latentes até a 23ª semana de gestação, tempo em que a túnica vaginal continua alongando-se até o escroto. Os testículos, epidídimos e gubernáculo descem em massa através do canal inguinal pelo processo vaginal patente, de modo que ao redor de 50% dos testículos descem em 27 semanas e 75% descem em 28 semanas de gestação, sendo as taxas de descença diretamente proporcionais ao peso de nascimento do feto (TANAGHO, MCANINCH, 2010; KAVOUSSI *et al*, 2007).

## **2.2 A Torção do Cordão Espermático**

A torção testicular, ou do cordão espermático, é uma entidade clínica que vem sendo discutida por especialistas desde meados do século XX, quando passou a ter maior importância médica, porém o primeiro relato, feito por Desalieuve, aconteceu em 1840. Entre os anos de 1923 e 1930, mais de 250 foram relatados por O'Conor, mostrando um aumento significativo no reconhecimento e no diagnóstico desta afecção (SCOTT, 1956; SPARKS, 1971; BENTLEY, 2004).

Embora conheça-se a TCE desde o século XIX, tal doença era considerada incomum, uma curiosidade médica. Em 1913, Ombrédanne observou um caso de TCE em exploração de orquite tuberculosa e sugeriu que a mesma poderia ser uma causa comum de escroto agudo. Na década de 1920 foi descrita a torção do apêndice testicular e, paulatinamente, os cirurgiões foram descobrindo tais entidades como emergências, até que nas décadas de 1950-1960 se firmam nitidamente no armamentário dos cirurgiões. E finalmente, na década de 1960 surge a informação de que existe uma malformação anatômica bilateral responsável pela TCE, com implicações cirúrgicas e médico-legais óbvias, e a partir daí a orquidopexia contralateral é indicada. Em meados de 1970 deu-se relevância ao tema, com realização de estudos clínicos e pela conscientização quanto à

necessidade de informar aos não especialistas e leigos sobre tal afecção, a fim de melhorar os resultados terapêuticos pelo encaminhamento mais precoce dos pacientes. As décadas de 1980 e 1990 se focam em problemas de diagnóstico diferencial, desenvolvimento e uso de exames complementares, para aparelhar diagnósticos precoces e diminuir o risco de cirurgias desnecessárias. Ao mesmo tempo surgem estudos quanto à fisiopatologia das lesões secundárias à isquemia testicular, ipsi e contralateral. Aqui encontra-se o principal foco atual dos estudos, embora não esteja resolvido, em absoluto, o problema da abordagem precoce dos pacientes, conforme demonstram relatos da literatura (NOSKE et al, 1998; JESUS, 2000).

Trata-se de um quadro com início agudo e de diagnóstico, muitas vezes, difícil, talvez pelo fato da não familiarização do médico com a doença ou de uma avaliação inconclusiva, levando em muitos casos ao falso-diagnóstico de epididimite aguda, de modo que, se tratados como condições inflamatórias, evoluem ao longo dos anos com atrofia do testículo comprometido. A evolução pode ser com o acompanhamento clínico ou exploração cirúrgica tardia com orquiectomia (SCOTT, 1956; SPARKS, 1971; NOSKE *et al*, 1998).

Riba e Shmidlapp (1946) estimaram que 75% dos testículos torcidos eram perdidos, e concluíram que é melhor explorar um caso de epididimite do que deixar passar um caso de torção testicular.

### 2.2.1 Epidemiologia

Jones (1961) relatou que o evento poderia ocorrer em qualquer idade, desde neonatos até pacientes idosos, porém com maior acometimento de crianças e adolescentes, concluindo que o pico de incidência dava-se entre 10 e 40 anos de idade (predominando na infância e adolescência). Anderson e Williamson (1990) relataram uma incidência estimada que alcança 1 em cada 158 homens até os 24 anos de idade, ou uma incidência anual de aproximadamente 1 para cada 4.000 homens até 25 anos de idade. Segundo Sessions *et al.* (2003) e Mansbach *et al.* (2005), o pico está entre 10 e 19 anos de idade, representando 25% a 35% das doenças escrotais agudas na faixa pediátrica.

### 2.2.2 Etiologia

A susceptibilidade aumentada para a torção do cordão espermático resulta do desenvolvimento de uma anormalidade anatômica entre o testículo e seu mesentério. Isto poderia explicar o fenômeno de torção em um testículo criptorquídico associado a tumor (KAVOUSSI *et al*, 2007).

A torção intra-vaginal é a mais freqüente apresentação da TCE, ocorrendo em cerca de 90% dos casos. Pode ser conseqüente à perda de fixação normal do testículo e epidídimo ao revestimento fascial e muscular que circunda o cordão dentro da bolsa escrotal, levando a uma fixação deficiente do testículo, conhecido como deformidade em “badalo de sino” (RINGDAHL, TEAGUE, 2006). O testículo, normalmente fixado à bolsa em sua porção posterior (mesentérica), tem uma inserção alta do epidídimo e encontra-se totalmente envolvido pela túnica vaginal e livre na bolsa escrotal. A ausência de fixação explica também a ocorrência relativamente comum de torção em testículos criptorquídicos, a qual é aproximadamente dez vezes maior do que o índice para testículos tópicos. Geralmente esta malformação é bilateral, determinando uma chance de até 40% de torção contralateral assincrônica. A torção pode ser em qualquer sentido, contudo, segundo este autor, é muito mais comum no sentido medial (interno), podendo ter número variado de voltas. É provável que uma contração assincrônica do cremáster determine o episódio agudo, o que explica a ocorrência determinada pelo frio ou durante o sono, assim como redução espontânea com anestesia, por induzir relaxamento muscular. A doença também tem relação com o aumento rápido da massa testicular que ocorre no adolescente e em presença de tumores testiculares (JESUS, 2000; KAVOUSSI *et al*, 2007).

A torção extra-vaginal é doença tipicamente perinatal e costuma estar presente já ao nascimento. Ocorre próxima ao anel inguinal externo, geralmente ainda na vida intra-uterina, pela ausência de fixação vaginal às demais camadas da bolsa, que depende de maturação orgânica e normalmente ocorre por volta dos dez dias de vida extra-uterina.

E uma terceira forma possível de torção, muito incomum, é a torção de testículo “propriamente dita”, em que a gônada sofre torção entre si e o epidídimo, na presença de fixação anômala epidídimo-testículo (JESUS, 2000; KYRIAZIS *et al*, 2008).

A torção pode ocorrer em associação com trauma ou atividade física, embora a torção espontânea seja relatada com maior frequência por Noske *et al.* (1998), de modo que, com certa frequência, o paciente é despertado de seu sono com dor testicular aguda (fato talvez associado a contração do músculo cremáster, que insere-se sobre o cordão em configuração espiralada). Para Ringdahl *et al.* (2006), os fatores predisponentes à torção são aumento do volume testicular (frequentemente associado a puberdade), tumor testicular, testículo reclinado ou horizontalizado, cordão espermático com porção intra-escrotal longa e história de criptorquidismo (com declínio de eventos após a década de 1930, quando foi instituído o tratamento hormonal para testículos criptorquídicos); enquanto que Mansbach *et al.* (2005) avaliaram 436 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para TCE, e concluíram que idade aumentada foi um preditor para orquiectomia, alcançando taxas 30% aos 15 anos e 50% aos 25 anos de idade.

A rotação testicular pode ser variada, porém costuma ocorrer no sentido medial (interna), atingindo até 1080 graus, dependendo das condições anatômicas relacionadas (KAVOUSSI *et al.*, 2007). Para Sessions *et al.* (2003), em um estudo realizado com 186 pacientes operados com torção testicular, com idade entre 18 meses e 20 anos, a rotação interna ocorreu em 67%, enquanto que a rotação lateral (externa) ocorreu em 33% dos pacientes. Este mesmo autor refere não haver predileção pelo lado acometido, com frequência de 52% à esquerda e 48% à direita. Os testículos retirados (orquiectomizados) torceram, em média, 540 graus, enquanto que os testículos salvos (preservados) torceram, em média, 360 graus, mostrando uma relação direta de prognóstico associado ao grau de torção encontrado no intra-operatório, ou seja, quanto menor o grau de torção, maior a chance de preservação do órgão. Outra condição importante relacionada a taxa de salvamento do testículo torcido é o tempo, de modo que a isquemia pode ocorrer em apenas 4 horas após a torção, sendo inevitável em 24 horas (RINGDAHL *et al.*, 2006). Davenport (1996) estimou que a taxa de salvamento testicular foi de 90% quando a destorção ocorreu em menos de 6 horas do início dos sintomas, tempo também relatado por Turner *et al.* (2004) como aceito para preservação testicular. Esta taxa caiu para 50% após 12 horas e para 10% após 24 horas. Cornel *et al.* (1999) concluíram que a maioria dos testículos são salvos se o suprimento sanguíneo for restaurado dentro de 6 horas, enquanto que Sessions *et al.* (2003) observaram que a duração dos sintomas no momento da avaliação

médica foi de 0,5 h a 6 dias (média de 5 h) nos pacientes tratados com orquidopexia, e nos orquiectomizados a duração dos sintomas foi de 3h a 2 semanas (média de 2,2 dias).

### 2.2.3 Quadro Clínico

A manifestação clássica da torção aguda do cordão espermático é a dor escrotal de início agudo, embora em alguns casos a dor pode ter caráter mais gradual e em outros a dor pode ser mínima. Alguns meninos com dor escrotal aguda têm história de episódios prévios semelhantes, auto-limitados, caracterizando a torção intermitente. Sintomas vesicais são frequentemente ausentes (KNIGHT, VASSY, 1984; KAVOUSSI *et al*, 2007), e segundo Sessions *et al*. (2003), náuseas e vômitos podem ocorrer em 57% e 62% dos pacientes com diagnóstico de TCE tratados com orquiectomia e orquidopexia, respectivamente, e alguns pacientes referem dor no quadrante abdominal inferior ipsilateral.

A história é importante no diagnóstico diferencial de escroto agudo, mas o exame físico pode, talvez, ser mais importante e crucial no diagnóstico, o qual deve ser rápido e preciso, definindo se o paciente tem ou não indicação de exploração cirúrgica imediata. O atraso no diagnóstico e, subsequente, na cirurgia, põe em risco a viabilidade do testículo, enquanto que o super-diagnóstico sujeita o paciente a cirurgia desnecessária.

Inspeção da genitália pode mostrar elevação do testículo ou posição transversa do mesmo, sugerindo torção do cordão espermático ipsilateral. Se houver evolução de algumas horas, hidrocele aguda ou edema escrotal podem interferir na avaliação (SESSIONS *et al*, 2003; RINGDAHL *et al*, 2006; KAVOUSSI *et al*, 2007). A ausência do reflexo cremastérico é um bom indicador de torção do cordão espermático, encontrada em 100% dos casos segundo estudo realizado por Rabinowitz (1984), incluindo 245 pacientes e em 60% dos casos segundo Glabeke *et al*. (1999) num estudo com 543 pacientes. Este reflexo é considerado positivo quando o testículo move-se, pelo menos, 0,5 cm superiormente, após estimulação da raiz da coxa (RINGDAHL *et al*, 2006).

Outro sinal, descrito por Prehn em 1934, pode ser encontrado durante a avaliação, caracterizado pela persistência da dor após elevação manual do testículo suspeito (Prehn negativo). A destorção manual durante o exame físico pode ser tentada com movimento no sentido médio-lateral (rotação externa), se o diagnóstico

de torção parecer evidente, com exploração cirúrgica e orquidopexia subsequentes. Nestes casos, o alívio da dor é imediato, consequente ao retorno do fluxo sanguíneo (pelo menos parcialmente) ao testículo isquêmico (CORNEL *et al*, 1999).

#### 2.2.4 Diagnóstico Diferencial

No diagnóstico diferencial (QUADRO 1), principalmente com epidídimo-orquite, algumas características são importantes. Knight e Vassy (1984) citaram que alguns sinais apresentados em adolescentes ou adultos jovens sem sintomas urinários, associados ao quadro clínico de dor testicular aguda, são patognomônicos de TCE, incluindo elevação anormal do testículo afetado e a torção palpável no cordão, posição anormal do epidídimo na bolsa escrotal, eixo testicular anormal avaliado no paciente em posição ortostática, sendo a primeira a mais frequente. Ringdahl *et al.* (2006) cita alguns destes achados ao exame físico como sendo evidências fortes para o diagnóstico de torção testicular, reforçando ainda que a ausência do reflexo cremastérico é o achado mais sensível para o diagnóstico.

Epidídimo-orquite (mais conhecida como orquiepididimite) não é comum em meninos pré-púberes e púberes (exceto em portadores de malformações urinárias), de modo que sua presença obriga à investigação formal de uropatias. Orquite secundária a viroses, especialmente parotidite epidêmica, é uma possibilidade, com apresentação após 3-7 dias do início da doença. Ocorre em até 30% dos pacientes, sendo 20% bilateral e 30% com atrofia testicular na evolução. Iatrogenia e doenças sexualmente transmissíveis (DST) em adolescentes com vida sexual ativa devem ser consideradas. Nos casos de orquiepididimite o epidídimo é muito doloroso, por vezes, mais que o testículo, com sinal de Prehn positivo. A dor é mais insidiosa que na TCE. Edema e hiperemia escrotal, febre, disúria, piúria e alterações no exame de urina são frequentes. Ao Doppler há aumento do fluxo sanguíneo em testículo, epidídimo e bolsa escrotal. A cintilografia mostra acúmulo do radioisótopo na gônada. O tratamento é clínico, e consiste em antibiótico com espectro de cobertura para germes urinários (exceto em casos de orquite viral), repouso, anti-inflamatórios e elevação escrotal (SCOTT, 1956; JESUS, 2000).

Torção do apêndice testicular (i.d Hidátide de Morgani) deve ser aventada, principalmente em crianças entre 6 e 12 anos de idade, podendo cursar com nódulo sensível de 2 a 3 mm de diâmetro no pólo superior do testículo (às vezes palpável),

que pode ser visível e caracteriza o “sinal do ponto azul”. Estes pacientes raramente apresentam sintomas digestivos, contra 2/3 dos casos com TCE, e costumam ter reflexo cremastérico normal (JONES, 1961; JESUS, 2000; RINGDAHL *et al*, 2006).

Trauma é causa incomum de lesão do testículo pré-puberal, embora seja frequentemente relatado como justificativa. Pode ser causa de epididimite pós-traumática, hematomas, lacerações testiculares e hematocele. Em geral as consequências de trauma significativo são perceptíveis ao US. Na ausência de sinais ultrassonográficos de lesão, suspeitar fortemente de TCE, mesmo com história de trauma (JESUS, 2000; RINGDAHL *et al*, 2006; KAVOUSSI *et al*, 2007). Edema escrotal idiopático tem um quadro de desconforto escrotal leve, hiperemia e idade variável, testículos normais e indolores ao exame físico com regressão do quadro em 24h, acelerada pelo uso de corticóide ou anti-histamínico (por ter etiologia indeterminada, possivelmente processo alérgico). O diagnóstico diferencial pode ser difícil para processos alérgicos de etiologia determinada e processos infecciosos de partes mole localregionais (JESUS, 2000; KAVOUSSI *et al*, 2007).

Hidroceles costumam ter quadros mais insidiosos, e a transiluminação realizada durante o exame físico auxilia no diagnóstico. O ultrassom também é útil para identificação de conteúdo anecóico peritesticular, tomando-se cuidado com os quadros de hidrocele reacional conseqüentes a inflamações ou mesmo a TCE (KNIGH, VASSY, 1984; TANAGHO, MCANINCH, 2010).

Quando a TCE é extra-vaginal (em neonatos), tumefação visível e/ou palpável no canal inguinal, frequentemente ao nível do anel inguinal externo, coloca a possibilidade de hérnia inguinal encarcerada no diagnóstico diferencial, assim como cisto de cordão e tumor de testículo. A fixação contralateral é controversa, por causa da fisiopatologia da doença, que pressupõe processo de maturação espontâneo resolutivo com relação à doença de base, mas muitos autores optam pela orquidopexia, justificável pela baixa morbidade e necessidade imperiosa de proteger a gônada única restante de outras possíveis lesões, incluindo a TCE intravaginal futura (JESUS, 2000; TANAGHO, MCANINCH, 2010; KAVOUSSI *et al*, 2007).

<b>Diagnóstico Diferencial de Escroto Agudo/Sub-agudo</b>
Torção do cordão espermático
Torção do apêndice testicular
Torção do apêndice epididimário
Epididimite
Epidídimo-orquite
Hérnia inguinal
Hidrocele comunicante
Hidrocele
Hidrocele do cordão
Trauma
Lesões dermatológicas
Vasculite inflamatória (púrpura de Henoch-Schönlein)
Edema escrotal idiopático
Tumor
Espermatocoele
Varicocele
Patologia não-urogenital (tendinite do adutor)

QUADRO 1: Kavoussi *et al*, 2007

### 2.2.5 Exames Complementares

Quando o diagnóstico de torção parecer menos provável, pode-se solicitar exames complementares (desde que não atrase o procedimento cirúrgico) para confirmar a ausência de torção (RINGDAHL *et al*, 2006; KAVOUSSI *et al*, 2007). Para Jesus (2000), em face da urgência extrema do tratamento, exames complementares só são admitidos em caso de dúvida diagnóstica relevante, pacientes de risco cirúrgico-anestésico muito alto e exame disponível sem provocar atraso representativo; ou ainda para quadros muito protraídos.

Para Glabeke *et al.* (1999), o exame de urina não costuma estar alterado, e portanto não deve ser indicado de rotina. Para Jesus *et al.* (2000), deve ser indicado principalmente para diagnóstico diferencial com orquiepididimite, embora até 30% dos pacientes com TCE possam apresentar piúria.

Ultrassom para verificação de achados indiretos como hidrocele e edema do epidídimo pode ser interessante para ajudar no diagnóstico diferencial, apresentar complicações e fornecer critérios de viabilidade da gônada. Ultrassonograficamente, até 4-6h de lesão o testículo tem aspecto normal (recuperável); entre 6-24 h de lesão o testículo e epidídimo estão aumentados e hipoecóicos; e além de 24h de evolução, o testículo é heterogêneo (necrose) e há espessamento de tecidos

peritesticulares e hidrocele reacional. A longo prazo, o testículo apresenta-se diminuído (atrofia) e hipoecóico, com epidídimo hiperecogênico e uniforme (BECKER *et al*, 1997; JESUS, 2000). Kaye *et al*. (2008), avaliando retrospectivamente 79 pacientes tratados cirurgicamente para TCE, sendo que 55 deles foram submetidos a US com Doppler no pré-operatório que mostrou ausência de fluxo diastólico e/ou fluxo colorido ao Doppler, concluiu que a ecotextura homogênea ao US é preditivo de viabilidade testicular e, portanto, justifica exploração cirúrgica de emergência, enquanto que ecotextura heterogênea correlaciona-se a necrose, indicando testículos não viáveis (100% dos casos). Talvez, pacientes apresentando este último achado não são candidatos ao tratamento cirúrgico de emergência, mas sim à orquiectomia eletiva com orquidopexia contralateral.

Ultrassom com uso do Doppler foi um grande progresso, sendo útil para avaliar a presença de fluxo sanguíneo, com até 88,9% de sensibilidade e 98,9% de especificidade, com apenas 1% de resultados falso-positivos segundo Baker *et al*. (1995), enquanto que para Bentley *et al*. (2004), se instituída muita ênfase ao US com Doppler no auxílio ao diagnóstico, os pacientes com TCE e perfusão testicular preservada apresentam risco ao deixarem de ser tratados. Para Kalfa *et al*. (2004), o achado ultrassonográfico de TCE teve alta correlação com o diagnóstico de TCE, mostrando que mesmo nos casos em que o US Doppler foi duvidoso (até 30% dos casos), não detectando ausência de fluxo intratesticular, o US de alta definição (Power Doppler) pode dar o diagnóstico.

A cintilografia testicular, originalmente o exame padrão para escroto agudo, mostra diminuição ou ausência do radioisótopo no testículo e aumento da atividade peritesticular. Apresenta limitação relativa ao avaliar apenas o fluxo sanguíneo testicular, podendo resultar em falsos-positivos (detectação de fluxo em testículo torcido) em até 10% dos casos, não atingindo 100% de sensibilidade, implicando em sérias complicações médico-legais. Ainda mais, nem sempre está disponível, pode demandar muito tempo até que seja realizada, é limitada para testículos muito pequenos e pode ser de difícil execução em neonatos e crianças (GLABEKE *et al*, 1999; RINGDAHL, TEAGUE, 2006; KAVOUSSI *et al*, 2007).

Enquanto a destorção manual possa proporcionar a reperusão imediata do testículo, podendo ser realizada de acordo com o biotipo e as circunstâncias clínicas do paciente, obedecendo a variabilidade quanto ao sentido da torção (2/3

medial e 1/3 lateral), Sessions *et al.* (2003) concluiu que a mesma deve ser guiada pela resposta clínica do paciente e pelo retorno da anatomia normal ao exame físico, e que deve-se proceder à exploração cirúrgica apesar da melhora dos sintomas, pois 32% dos pacientes ficaram com torção residual em menor grau após a destorção imediata, ainda colocando em risco a viabilidade testicular.

### 2.2.6 Tratamento

Para Mansbach *et al.* (2005) são necessárias três considerações quando diante do diagnóstico de TCE: tempo de apresentação, diagnóstico rápido e intervenção curativa. Para Ringdahl *et al.* (2006), as principais causas de perda testicular após TCE são o atraso em procurar atenção médica (58%), diagnóstico inicial incorreto (29%) e atraso do tratamento em hospital de referência (13%).

Assim, quando indicada (na suspeita de torção testicular), a exploração cirúrgica deve ser imediata (SESSIONS *et al.*, 2003), com incisão escrotal longitudinal mediana para abordagem de ambos os testículos, ou então por incisão inguinal transversa bilateral, de modo que o testículo afetado seja primeiramente avaliado. O testículo deve ser destorcido para restabelecimento do fluxo sanguíneo e, se a viabilidade for duvidosa, deve-se colocá-lo em solução cristalóide aquecida durante alguns minutos. Os testículos necróticos devem ser removidos após ligadura proximal do cordão espermático. Testículos com viabilidade duvidosa mesmo após deixado em solução aquecida, devem ser fixados e preservados (KAVOUSSI *et al.*, 2007), embora haja chance de produção de auto-anticorpos com comprometimento do testículo contralateral. No entanto, isto ainda é controverso (ZANCHETTA, 1984; HADZISELIMOVIC *et al.*, 1998; SUKHOTNIK *et al.*, 2005). Para Kavoussi *et al.* (2007), a fixação do testículo deve ser preferencialmente pela técnica subdártica, porém alguns estudos mostram que a fixação utilizando pontos com fio não-absorvível através da túnica albugínea também é factível.

Quando encontrado o testículo torcido durante a cirurgia, a exploração do testículo contralateral é imperativa, e na maioria dos casos encontra-se o implante do testículo em “badalo de sino”. Nestes casos, a orquidopexia contra-lateral é indicada e deve ser feita para evitar subsequente torção (SPARKS, 1971; JONES, 1961; KAVOUSSI *et al.*, 2007). Sessions *et al.* (2003) refere que baseado nos achados intra-operatórios e na viabilidade aparente do testículo afetado, a

destorção do testículo com orquidopexia bilateral ou a orquiectomia com orquidopexia contralateral deve ser feita.

Segundo Sessions *et al.* (2003), um seguimento a longo prazo é necessário para avaliar a real incidência de atrofia (diferença de volume de pelo menos 15% em relação ao testículo contralateral), conseqüente ao manejo da torção testicular aguda. Este autor, avaliando 90 pacientes submetidos a orquidopexia, refere taxa de atrofia testicular de 12%, sendo que 73% destes pacientes tiveram exploração cirúrgica com tempo maior que 6 horas do início dos sintomas e 27% tempo menor que 5 horas. No seguimento, 62% tiveram diagnóstico de atrofia já na primeira consulta de retorno ambulatorial.

### **2.3 O Dano no Testículo Contra-lateral**

A apoptose é um fenômeno que ocorre regularmente no epitélio germinativo dos testículos contra-laterais à TCE. Especificamente, espermátócitos primários e secundários são predominantemente afetados. Espermatogônias, endotélio capilar, tecido conectivo e fibroblastos peritubulares são raramente envolvidos. Hipoteticamente, o trauma à barreira hematotesticular iniciado pela torção do cordão espermático induz à liberação de fatores ativadores da apoptose (citocinas), levando a extensa apoptose do epitélio germinativo do testículo contra-lateral. Por conseguinte, é provável que episódios repetitivos possam explicar a alta incidência de infertilidade nestes pacientes (HADZISELIMOVIC *et al.*, 1998).

Zanchetta *et al.* (1984) mostrou a identificação de anticorpos específicos contra células de Leydig e outras células de linhagem germinativa, por meio de imunofluorescência indireta, em pacientes estudados após TCE. Anderson e Williamson (1990) verificaram que apenas 9% dos pacientes têm anticorpo antiespermatozóide detectáveis seis meses após TCE, enquanto Hadziselimovic *et al.* (1998), verificou que em todos os testículos contralaterais à torção, as lesões foram importantes e a taxa de apoptose aumentada, concluindo que o epitélio germinativo dos testículos contra-laterais à TCE desenvolve extensa apoptose.

Entretanto, Arap *et al.* (2007), avaliando 2 grupos submetidos a orquidopexia bilateral e orquiectomia com orquidopexia unilateral, não verificou diferença significativa nos níveis de anticorpos antiespermatozoides entre os grupos em relação ao grupo controle. Concluiu ainda, que não houve correlação significativa

entre os níveis de anticorpos e a idade do paciente na torção, o tempo de isquemia, os parâmetros seminais, assim como com o tratamento aplicado.

Estes trabalhos, dentre outros, induziram várias controvérsias, tais como: há de fato uma lesão contralateral em episódios de TCE unilateral? Se existir, o que a determina? Há relação entre efeito lesivo e preservação do testículo torcido? Estas respostas têm sido pesquisadas, mas as dificuldades em analisar os vários estudos são consideráveis: os critérios quanto à presença de lesão (macroscopia ou microscopia), o tipo de lesão pesquisada (anatômica ou funcional) e a metodologia dos experimentos são variados.

Autoimunização, ocorrência incidental de outras patologias (tal como varicocele), episódios subclínicos de TCE contralateral e defeitos intrínsecos da espermatogênese têm sido propostos como fatores causais da lesão testicular contralateral, de modo que, embora pareça nítida uma redução da fertilidade em pacientes que sofreram TCE, não se tem uma opinião universalmente aceita em relação ao comprometimento do testículo contralateral (BARLAS; HATIBOGLU, 2002).

#### **2.4 O Fenômeno Isquemia-reperfusão**

Em situações de ausência de oxigênio inicia-se uma sequência de eventos químicos que provocam disfunção celular, edema celular e intersticial e, finalmente, morte celular. A célula, privada de seu combustível básico, passa a obter energia por meio do metabolismo anaeróbio, o que resulta em acidose láctica. O meio ácido é inadequado para a cinética fisiológica das enzimas, privando a célula dos seus mecanismos para manutenção da homeostase. As alterações celulares secundárias a hipóxia são bem documentadas; o sofrimento da membrana plasmática provoca alterações eletrolíticas, que acompanhadas pelas perdas dos mecanismos de produção de ATP levam à perda da capacidade de síntese celular. O cálcio provoca disfunção da membrana mitocondrial e lesão irreversível. Segue-se autólise secundária à isquemia (edema dos lisossomos, vacuolização do retículo endoplasmático, vazamento de enzimas e proteínas e descaracterização da compartimentalização celular), com perda da integridade das membranas e morte celular (EVORA *et al*, 1996; ANDRADE *et al*, 2004; CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

Embora a reperfusão seja essencial para a sobrevivência de tecidos isquêmicos, ela pode também gerar lesão celular adicional, que tem sido atribuída a

fatores inflamatórios e às EROs. Assim, a reperfusão tem duas conseqüências benéficas, que são a restauração da oferta de energia e a remoção dos metabólitos tóxicos. Entretanto, também pode causar graves conseqüências metabólicas e, talvez, maior lesão tecidual que a causada pela isquemia, pois acarreta efeitos sistêmicos subsequentes ao retorno de sangue com pH ácido e rico em potássio para a circulação. E embora o benefício da reperfusão precoce seja inquestionável, a reintrodução do oxigênio em um meio isquêmico inicia uma corrente complexa de eventos levando a lesões tissulares adicionais e a um acúmulo intracelular de cálcio (EVORA *et al*, 1996; ANTONUCCIO *et al*, 2006).

Durante a isquemia, a produção de ATP diminui em decorrência da queda na oferta de oxigênio. A concentração intracelular de cálcio diminui, causando conversão proteolítica de enzimas produtoras de radicais superóxidos. Durante a reperfusão, a oferta de oxigênio aumenta, levando à superprodução de ânions superóxido (pela xantinoxidase). Em adição, a isquemia ativa o sistema complemento e fatores quimiotáticos, que causam migração de leucócitos polimorfonucleares, que geram radicais superóxido na região isquêmica após a reperfusão. Isso promove peroxidação lipídica e lesão no tecido testicular.

Para Etensel *et al.* (2007), a principal causa do dano tecidual após torção do cordão espermático são as EROs, responsáveis por lesar o DNA, alterar a função proteica e a peroxidação de lipídeos. A oxidação lipídica pode ser considerada a conseqüência mais deletéria do fenômeno I/R, pois os peróxidos lipídicos rompem a membrana celular e causam alterações estruturais e funcionais nos testículos.

No entanto, o mecanismo pelo qual a reperfusão causa lesão celular permanece parcialmente desconhecido, oferecendo inúmeras e excitantes possibilidades de pesquisa, haja vista a grande variedade e complexidade dos fenômenos envolvidos na fisiopatologia da lesão por I/R (CAMPOS, YOSHIDA, 2004; ANDRADE *et al*, 2004).

#### 2.4.1 O Endotélio

O endotélio modula o tônus da musculatura lisa por meio da liberação de vários hormônios, que incluem metabólitos do ácido aracdônico, (prostaciclina, tromboxane, óxido nítrico e endotelinas). Também tomam papel na modulação da resposta o Fator de Agregação Plaquetária (PAF), o sistema complemento e as citocinas (TNF e IL). O endotélio modifica a resposta inflamatória por regular a

expressão de moléculas de aderência que ligam-se às integrinas dos leucócitos, para mediação da infiltração dessas células, além de ter papel significativo no transporte de lipídios, coagulação e reatividade imunológica. Em situações de isquemia e reperfusão, parece haver desequilíbrio do delicado balanço entre endotelinas e óxido nítrico. O endotélio é tecido extremamente sensível a lesão por I/R, situação em que perde a sua capacidade de gerar óxido nítrico, contribuindo para a lesão por I/R, em razão dos efeitos homeostáticos conhecidos do NO, incluindo manutenção do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária e da adesão dos neutrófilos e plaquetas ao endotélio vascular, além de efeito citotóxico para certos microorganismos e células tumorais (CAMPOS, YOSHIDA, 2004; MIRANDA *et al*, 2004).

#### 2.4.2 O Óxido Nítrico

Intimamente envolvido com a lesão por isquemia e reperfusão, o NO era inicialmente conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (posteriormente constatou-se que tratava-se do NO). Segundo Moncada *et al.* (1991) e Barlas e Hatiboglu (2002), o NO é produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios centrais, e sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), que é ativada pelo influxo de cálcio no interior da célula. Fisiologicamente, atua na neurotransmissão, manutenção do tônus da musculatura lisa vascular e na citotoxicidade (para certos microorganismos e células tumorais). O mecanismo fisiopatológico do NO também é evidente em uma variedade de doenças, incluindo choque séptico, asma, lesão por reperfusão, dentre outras.

Este último autor avaliou testículos de ratos submetidos à isquemia por 30 minutos, seguido por reperfusão por mais 30 minutos e orquiectomia bilateral. Os animais receberam, antes de iniciar a reperfusão, L-NANE ou L-arginina, sendo a primeira um antagonista do NO e a segunda um precursor de NO. Após, os testículos foram encaminhados para avaliação histopatológica e dosagem de malondialdeído, concluindo que a queda de NO no grupo que recebeu L-NANE teve impacto negativo na lesão I/R testicular, com achados histopatológicos severos e aumento dos níveis de MDA. Já no grupo que recebeu L-arginina, houve aumento dos níveis de NO, inibição da permeabilidade vascular, assim como da adesão leucocitária e agregação plaquetária.

A NOS é a enzima responsável pela produção do NO, expressa nos testículos sob a isoforma endotelial (eNOS), a qual é cálcio-dependente, e também sob a isoforma induzida (iNOS), a qual também é cálcio-dependente e é formada em tecidos expostos à citocinas inflamatórias ou isquemia. Nos testículos, a eNOS é expressa nas células de Leydig e Sertoli, espermátocitos e espermátides.

O papel metabólico do óxido nítrico em algumas células ainda é pouco conhecido. Muito do que se encontra na literatura diz respeito às várias isoformas de NOS que foram identificadas. No fígado, as células de Kupffer são capazes de produzir NO e estão claramente implicadas na lesão de I/R. O óxido nítrico pode desempenhar papel citotóxico ou citoprotetor para o fígado. Entre os efeitos citoprotetores está o seu papel como seqüestrador de radicais livres, aumento da síntese de DNA para o reparo de enzimas, bloqueio da liberação de prostaglandinas, diminuição do crescimento de células tumorais e, ainda, há evidências de que o NO tenha papel protetor na microcirculação hepática em casos de I/R, atenuando os efeitos da lesão no tecido hepático. Os seus efeitos citotóxicos estariam na sua propriedade de reagir com superóxidos para formar superóxidos nitrogenados extremamente reativos e que provocam inativação de canais de cálcio, inibição da respiração mitocondrial e nitrosação de moléculas de transdução e tirosina. O óxido nítrico também pode inibir a ativação do citocromo P450, diminuir a produção de proteínas de fase aguda e aumentar a peroxidação de lipídios. O NO, liberado em condições fisiológicas por células endoteliais, ainda tem um papel importante sobre a homeostase renal, pois participa da regulação normal do fluxo sanguíneo renal, da filtração glomerular e da excreção de sódio e água (ANDRADE *et al*, 2004).

#### 2.4.3 Os Radicais Livres

O termo radical livre designa qualquer átomo ou molécula que tenha em sua órbita mais externa um ou mais elétrons não pareados, sendo que estes ocupam um orbital atômico ou molecular isoladamente. Isto proporciona alta reatividade destes átomos e moléculas, devido à forte tendência a doar ou receber elétrons. Em condições normais os radicais livres são continuamente produzidos em pequenas quantidades como subprodutos metabólicos ou escapes da fosforilação oxidativa. Estes radicais são naturalmente neutralizados por um sistema endógeno de defesa

antioxidante, enzimático e não-enzimático, o qual serve para prevenir ou reparar a lesão oxidativa (MIRANDA, 2004; CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

O radical superóxido é formado quando o oxigênio sofre redução univalente, e seus efeitos deletérios vêm da habilidade deste em gerar radicais secundários extremamente tóxicos, como o radical hidroxila (OH). O radical hidroxiperoxil ( $\text{HO}_2$ ) é a forma protonada do radical superóxido, isto é, possui o próton hidrogênio, o qual não tem mais facilidade que o superóxido em iniciar a destruição de membranas biológicas. Já o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), apesar de não ser um radical livre (pois não tem elétrons desemparelhados na última camada), é importante porque participa das reações que produzem o radical OH. Tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro. Por esse motivo, há uma tendência atual de se chamar de “espécies reativas de oxigênio”, ao invés de radicais livres de oxigênio, o conjunto de substâncias envolvidas nessas reações (CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

Muitos estudos têm responsabilizado o radical livre derivado do oxigênio (RLO ou EROs) como o mediador das lesões causadas por isquemia e reperfusão nos tecidos (MIRANDA, 2004). Durante a lesão por I/R radicais livres são produzidos. Estes radicais livres são reativos e de vida curta, e podem ser detectados diretamente apenas com ressonância (por spin de elétrons), uma técnica de difícil aplicabilidade e com mecanismo biológico complexo. Por causa desta dificuldade, a atividade dos radicais livres tem frequentemente sido avaliada indiretamente pela determinação do consumo de antioxidantes ou medindo-se os produtos da lesão consequentes da interação com moléculas biologicamente complexas, tais como proteínas, carboidratos ou lipídeos.

O efeito mais lesivo dos radicais livres é a peroxidação lipídica da membrana. Esse é um fenômeno complexo, iniciado pela abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno posicionado entre duas bandas insaturadas na molécula lipídica com carbono central, que na presença de oxigênio resulta em peróxidos lipídicos e lipoperóxidos. A metabolização posterior desses produtos gera o malondialdeído (dialdeído malônico), que pode ser dosado utilizando-se a espectrofotometria de malondialdeído seguido por reação com ácido tiobarbitúrico, indicando indiretamente o grau de peroxidação (KEHINDE *et al*, 2003; CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

Saba *et al.* (1997) relatou que o dano testicular devido à torção e destorção do cordão espermático é semelhante ao fenômeno de I/R observado em outros tecidos, sendo relacionado às EROs, tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que ocorrem no momento da reperfusão e excedem a capacidade antioxidante das células. Em um trabalho realizado em modelo animal com ratos para avaliar a atuação das EROS em testículos submetidos à TCE, por meio de tempo de isquemia e reperfusão progressivos, o autor pode confirmar as alterações morfológicas citadas por outros autores. Porém, a dosagem alterada da atividade das substâncias reativas do ácido barbitúrico, atividade de superóxido-dismutase e catalase foram o achado mais relevante (inclusive nos testículos contra-laterais).

## **2.5 As Drogas Antioxidantes e a N-Acetilcisteína**

A superprodução de EROs (incluindo os radicais superóxidos), que tem sido associada à lesão por I/R em vários órgãos, inclusive nos testículos, tornou-se o maior alvo dos estudos atuais. As drogas e os mecanismos farmacológicos que inibam ou atenuem o estresse oxidativo na lesão durante a reperfusão são diversos, porém esses estudos ainda não sinalizam para agentes específicos e eficazes, sendo que a síndrome I/R envolve mecanismos de lesão de etiologia multifatorial, e que a interferência em algum eixo envolvido em sua cascata de eventos poderá ser útil para amenizá-la. Em condições normais, os radicais livres são continuamente produzidos em pequenas quantidades, como subprodutos metabólicos ou escapes da fosforilação oxidativa. Estes radicais são naturalmente neutralizados. Dentre os principais antioxidantes preventivos estão a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px). Dentre os reparadores estão a glutathiona-redutase (GSH-Rd), a glutathiona peroxidase e o ácido ascórbico (CAMPOS, YOSHIDA, 2004).

As investigações referentes às manobras farmacológicas que atenuem a onda de lesão durante a reperfusão são múltiplas, o que pressupõe que a interferência em um dos ramos do dano talvez possa representar estratégia promissora, porém possivelmente não será eficaz o suficiente durante todo o período de disfunção tecidual (ANDRADE *et al.*, 2004).

O propofol, um agente anestésico intravenoso, tem mostrado atividade antioxidante em diversos tecidos. Ünsal *et al.* (2004) mostrou que seu uso em ratos

submetidos a TCE favoreceu à queda dos níveis de catalase e evitou o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), enzima utilizada para mensurar a peroxidação lipídica (causada pela reação entre EROs e lipídeos de membrana celular após destorção do cordão espermático), atenuando os efeitos degenerativos da reperfusão.

O alopurinol foi utilizado por alguns estudiosos, com resultados controversos na literatura. Silva *et al.* (2005) mostrou que seu uso em ratos submetidos a TCE, seguido de reperfusão após 1 hora, não protegeu as gônadas dos efeitos de I/R, enquanto que Kehinde *et al.* (2005) mostrou efeito protetor com uso de alopurinol em coelhos submetidos a torção do cordão espermático, seguida de reperfusão após 1 hora, por meio da mensuração dos níveis de malondialdeído 3 meses após, que apresentou-se significativamente reduzida no grupo tratado com alopurinol (em relação ao grupo controle e aos grupos que receberam outras drogas como ácido acetil salicílico e ácido ascórbico), demonstrando efeito protetor para os testículos a longo prazo.

O selênio foi utilizado por Avlan *et al.* (2005) em estudo com ratos submetidos a TCE durante 4 horas, seguido por destorção e administração da droga via intra-peritoneal. Após mais 4 horas realizou-se orquiectomia bilateral com avaliação histológica dos testículos e mensuração dos níveis teciduais de malondialdeído e da atividade de superóxido dismutase, de modo que o selênio mostrou efeito protetor no grupo avaliado, com melhora nos padrões histológicos, redução dos níveis de malondialdeído e aumento da atividade de superóxido dismutase (em ambos os testículos).

O diclofenaco de sódio (um anti-inflamatório não-esteroidal) foi avaliado por Mogilner *et al.* (2006) em modelo animal (ratos) de I/R testicular, mostrando que o tratamento com diclofenaco não alterou os parâmetros histológicos, tanto no testículo isquêmico quanto no contralateral. Porém diminuiu a apoptose de células germinativas em ambos os testículos após I/R, podendo ter benefício na espermatogênese após TCE.

O dexpantenol, um álcool biologicamente ativo do ácido pantotênico, é convertido em ácido pantotênico nos tecidos, o qual aumenta os níveis de glutathione (GSH), coenzima A e síntese de ATP nas células. A GSH e as peroxidases dependentes de glutathione são os maiores sistemas de defesa contra o estresse oxidativo, sendo que nos testículos predomina a GPX-4 (a qual aumenta e parece

ativa apenas após a puberdade). Sendo assim, Etensel *et al.* (2007), mostrou em modelo animal (ratos pós-pubescentes) de I/R testicular, que o uso de dexpanthenol foi benéfico, melhorando os padrões histológicos (diâmetro dos túbulos seminíferos e escore de biópsia testicular) 60 dias após torção/destorção do cordão espermático, e preservando o peso e o volume testicular do grupo avaliado.

Pekcetin *et al.* (2007), mostrou que a trimetazidina teve efeito protetor em testículos de ratos submetidos a I/R, após torção e destorção do cordão espermático, por meio de avaliação enzimática e histológica.

Gokce *et al.* (2008) estudou em modelo animal (ratos) o efeito do lisinopril (inibidor da enzima conversora da angiotensina) e do losartan (antagonista do receptor tipo1 da angiotensina II) em testículos submetidos a I/R, de modo que o dano tubular e na apoptose dos testículos contra-laterais à torção foram reduzidos. O provável benefício dessas drogas origina-se da inibição do processo isquêmico resultante da atividade simpática aumentada e eliminação do dano subsequente à desregulação do sistema renina-angiotensina. Estes resultados sugerem que essas drogas podem ter um valor potencial em pacientes com TCE unilateral.

Os inibidores da 5-fosfodiesterase (PDE-i), difundidos no tratamento da disfunção erétil e com potente efeito vasodilatador, foram avaliados por Üstün *et al.* (2008), que realizaram um estudo em ratos que receberam Sildenafil e Vardenafila durante 30 dias, e pós submetidos à TCE pelo período de 1 hora, seguido por reperfusão durante 2 horas e orquiectomia. Os resultados mostraram testículos contra-laterais inalterados, níveis aumentados de células apoptóticas, de eNOS e de iNOS no testículo ipsilateral do grupo I/R que recebeu solução salina, e níveis significativamente aumentados de células apoptóticas, eNOS e iNOS no testículo ipsilateral dos grupos que receberam Sildenafil e Vardenafila, significando apoptose testicular exagerada após I/R nos animais tratados com iPDE-5.

Outra medicação que mostrou benefício em testículos de ratos submetidos à I/R é a eritropoetina, uma glicoproteína que estimula a produção de eritrócitos de seus precursores, sendo utilizada no tratamento das anemias. Evidências experimentais demonstram que esta substância tem efeito em outros tecidos, regulam a produção de NO e aumentam a neovascularização. Em estudo realizado por Köseoglu *et al.* (2009) por meio de avaliação histológica após orquiectomia de testículos expostos a 4 horas de isquemia seguido por mais 4 horas de reperfusão, os animais que receberam 1000UI/Kg (logo antes da reperfusão e 3 vezes por

semana, durante 4 semanas), tiveram maior preservação na morfologia e menor porcentagem de necrose dos túbulos seminíferos, com redução no dano histológico testicular.

Para Bozlu *et al.* (2009), que avaliou o efeito do trapidil (inibidor da fosfodiesterase de amplo espectro farmacológico, utilizado como droga antianginosa e antiagregante plaquetário) em testículos de ratos submetidos à I/R, com período de torção de 2 horas, seguido por reperfusão e orquiectomia após 60 dias, esta mostrou efeito protetor a longo prazo no que se refere aos parâmetros histológicos tais como: diâmetro dos túbulos seminíferos e espessura da membrana epitelial das células germinativas.

A NAC, o precursor acetilado do aminoácido L-cisteína, é um potente antioxidante que estabiliza a molécula de NO e exerce efeito antioxidante atuando na biossíntese da glutatona, enzima necessária para a sobrevivência celular. Esse mecanismo da NAC foi descoberto há cerca de 30 anos, envolvendo estudos que mostraram sua atuação sobre radicais livres por meio da GSH, e a facilidade de sua molécula em penetrar no interior das células. Hoje tem utilidade como antídoto do acetaminofeno (paracetamol), em pacientes com intoxicação, ou seja, que fizeram ingestão de mais de 4g de paracetamol (adultos). É administrado na dose de 150 mg/Kg, associado às medidas não medicamentosas .

O efeito protetor da NAC na peroxidação lipídica tem sido relatado em muitos trabalhos envolvendo I/R em outros tecidos, como substrato da síntese de GSH ou associado ao seqüestro direto de radicais livres (CUZZOCRE *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2004; ALI ÇAY *et al.*, 2006). Ela age diretamente na limpeza dos radicais livres, nas reações com peróxido de hidrogênio e de catalização. Ainda exerce efeito antiinflamatório, prevenindo a indução de citocinas pró-inflamatórias, e inibe a apoptose em diferentes modelos experimentais, (PORTELLA *et al.*, 2004; PAYABVASH *et al.*, 2007).

Poucos trabalhos avaliaram a NAC relacionada a I/R testicular, sendo que essa droga foi melhor avaliada em modelos de I/R de outros órgãos. Portella *et al.* (2004), relataram efeito protetor da NAC na lesão hepática por reperfusão após choque hemorrágico em modelo experimental, verificando diminuição da atividade das transaminases e de LDH, através de mecanismos como: reação com o peróxido de hidrogênio, diminuindo a produção de hidroxilas altamente reativas e aumento da

GSH citoplasmática, a qual é o maior mecanismo de defesa intra e extracelular contra as EROs.

Andrade *et al.* (2004), avaliou a ação da NAC em rins ratos submetidos a isquemia por meio do clampeamento bilateral dos pedículos renais, distribuídos em grupos que receberam NAC (150mg/Kg; i.p), Alopurinol (50mg/Kg; VO) ou ambas as drogas, antes do clampeamento. Neste estudo, o tratamento com N-acetilcisteína determinou melhora da função renal de ratos com Insuficiência Renal Aguda isquêmica (IRAI), à semelhança do que foi observado para o Alopurinol, considerando-se o *clearance* de creatinina como marcador biológico. Por outro lado, quando as drogas foram dadas simultaneamente, o efeito protetor foi potencializado. O tratamento com os antioxidantes NAC e Alo, permitiu ainda, que a função renal de ratos em IRAI fosse semelhante à dos animais controle, sugerindo a quase normalização da função dos animais tratados preventivamente com aquelas drogas.

Ali Çay *et al.* (2006), Payabvash *et al.* (2007) e Aktas *et al.* (2010), avaliaram a NAC em modelos de I/R semelhantes em testículos de ratos, com seus resultados comentados adiante (na discussão).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Estudar o efeito da N-Acetilcisteína em testículos de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia-reperfusão por meio da torção do cordão espermático.

#### **3.2 Específicos**

- Estudo morfo-histológico de testículos de ratos submetidos a torção do cordão espermático seguida de perfusão, sob ação da N-Acetilcisteína.

- Estudo morfo-histológico dos testículos contralaterais àqueles submetidos à torção do cordão espermático, sob ação da N-Acetilcisteína.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Amostra

Foram utilizados 48 ratos normais da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pesando entre 200-300g, com idade entre 60 e 120 dias, distribuídos em quatro grupos com doze animais cada (FIGURA 1). Os animais passaram por um período de adaptação de cinco dias no Laboratório de Cirurgia Experimental da UFMS, antes de serem submetidos ao procedimento. Foram alojados em gaiolas de plástico (40x20x10cm), quatro animais por gaiola, e receberam ração granulada própria para a espécie (Nuvilab®, Nuvital Nutrientes Prod. Vet. LTDA - Curitiba - PR) e água à vontade. Permaneceram em ambiente controlado, em ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura estável ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), mantida por ar condicionado. Os dejetos e as caixas dos animais foram substituídos a cada 48 horas.

**GI (Grupo I):** Grupo Isquemia/Reperusão

**GII (Grupo II):** Grupo Isquemia/Reperusão + N-acetilcisteína

**GIII (Grupo III):** Grupo Controle

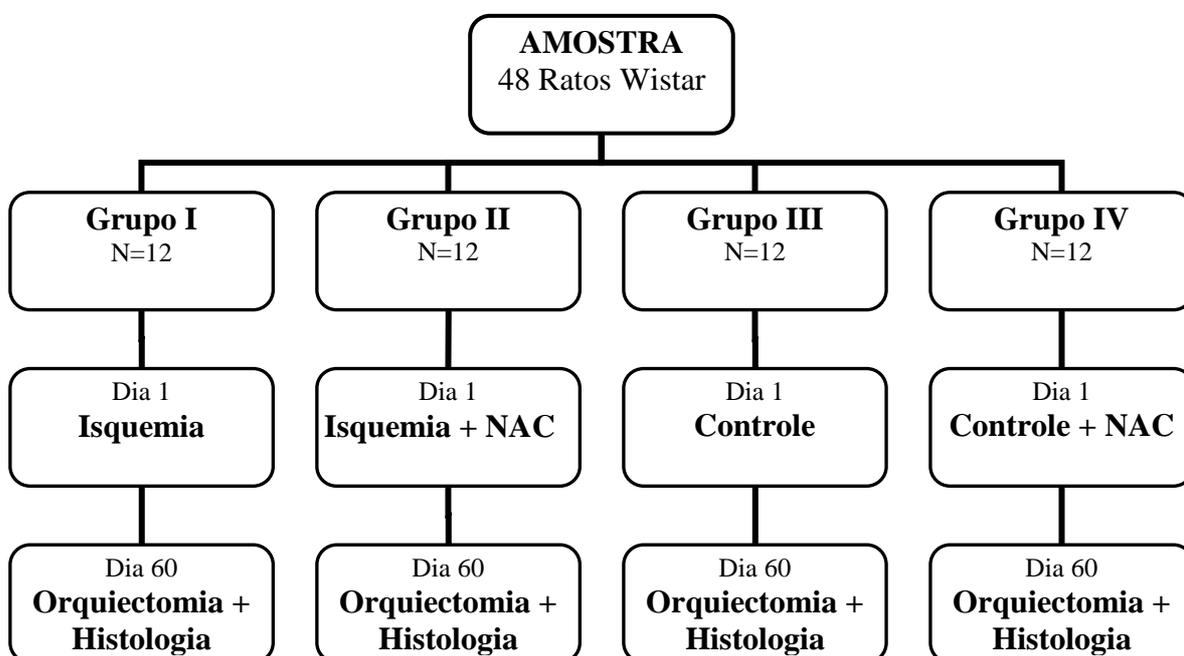
**GIV (Grupo IV):** Grupo Controle + N-acetilcisteína

**Grupo I:** grupo Isquemia: o testículo direito foi exteriorizado e o cordão espermático torcido à  $720^{\circ}$ , no sentido horário (interno) e mantido dessa forma em recipiente com solução salina à 0,9%, em temperatura ambiente, pelo período de 1 hora, quando o cordão foi destorcido e o testículo reposicionado no escroto. Realizada sutura da incisão com pontos contínuos, plano único.

**Grupo II:** grupo Isquemia + NAC: o mesmo procedimento feito no GI foi aplicado neste grupo, porém, quinze minutos antes de destorcer o cordão espermático e reposicionar o testículo, foi injetado NAC, na dose de 150mg/Kg de peso, via intraperitoneal (I.P).

**Grupo III:** grupo Controle: o testículo direito foi exteriorizado e colocado em solução salina 0,9%, em temperatura ambiente por 1 hora. Após, o testículo foi reposicionado no escroto e a incisão suturada com pontos contínuos, plano único. Esses animais não receberam a droga (NAC).

**Grupo IV:** grupo Controle + NAC: o mesmo procedimento feito no GIII foi aplicado neste grupo, porém, quinze minutos antes de reposicionar o testículo foi injetado NAC, na dose de 150mg/kg de peso, I.P.



**Figura 1** – Representação esquemática do desenho do estudo

## 4.2 Procedimentos

O Projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), recebendo o número 188/2008.

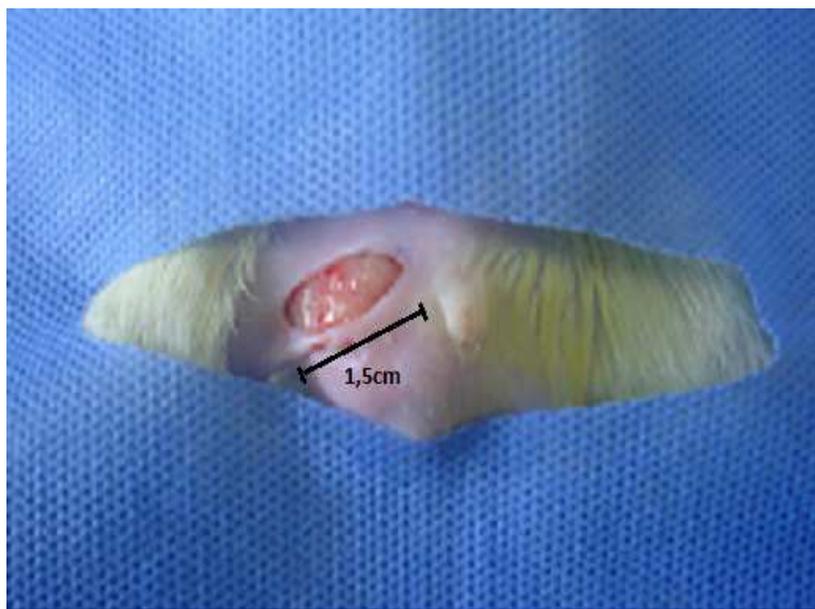
O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As cirurgias foram agendadas no laboratório e realizadas com auxílio da técnica e sob supervisão da médica veterinária. Cada animal foi pesado em balança de precisão (*Precision*®, PR 1000 Núcleo) e identificado por meio de tatuagem na

cauda, tendo seus dados anotados em planilha. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/kg, Laboratório *Fort Godge*, USA) e cloridrato de xylazina (10mg/kg, Laboratório *Burs Veterinary Supply*, USA), por meio de injeção intramuscular na face lateral da coxa esquerda dos ratos (BARLAS, HATIBOGLU, 2002; BOZLU *et al*, 2009; ROMERO *et al*, 2009).

Após a obtenção do plano anestésico, procedeu-se a raspagem dos pêlos da região inguinal direita (RID) com lâmina de barbear. Os animais foram posicionados em prancha cirúrgica (30x35cm), em decúbito dorsal, e fixados por meio de tensores elásticos (Figura 2B). Realizou-se a antissepsia da região, com gaze embebida em solução aquosa de clorexidina a 1%, colocação de campo estéril fenestrado e subsequente inguinotomia direita (Figura 2A). Durante a realização dos procedimentos a equipe cirúrgica utilizou avental cirúrgico, máscara, gorro e luvas estéreis.

A)



B)



**Figura 2** – Fotografias demonstrando o ato operatório. A) Incisão cirúrgica de 1,5 cm, oblíqua, em região inguinal direita. B) Animal posicionado com tensores elásticos e tricotomia da região inguinal.

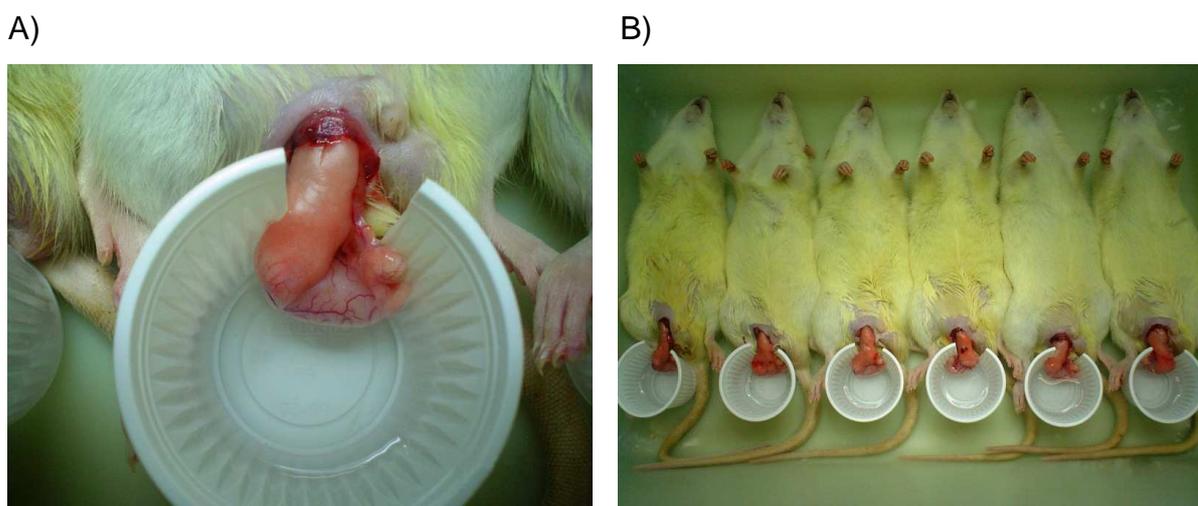
A via de acesso foi por incisão oblíqua de aproximadamente 1,5 cm, em região inguinal direita, com bisturi de lâmina 15 e cabo número 3, com abertura por planos interessando a pele e tecido celular subcutâneo, com visualização do cordão espermático. Este foi dissecado e isolado utilizando-se pinça anatômica tipo Adson sem dente, pinça tipo Kelly curva (mosquito) e tesoura de Metzenbaum curva, prosseguindo-se inferiormente até a exposição do testículo direito (Figura 3).

No Grupo I (I/R) o testículo direito foi exteriorizado e o cordão espermático torcido manualmente com duas voltas em torno do seu próprio eixo (720°), no sentido horário, e mantido dessa forma em recipiente com 10ml de solução salina à 0,9% (soro fisiológico), em temperatura ambiente, pelo período de 1 hora. No Grupo II (Isquemia + NAC), foi aplicado o mesmo procedimento feito no GI, porém, quinze minutos antes de destorcer o cordão espermático e reposicionar o testículo, foi injetado NAC, na dose de 150mg/Kg de peso, via I.P. No Grupo III (Controle), o testículo direito foi exteriorizado e colocado em solução salina 0,9%, sem torção, em temperatura ambiente por 1 hora (Figura 3). No Grupo IV (Controle + NAC), foi aplicado o mesmo procedimento feito em GIII, porém, quinze minutos antes de reposicionar o testículo, foi injetado NAC, na dose de 150mg/kg de peso, I.P. Após 60 minutos, o TD foi recolocado na hemibolsa direita, e a síntese da ferida realizada com pontos contínuos, em plano único, com fio de nylon 3-0, ethicon.



**Figura 3** – Fotografia ilustrando Testículo e cordão espermático direito exteriorizado por meio de inguilotomia.

Com o término do procedimento, os animais foram acondicionados nas gaiolas e reavaliados a cada oito horas, nas primeiras 24 h de pós-operatório. O seguimento pós-cirúrgico foi diário na primeira semana, a cada dois dias na segunda semana, e depois, semanalmente até o 60º dia de pós-operatório. Constatou-se infecção da ferida operatória em um animal do GIV e dois animais foram a óbito na primeira semana de pós-operatório, sendo um do GIII e outro do GIV.



**Figura 4** – Fotografias mostrando o procedimento cirúrgico. A) Testículo direito exteriorizado e embebido em solução salina (SF 0,9%) a temperatura ambiente (grupo III). B) Testículos direitos expostos e torcidos, embebidos em solução salina (SF 0,9%) a temperatura ambiente (grupo I).

Após 60 dias, iniciou-se a segunda fase do experimento. Os animais foram novamente anestesiados e submetidos a incisão longitudinal de 2,0 cm, em região escrotal mediana, utilizando-se o mesmo material de pequena cirurgia citado para o procedimento cirúrgico inicial. A castração (orquiectomia bilateral), foi realizada por ligadura proximal do cordão espermático 1,0 cm acima do testículo e epidídimo, após clampeamento com pinça Kelly e ligadura do cordão espermático com fio de algodão 2-0, sem agulha, ethicon.

Efetuada identificação dos testículos, os quais foram colocados em frascos separados e fixados em líquido de *Bouin* durante 1 hora, seguido por acondicionamento em solução de formol a 10% até o preparo das lâminas.

Os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, ainda sob efeito anestésico, e o material foi encaminhado ao Laboratório de Anatomia

Patológica e Citopatologia (LAC) de Campo Grande – MS, para estudo histológico com coloração em hematoxilina e eosina.

Observou-se abscesso paratesticular em um rato do GIV, sendo este descartado da amostra.

### **4.3 Estudo Histológico**

Os testículos (direitos e esquerdos) foram fixados em solução de *Bouin* e preservados em formol a 10%. Após, foram seccionados longitudinalmente em um plano sagital, e incluídos em parafina e cortados com micrótomo - com 5 µm de espessura. De cada peça anatômica foi obtida uma lâmina, corada com hematoxilina e eosina (HE). A secção histológica de cada lâmina foi examinada, por inteiro, pelo mesmo patologista, sem conhecimento de que grupo pertenciam as peças. Uma escala de graduação proposta por Cosentino *et al.* (1985), e utilizada em diversos trabalhos como citado por Cosentino *et al.* (1986), Avlan *et al.* (2005), Ali Çay *et al.* (2006) e Gezici *et al.* (2006), foi utilizada para análise histológica (anexo F). Esta estratifica 4 graus de lesão, sendo grau 1 definido como arquitetura testicular normal e arranjo ordenado das células germinativas; grau 2 definida como arquitetura menos ordenada, não coesão das células germinativas e túbulos seminíferos fechados; grau 3 definida como desordem arquitetural maior e células germinativas com núcleo pinótico e retraído, e bordas dos túbulos seminíferos mal definidas; e grau 4 definida por túbulos seminíferos ocluídos e necrose coagulativa das células germinativas (ANEXO F). Em cada lâmina examinada, foi identificada a porcentagem de tecido por grau (1 a 4), por exemplo: lâmina 100% = 40% de grau 1 e 60% grau 2. As porcentagens foram multiplicadas pelos graus (40 X 1) + (60 x 2), e, neste caso, o escore seria 160. Isto possibilitou uma graduação numérica, com resultados de escores compreendidos entre 100 (100% de grau 1, tecido sadio) e 400 (100% de grau 4, maior acometimento tecidual).

#### **4.4 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *BioEstat* versão 5.0. Para comparação entre os grupos I, II, III e IV (amostras independentes) foram utilizados os testes Análise de variância (ANOVA) e Kruskal Wallis, seguido do teste de Student Newman Keuls. Para comparação dos testículos direito e esquerdo (amostras pareadas) foi empregado o Teste de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

Tabela 1 – Análise estatística do peso (g) médio dos animais, no primeiro dia do estudo.

Grupos	Média	Desvio padrão	$p$
I	272,3	13,9	0,638
II	269,6	8,6	
III	267,8	10,1	
IV	267,1	6,7	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Análise de Variância para amostras independentes.

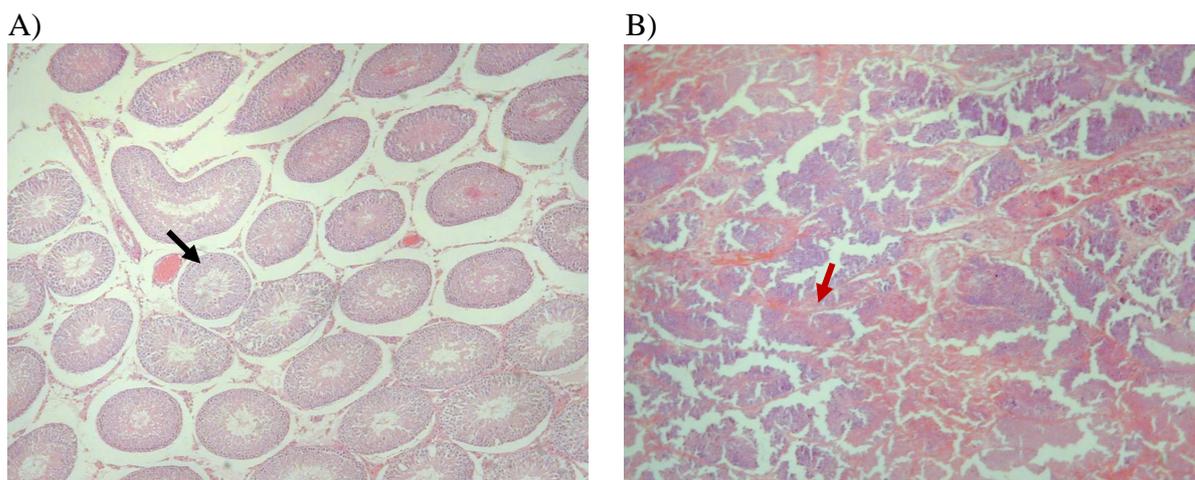
Tabela 2 – Análise estatística dos escores da avaliação histológica inter-grupos (I x II x III x IV) e intra-grupo (testículos direito x esquerdo).

Testículos	Grupos								$p^{(2)}$
	I		II		III		IV		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Direito	277,5	59,3	232,5	54,8	127,7	27,7	144,5	33,0	<0,001 I>II>(III=IV) 0,023 (I=II)>(III=IV)
Esquerdo	135,0	22,8	122,5	20,9	110,0	0,0	111,0	5,7	
$p^{(1)}$	0,003 (D>E)		0,002 (D>E)		0,028 (D>E)		0,013 (D>E)		-

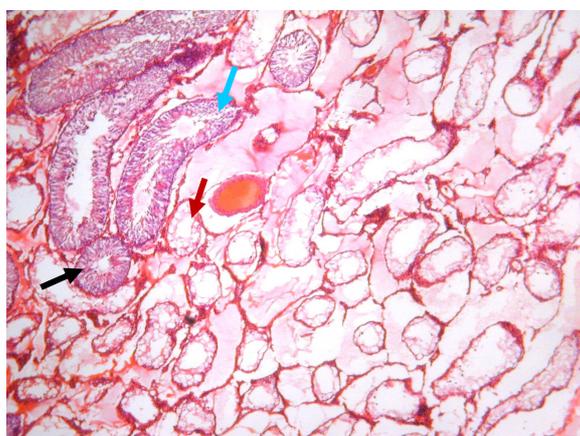
Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa.

<sup>(1)</sup> Teste de Wilcoxon (amostras pareadas).

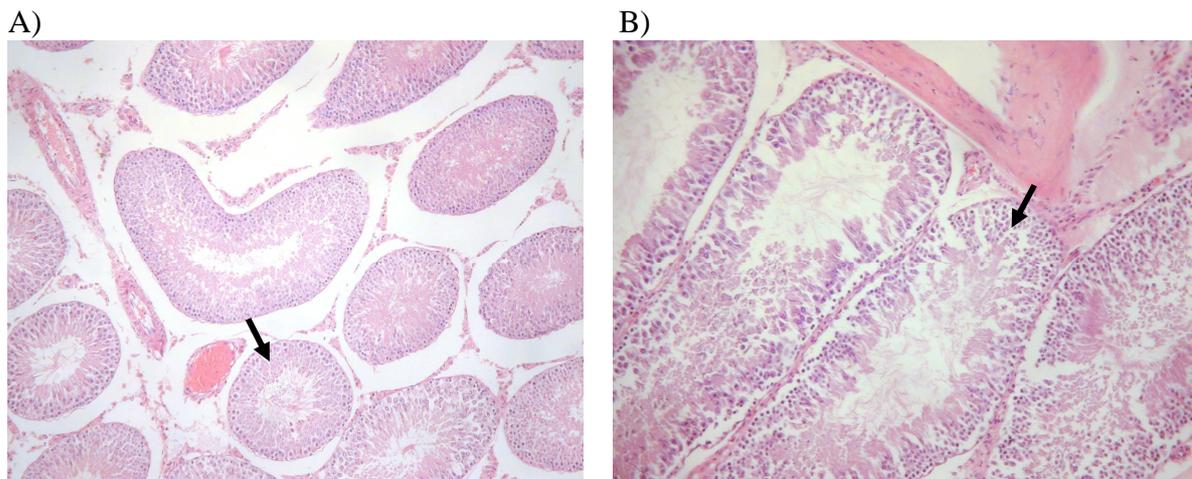
<sup>(2)</sup> Kruskal Wallis seguido de Student Newman Keuls (amostras independentes).



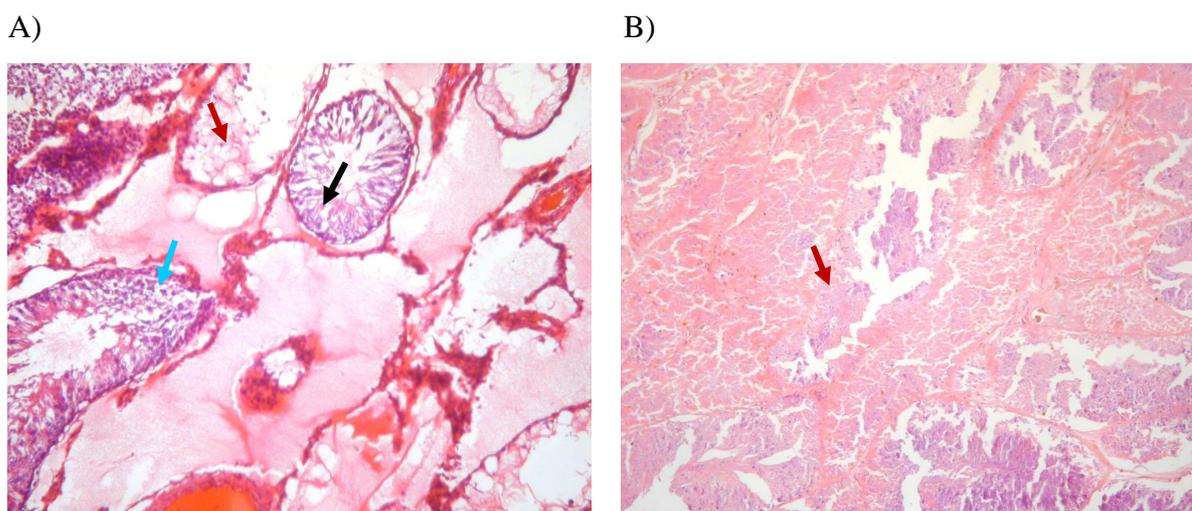
**Figura 5** - Fotomicrografias mostrando túbulos seminíferos em aumento de 40x, grupo II. Em (A), histologia testicular preservada (seta em preto), correspondendo ao grau 1, e em (B) túbulos seminíferos ocluídos e com necrose coagulativa das células germinativas (seta em vermelho), correspondendo ao grau 4.



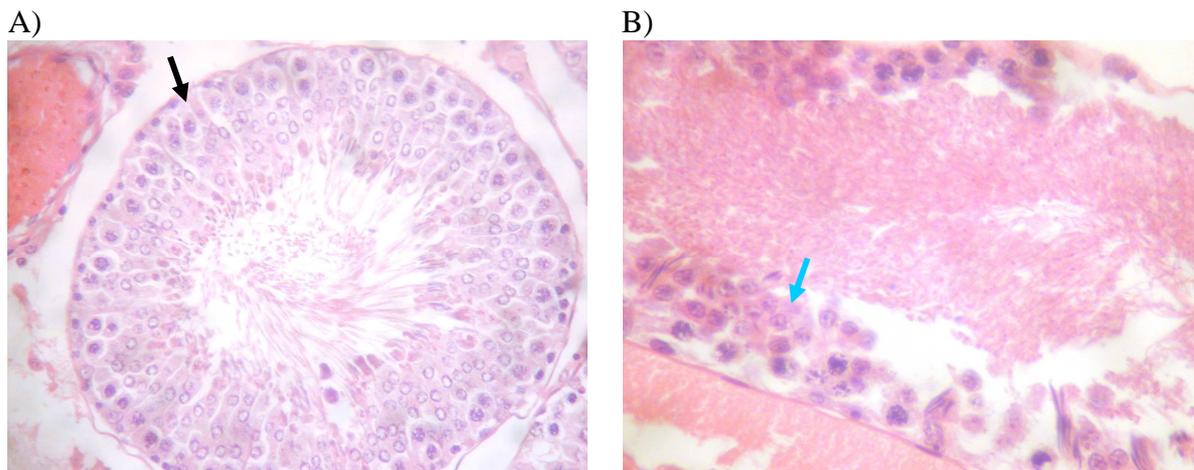
**Figura 6** - Fotomicrografia mostrando túbulos seminíferos em aumento de 40x, grupo I. Pequeno desarranjo da arquitetura celular com células menos ordenadas e túbulos seminíferos compactados (seta em preto), grande desarranjo da arquitetura celular e bordas mal definidas (seta em azul), e túbulos seminíferos ocluídos com necrose coagulativa das células germinativas, correspondendo aos graus 2, 3 e 4 respectivamente.



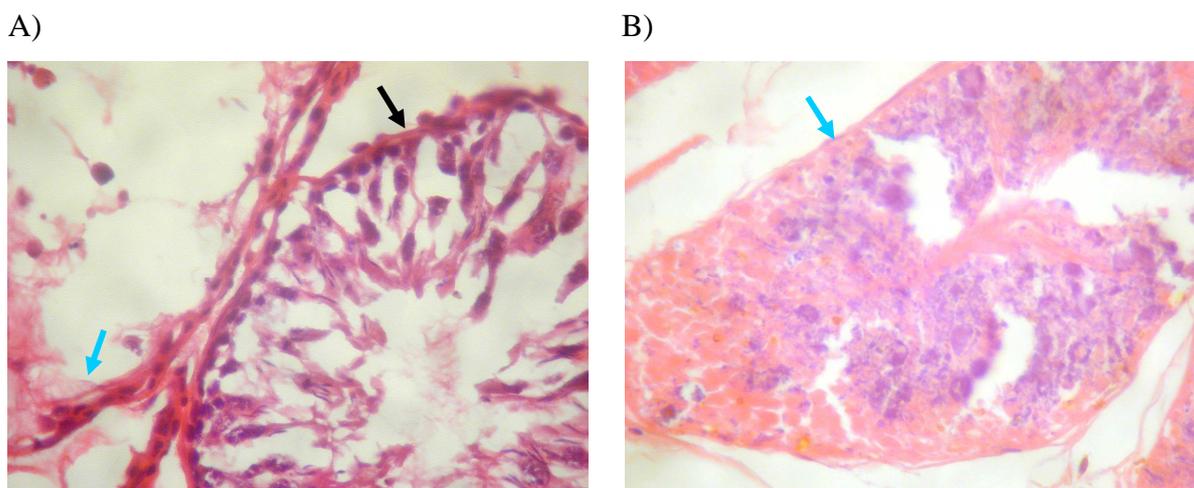
**Figura 7** – Fotomicrografias mostrando em (A) e (B) túbulos seminíferos em aumento de 100x, grupo II. Em (A) mostra-se histologia testicular preservada (seta em preto), e (B) pequeno desarranjo celular (seta em preto), correspondendo respectivamente, aos graus 1 e 2.



**Figura 8** – Fotomicrografias mostrando túbulos seminíferos em aumento de 100x, grupo I. Em (A) pequeno desarranjo celular (seta em preto), grande desarranjo da arquitetura celular e bordas mal definidas, com núcleo retraído (seta em azul), e necrose coagulativa das células germinativas (seta em vermelho), correspondendo respectivamente aos graus 2, 3 e 4. Em (B) necrose coagulativa das células germinativas (seta em vermelho), grau 4.



**Figura 9** – Fotomicrografias mostrando túbulos seminíferos em aumento de 400x, grupo II. Em (A), histologia testicular preservada (seta em preto), correspondendo ao grau 1, e em (B) grande desarranjo da arquitetura celular, bordas mal definidas e núcleo retraído (seta em azul), correspondendo ao grau III.



**Figura 10** – Fotomicrografias mostrando túbulos seminíferos em aumento de 400x, grupo I. Em (A), pequeno desarranjo da arquitetura celular com células menos ordenadas e túbulos seminíferos compactados (seta em preto) e necrose coagulativa das células germinativas (seta em azul), correspondendo respectivamente aos graus 2 e 4. Em (B) necrose coagulativa das células germinativas, correspondendo ao grau 4 (seta em azul).

## 6 DISCUSSÃO

A torção do cordão espermático corresponde a até 1/3 dos pacientes pediátricos que apresentam-se com dor escrotal aguda (SESSIONS *et al*, 2003). A alteração da espermatogênese tem sido relatada em animais e humanos após TCE, sendo que as 3 principais hipóteses para explicar esses achados são: defeito primário da espermatogênese concomitante com o desenvolvimento anômalo da fixação testicular, resposta autoimune gerada pela ruptura da barreira hematotesticular (ocasionando a formação de anticorpos antiespermatozóides), e o dano induzido pela reperfusão testicular, que pode ser relacionado ao aumento significativo da apoptose celular em consequência do grande estresse oxidativo após a reperfusão (ANDERSON, WILLIAMSON, 1990; BECKER *et al*, 1997; TURNER *et al*, 2004).

Turner *et al*. (2004), refere que uma melhor compreensão desta enfermidade é importante por várias razões. Primeiro porque cerca de 25% dos pacientes com história de torção do cordão espermático ficarão inférteis; segundo, que compreender a resposta do testículo à torção, envolve o entendimento das conseqüências do estresse oxidativo, o qual vem sendo relatado como circunstância associada à infertilidade. E, finalmente, para compreender os eventos fisiopatológicos e moleculares responsáveis pela perda da função testicular após a torção. Esses fatores facilitarão as aplicações terapêuticas e melhorarão os resultados clínicos.

Estudos experimentais em animais confirmam que a TCE está associada com a produção de radicais livres, e que seus efeitos danosos talvez possam ser controlados com antioxidantes (ÜNSAL *et al*, 2004; AVLAN *et al*, 2005; KEHINDE *et al*, 2005; GEZICI *et al*, 2006; MOGILNER *et al*, 2006; ETENSEL *et al*, 2007; PEKCETIN *et al*, 2007; GOKCE *et al*, 2008; SUKHOTNIK *et al*, 2008; ÜSTÜN *et al*, 2008; BOZLU *et al*, 2009; KÖSEOGLU *et al*, 2009). Turner *et al*. (2004), sugerem que pesquisas moleculares relacionadas a apoptose de células germinativas são imprescindíveis, relatando que, futuramente, a combinação de agentes antioxidantes proverá resgate significativo da função celular.

Aplicando-se o conhecimento farmacológico de drogas com propriedades antioxidantes já existentes, pesquisadores vêm utilizando-as em estudos

experimentais em adjuvância ao tratamento cirúrgico da TCE, com resultados controversos na literatura. Estes fatores, aliados à necessidade da comunidade científica em encontrar aplicabilidade clínica de um antioxidante para um problema relevante e freqüente na prática urológica e pediátrica, foram incentivadores para a realização deste estudo.

Para Kolettis *et al.* (1996) e Sessions *et al.* (2003), fatores como a espécie e o tipo do animal, a sua idade, o modo de produzir a isquemia, o tempo de duração da isquemia e as formas de avaliações, interferem na análise e comparação dos trabalhos.

O rato foi o animal escolhido para este experimento por ser o modelo animal mais descrito na literatura para avaliar I/R em testículos, e também pela facilidade na obtenção e manuseio, além de sua excelente resistência a infecções e algumas similaridades anatômicas e biológicas com os seres humanos (AVLAN *et al.*, 2005; GEZICI *et al.*, 2006).

No procedimento anestésico foram utilizados Quetamina e Xylazina, por via intramuscular. Ambas são amplamente utilizadas em modelos animais, principalmente em ratos, sendo indicadas para procedimentos de curta duração. Os anestésicos utilizados proporcionaram um plano anestésico de aproximadamente 40 a 80 minutos, período adequado para a realização do procedimento operatório, sendo feito o repique da medicação quando necessário (BARLAS, HATIBOGLU, 2002; BOZLU *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2009).

A exposição dos testículos foi realizada através de inguinotomia oblíqua direita de 1,5 cm de extensão, método referido na literatura para a abordagem dos testículos e cordões espermáticos em ratos, embora uma incisão em bolsa escrotal ou até mesmo laparotomia podem ser usadas (AVLAN *et al.*, 2005; GEZICI *et al.*, 2006; GOKCE *et al.*, 2008; BOZLU *et al.*, 2009; KOSEOGLU *et al.*, 2009). Tal acesso permite a realização do experimento sem dificuldades técnicas e facilita a evolução pós-operatória dos animais. Com o término da cirurgia, a recuperação dos animais ocorreu em cerca de trinta minutos, havendo 2 óbitos na primeira semana de pós-operatório (GIII e GIV). Sendo assim, os modelos cirúrgico e anestésico foram considerados apropriados para este estudo.

O estudo da integridade das células germinativas foi feito por meio de análise histológica. O método por coloração com HE é o mais citado na literatura. Trata-se de uma técnica simples, rápida, eficaz e de baixo custo para a avaliação histológica

das células testiculares. Permite avaliar com clareza os túbulos seminíferos, as células de Sertoli (espermatogênicas) e as células de Leydig, e está disponível em todos os centros (COSENTINO *et al*, 1986; KOSAR *et al*, 1997; PALMER *et al*, 1997; HADZISELIMOVIC *et al*, 1998; UNSAL *et al*, 2004; AVLAN *et al*, 2005; MOGILNER *et al*, 2006; PEKCETIN *et al*, 2007; SUKHOTNIK *et al*, 2008; GOKCE *et al*, 2008; ÜSTÜN *et al*, 2008). Outros métodos têm sido descritos para a avaliação da função testicular após torção e destorção do cordão espermático, tais como aferição e avaliação dos parâmetros seminais, níveis hormonais, presença de anticorpos anti-espermatozóides, dosagem de enzimas oxidativas, dentre outros. No entanto, recebem críticas por serem parâmetros indiretos e, alguns, não factíveis em modelos animais experimentais.

Zanchetta *et al*. (1984) identificou anticorpos específicos contra células de Leydig e outras células de linhagem germinativa, por meio de imunofluorescência indireta, em 68 pacientes estudados após torção do cordão espermático. Destes, 13,2% foram positivos para atividade de anticorpos contra antígenos testiculares e antígenos de espermatozóides, indicando que o dano isquêmico agudo aos testículos após TCE pode levar à produção de anticorpos contra antígenos gonadais. Anderson e Williamson (1990), em revisão de 240 pacientes após tratamento para TCE, verificaram diminuição na concentração de espermatozóides em 37%, diminuição na motilidade dos espermatozóides em 56% e aumento no percentual de espermatozóides inviáveis em 53% dos casos. Contudo, estes autores verificaram que apenas 9% dos pacientes têm anticorpos antiespermatozóides detectáveis seis meses após a TCE.

Hadziselimovic *et al*. (1998), avaliou 17 pacientes do sexo masculino, entre 14 e 34 anos, que foram submetidos a tratamento cirúrgico para TCE. Realizou-se biópsia testicular bilateral para avaliação da apoptose celular. As lesões testiculares foram graduadas (grau 1 a 3) independente da duração ou do grau de torção do cordão espermático. Em todos os testículos contralaterais à torção, as lesões foram importantes (graus 2 e 3) e a taxa de apoptose aumentada (aferida pela taxa de degradação do DNA), concluindo que o epitélio germinativo dos testículos contra-laterais à TCE desenvolve extensa apoptose. Portanto, estes trabalhos indicam que o dano isquêmico agudo decorrente da TCE pode levar à produção de autoanticorpos contra antígenos gonadais; contudo, ainda permanece como especulação em que proporção a autoimunidade contribui para a perda da

função gonadal (ZANCHETA *et al.*, 1984 ; ANDERSON, WILLIAMSON, 1990; HADZISELIMOVIC *et al.*, 1998).

No entanto, Arap *et al.* (2007), avaliando os níveis hormonais, os parâmetros seminais e a presença de anticorpos antiespermatozóides em 2 grupos de pacientes (n=64) submetidos a tratamento cirúrgico para TCE, observou que não houve diferença na produção de anticorpos antiespermatozóides entre pacientes submetidos a orquiectomia com orquidopexia contralateral ou destorção com orquidopexia bilateral, relatando não haver relação entre anticorpos e manutenção ou remoção do testículo afetado, mas possivelmente com uma resposta autoimune irreversível desencadeada no momento da torção. Segundo este autor, a função testicular endócrina (produção de testosterona) é preservada em pacientes tratados para torção testicular, provavelmente devido ao aumento dos níveis de LH.

Cosentino *et al.* (1984) avaliou a fertilidade de 60 ratos, subsequente à TCE em 720 graus, com tempo entre 1 e 12 horas, considerando a gestação das fêmeas e o número e tamanho dos embriões formados após acasalamento dos animais operados (orquiectomia e orquidopexia). Verificou que no grupo submetido a orquidopexia, houve um decréscimo linear da fertilidade relacionada ao tempo de torção, com piora após 5 horas da TCE. Todavia, no grupo submetido a orquiectomia, a fertilidade ficou preservada, independente da duração da torção.

Alguns trabalhos, citados por Saba *et al.* (1997), Kehinde *et al.* (2003), Ünsal *et al.* (2004), Avlan *et al.* (2005), Ali Çay *et al.* (2006), Gezici *et al.* (2006), avaliaram indiretamente o estresse oxidativo pela mensuração da produção das enzimas oxidativas e do consumo dos antioxidantes (atividade enzimática), como por exemplo, a malondialdeído, a xantinoxidase, a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Os valores são resultados da interação dos produtos gerados durante a I/R, em decorrência de interações com moléculas biológicas complexas, como proteínas, carboidratos ou lipídeos. A técnica de avaliação direta (spin do elétron na ressonância) é a ideal, porém é complexa e difícil de ser aplicada. O método mais comumente usado para avaliação da peroxidação lipídica é a espectrofotometria da MDA, quantificando-se as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Kehinde *et al.* (2003) avaliou 56 pacientes que foram submetidos a orquidopexia bilateral (80,4%) e orquiectomia com orquidopexia contralateral (19,6%) e observou que, em comparação ao grupo controle, os níveis de MDA

elevaram-se nos grupos com TCE, sugerindo que esse marcador poderia ser utilizado para determinar a extensão da lesão. A MDA retornou aos níveis séricos em 24 horas, em todos os pacientes. Saba *et al.* (1997) avaliou, também indiretamente, as alterações bioquímicas em ratos pré-púberes submetidos a TCE, e observaram que os níveis de antioxidantes contra ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio diminuíram nos testículos torcidos, mas não nos contra-laterais.

Avlan *et al.* (2005), Ali Çay *et al.* (2006), Gezici *et al.* (2006), avaliaram o estresse oxidativo por meio da histologia, conforme proposto por Cosentino *et al.* (1986), assim como por marcadores enzimáticos séricos, com resultados semelhantes, ou seja, mostrando um aumento de MDA e um decréscimo na atividade de SOD, CAT e GSH-Px (as enzimas antioxidantes) nos ratos submetidos a TCE. Quando tratados com antioxidantes exógenos, ocorre uma tendência em diminuir os níveis de MDA e aumentar os níveis dos antioxidantes. O escore de cosentino foi utilizado neste estudo porque permite uma padronização de avaliação, e, a análise dos parâmetros histológicos como um todo.

Tradicionalmente, dois modelos animais têm sido usados para oclusão do cordão espermático: a ligadura por clampes, isolando-se ou não a artéria deferencial (PALMER *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2000), e a torção manual (ALI ÇAY *et al.*, 2006; BOZLU *et al.*, 2009; MINUTOLI *et al.*, 2009). O grau de torção aplicado ao cordão, que também alterna entre 360 e 1080 graus, e o tempo de isquemia, que vem sendo relatado entre 1 e 12 horas, também são variáveis nos diversos trabalhos publicados, de acordo com o modelo, o animal e o experimento realizado. Porém, a maioria dos trabalhos publicados envolvendo I/R testicular (SILVA *et al.*, 2005; ALI ÇAY *et al.*, 2006; ETENSEL *et al.*, 2007; BOZLU *et al.*, 2009; MINUTOLI *et al.*, 2009), foi reproduzida em ratos, com TCE manual, em 720 graus.

Turner e Brown (1993) mostraram que o tempo para se iniciar uma terapêutica antioxidante fica em torno de 1 hora, período necessário para induzir o dano tecidual. Becker *et al.* (1997) relatou que após 1 hora de torção do cordão espermático a 720 graus já existe dano testicular, mostrando que esse período de isquemia é suficiente para induzir a lesão celular (possivelmente reversível), e que períodos mais longos de hipóxia podem levar ao desaparecimento permanente da espermatogênese em ratos. Cosentino *et al.* (1986) estabeleceu que a torção do cordão a 720 graus por 5 horas é suficiente para causar dano testicular irreversível. Portanto, efetuou-se neste estudo, a torção a 720 graus com duração de 1 hora.

Becker *et al.* (1997) observou que a hipóxia do ducto deferente leva a imobilidade dos espermatozóides, e isso pode dar uma aparente elevação da quantidade de espermatozóides a curto prazo, de modo que, sessenta dias após a torção, esses espermatozóides imobilizados são degradados por completo. Por esse motivo, o período de observação adotado foi de 60 dias, conforme proposto por Harrison (1950), Ali Çay *et al.* (2006), Silva *et al.* (2005), Etensel *et al.* (2007) e Bozlu *et al.* (2009).

A idade dos ratos é um fator importante, visto que apenas com 45 dias de vida encontra-se espermatogênese normal. Por isso utilizou-se animais com idade entre 60 e 120 dias, tal como Cosentino *et al.* (1986) e Becker *et al.* (1997).

O tamanho dos testículos após orquiectomia não foi utilizado como parâmetro. Sessions *et al.* (2003) definem hipotrofia ou atrofia como perda de pelo menos 15% do volume comparado ao testículo contralateral. Prillaman e Turner (1997), relatam freqüência de 60% de atrofia em ratos submetidos a TCE, e Sessions *et al.* (2003) de 62% já na primeira visita de retorno após orquidopexia em humanos com TCE. Para Kehinde *et al.* (2003), a taxa de atrofia testicular após TCE está em torno de 40%. Portanto, por tratar-se de um achado freqüente e já bem estabelecido na evolução dos modelos de TCE, e também caracterizar um parâmetro indireto para avaliação da viabilidade testicular, optou-se por não pesar os testículos.

Minutoli *et al.* (2009) definiu que o dano pela I/R é uma combinação do componente isquêmico e do componente reperfusão, de modo que, em órgãos intolerantes à isquemia global, o dano devido a própria isquemia pode ser tão grande que torna sem efeito o dano pela reperfusão. Evora *et al.* (1996) descreveu reperfusão como sendo as alterações, funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia, caracterizando o fenômeno I/R. Para esta autora, distúrbios metabólicos durante isquemia ou hipóxia tissular são muito bem estabelecidos, porém evidências clínicas e experimentais demonstram que os principais eventos que levam a disfunções celular e tecidual relacionam-se com a reperfusão, quando o oxigênio é reofertado.

Os mecanismos antirradicais livres de oxigênio podem ser eficientes quando a porção principal da lesão é causada pela reperfusão. Os órgãos variam na tolerância à isquemia, ou seja, em órgãos como o coração e a pele, ou mesmo os

rins e o fígado, os mecanismos antirradicais livres podem ser efetivos, prevenindo o dano de reperfusão após uma isquemia global. Porém, há necessidade de mais estudos comprovando ações específicas dessas drogas em determinados modelos de I/R (CAMPOS, YOSHIDA, 2004). Turner *et al.* (1993) tentou prevenir o dano de reperfusão em testículos depois de 60 e 100 minutos de ligadura da artéria espermática, e observaram que os inibidores de radicais livres não protegeram o órgão do dano de reperfusão. Prillaman e Turner (1997), avaliaram a I/R em testículos de ratos por meio de torção e destorção do cordão espermático, com 1 a 2 horas de duração, e concluíram, que na torção do cordão espermático a 720 graus com 1 hora de duração, as drogas antioxidantes têm efeito benéfico na reperfusão, fato não observado no grupo em que o período de torção durou mais que 1 hora.

Com certa frequência, lesões histológicas no testículo contralateral e níveis anormais de anticorpos antiespermatozóides ocorrem após TCE experimental, sugerindo remoção do testículo torcido quando houver viabilidade duvidosa (ZANCHETA *et al.*, 1984; COSENTINO *et al.*, 1986; KOSAR *et al.*, 1997; SABA *et al.*, 1997; KEHINDE *et al.*, 2003). No entanto, Arap *et al.* (2007), em trabalho supracitado, mensurou os níveis de LH, FSH e Testosterona, e conclui-se que os achados qualitativos do líquido seminal, avaliados pelos critérios de Kruger e da Organização Mundial de Saúde, não tiveram relação com resposta autoimune, não havendo diferença entre os grupos.

Algum tipo de tratamento complementar adjuvante vem sendo proposto por estudiosos no assunto, com intenção de minimizar o dano decorrente da reperfusão tecidual após correção cirúrgica de TCE, visto que o acúmulo de agentes oxidativos prejudicam a função celular testicular ipsilateral, e até mesmo contralateral segundo alguns autores (BARLAS; HATIBOGLU, 2002; UNSAL *et al.*, 2004; ALI ÇAY *et al.*, 2006; AVLAN *et al.*, 2005; ANTONUCCIO *et al.*, 2006; MOGILNER *et al.*, 2006; GEZICI *et al.*, 2006; ETENSEL *et al.*, 2007; PEKCETIN *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; SUKHOTNIK *et al.*, 2008; GOKCE *et al.*, 2008; ÜSTÜN *et al.*, 2008; BOZLU *et al.*, 2009; KÖSEOGLU *et al.*, 2009; MINUTOLI *et al.*, 2009), implicando a perda da espermatogênese. Porém os estudos realizados e seus resultados ainda são pouco promissores

Ali Çay *et al.* (2006) estudou, em ratos, o efeito da NAC em testículos submetidos a I/R e concluíram que a NAC inibiu a peroxidação lipídica durante a

reperfusão dos testículos, reduzindo os níveis de malondialdeído, e prevenindo lesões histopatológicas nos mesmos. A contribuição da NAC para o sistema de defesa antioxidante deu-se aparentemente pela elevação da atividade de GSH-Px. Para o autor, esses resultados demonstram que a NAC preveniu a lesão celular ipsilateral após a reperfusão testicular, verificado por parâmetros bioquímicos e histológicos, podendo tornar-se um agente útil na prevenção dos efeitos oxidativos na lesão por reperfusão após TCE.

Payabvash *et al.* (2007) e Aktas *et al.* (2010), avaliaram os efeitos da NAC em modelo experimental semelhante a Ali Çay *et al.* (2006). O primeiro avaliou 30 ratos wistar, distribuídos em 5 grupos, sendo que as alterações histológicas foram mais amenas, assim como os níveis de MDA menores e os níveis de enzimas antioxidantes maiores, nos grupos que tiveram a administração da NAC antes da torção ou ainda da destorção do cordão espermático, porém sem benefício quando administrada após a destorção testicular. O suprimento intracelular de glutathione, associado às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da NAC podem ser os possíveis mecanismos desse efeito protetor. O segundo mostrou resultados sugerindo que a administração precoce de NAC pode ter um efeito protetor em testículos de ratos submetidos a I/R, mostrando menor alteração na histologia celular e níveis de TBARS aumentados nos grupos torção/destorção, com queda significativa dos valores, em ambos os testículos, no grupo que sofreu administração precoce de NAC.

Ali Çay *et al.* (2006) e Aktas *et al.* (2010), administraram a NAC por via parenteral (E.V), na dose de 20mg/dia, enquanto que neste estudo a NAC foi inoculada via intraperitonal, na dose de 150 mg/Kg, conforme proposto por Payabvash *et al.* (2007), o qual propõe esta dose como terapêutica. Ainda mais, a NAC é uma droga praticamente inócua, que não apresenta efeitos colaterais, com morbidade praticamente nula.

Neste trabalho, optou-se por avaliação histológica dos testículos, com análise cega, feita por um patologista, com varredura total da lâmina e quantificação das lesões em cada lâmina conforme seus percentuais, visto que a avaliação qualitativa exclusiva pela graduação do grau predominante em cada lâmina prejudicariam os resultados. Portanto, os valores foram calculados, conforme definição proposta por Cosentino *et al.* (1985), com valores que ficaram compreendidos entre 100 e 400, sendo, respectivamente, o menor e maior resultado encontrado em cada lâmina.

Comparando-se com os resultados dos trabalhos supracitados, a NAC mostrou efeito protetor no testículo direito dos animais do grupo II (torção + NAC), com diferença estatística em relação aos outros grupos ( $p < 0,001$ ). Na avaliação inter-grupos, quando analisado o testículo direito, não houve diferença estatisticamente significativa para os grupos III e IV, isto é, para os testículos que não sofreram torção do cordão espermático, a administração do medicamento não mostrou benefício. Na análise do testículo direito dos grupos I e II, onde houve a torção do cordão espermático, a diferença em relação a GIII e GIV foi significativa ( $p < 0,001$ ). Observou-se também, diferença entre GI e GII ( $p < 0,001$ ), com redução dos graus de lesão 3 e 4 para o segundo, mostrando efeito protetor da N-Acetilcisteína no grupo testado (GII).

Para o testículo contralateral, a NAC não mostrou benefício no grupo testado. Houve diferença estatística nos grupos I e II, quando comparados aos grupos III e IV ( $p = 0,023$ ). Não houve diferença entre GI e GII, assim como entre GIII e GIV. Isso demonstra que a torção no testículo direito provocou alterações histológicas no testículo contralateral, sem efeito benéfico no grupo que recebeu N-Acetilcisteína (GI=GII), enquanto que nos grupos sem torção, as alterações histológicas foram pouco significativas (GI=GII > GIII=GIV). Não se pode descartar a formação de anticorpos antiespermatozóides, assim como a lesão por reperfusão causando dano celular contralateral, já que os testículos foram mantidos na bolsa escrotal por mais 60 dias após a torção.

Na comparação dos testículos direito e esquerdo em cada grupo isoladamente, ou seja, intra-grupos, houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos avaliados, com maior diferença estatística nos grupos I e II ( $p = 0,003$  e  $0,002$ , respectivamente). Para estes, a explicação é que houve um dano decorrente da isquemia celular, enquanto que nos grupos III e IV, pequenas alterações celulares no testículo direito podem ser explicadas pela manipulação e exposição do órgão em meio ambiente.

Portanto, existe um grande interesse por este assunto, envolvendo a urologia e a cirurgia infantil, pois, frequentemente, essas especialidades deparam-se com o fenômeno isquemia-reperfusão decorrente da torção do cordão espermático. E ainda hoje, não existe uma conduta definida e aceita universalmente no que tange o tratamento adjuvante à exploração cirúrgica. Existe um vasto campo para pesquisas que comparem drogas que atuem prevenindo e/ou corrigindo as conseqüências da

I/R. Portanto, embora diversas substâncias tenham apresentado bons resultados em modelos animais, na prática clínica os resultados não foram consistentemente avaliados, de modo que algumas drogas poderiam causar efeitos colaterais relevantes.

Assim, devido à relevância do tema, aos achados na literatura e aos resultados aqui apresentados, entende-se a necessidade de mais estudos em outros modelos experimentais de torção testicular, sugerindo-se a possibilidade do uso de NAC em protocolo de humanos, que possam finalmente comprovar a eficácia da NAC como um agente útil na terapia adjuvante ao reparo cirúrgico da torção testicular em humanos.

## 7 CONCLUSÃO

- A N-acetilcisteína mostrou efeito protetor na morfologia celular dos testículos ipsilaterais de ratos submetidos à torção do cordão espermático seguido de reperfusão.

- Houve lesão dos testículos contralaterais de ratos submetidos à torção do cordão espermático.

## REFERÊNCIAS

Ali Çay, Alver A, Küçük M, Isik O, Eminagaoglu MS, Karahan SC, Deger O. The effects of n-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res.* 2006;131(2):199-203.

Anderson JB, Williamson RC. The fate of the human testis following unilateral torsion of the spermatic cord. *Br J Urol.* 1986;58(6):698-704.

Anderson JB, Williamson RC. Fertility after torsion of the spermatic Cord. *Br J Urol.* 1990;65:225-230.

Andrade SC, Dezoti C, Shibuya CA, Watanabe M, Vattimo MF. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. *J Bras Nefrol.* 2004;26(2):69-75.

Antonuccio P, Minutoli L, Romeo C, Nicòtina PA, Bitto A, Arena S, *et al.* Lipid peroxidation activates mitogen-activated protein kinases in testicular ischemia-reperfusion injury. 2006;176:1666-1672

Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, *et al.* Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *Journal of Andrology.* 2007;28(4):528-532.

Avlan D, Erdougan K, Çimen B, Apa DD, Cinel I, Aksöyek S. The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. *Pediatr Surg Int.* 2005;21:274-278.

Aktas BK, Bulut S, bulut S, Baykam MM, Özden C, Senes M, Yücel D, Memis. The effects of n-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int.* 2010;26:293-298.

Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *Journal of Andrology*. 1995;16(1):12-17.

Barlas M, Hatiboglu C. The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *Int Urol Nephrol*. 2002;34:81-86.

Becker EJ, Prillaman HM, Turner TT. Microvascular blood flow is altered after repair of testicular torsion in the rat. *The Journal of Urology*. 1997;157(4):1493-1498.

Bentley DF, Ricchiuti DJ, Nasrallah PF, McMahon DR. Spermatic cord torsion with preserved testis perfusion: initial anatomical observations. *The Journal of Urology*. 2004;172:2373-2376.

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;27:117-122.

Campos EBP, Yoshida WB. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *J Vasc Br*. 2004;3(4):357-366.

Cornel EB, Karthaus HFM. Manual derotation of the spermatic cord. *BJU International*. 1999;38(6):672-674.

Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Valvo JR, Cockett ATK. The effect of prepuberal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *Journal of Andrology*. 1984;5:93-98.

Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepuberal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *The Journal of Urology*. 1985;133.

Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic Cord torsion. *Journal of Andrology*. 1986;7:23-31.

Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K. Adult testicular torsion. *The Journal of Urology*. 2002;167:2109-2110.

Davenport M. Acute problems of the scrotum. *BMJ*. 1996;312:435-437.

Etensel B, Özkisacik S, Özkara E, Serbest YA, Öztan O, Yazici M. The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60<sup>th</sup> day following experimental testicular torsion. *Pediatr Surg Int*. 2007;23:271-275.

Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão: aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq Bras Cardiol*. 1996;66(4):239-245.

Ferreira AL, Crisci AR, Fiorani SAS, Laus JL, Jorge AT. Lesões isquêmicas do testículo de cães mediante garroteamento temporário do cordão espermático. *Ciência Rural*. 2000;30(5):841-845.

Gezici A, Ozturk H, Buyukbayram H, Ozturk H, Okur H. Effects of gabexate mesilate on ischemia-reperfusion-induced testicular injury in rats. *Pediatr Surg Int*. 2006;22:435-441.

Gokce G, Karboga H, Yildiz E, Ayan S, Gultekin Y. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on apoptotic changes in contralateral testis following unilateral testicular torsion. *Int Urol Nephrol*. 2008;40:989-995.

Guimarães SB, Aragão AA, Santos JMV, Kimura OS, Barbosa PHU, Vasconcelos PRL. Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in young rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2007;22(1):30-33.

Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *The Journal of Urology*. 1998;160(3-11):1158-1160.

Jesus LE. Escroto agudo. *Revista do colégio brasileiro de cirurgiões*. 2000;27(4):271-278.

Jones P. Torsion of the testis and its appendages during childhood. *Archives of Disease in Childhood*. 1961;214-226.

Kalfa N, Veyrac C, Baud C, Couture A, Averous M, Galifer RB. Ultrasonography of the spermatic cord in children with testicular torsion: impact on the surgical strategy. *The Journal of Urology*. 2004;172:1692-1695.

Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh: UROLOGY*. 9th Edition. Philadelphia: Elsevier; 2007. v04.c106, c127.p 3121, p3761.

Kaye JD, Shapiro EY, Levitt SB, Friedman SC, Gitlin J, Freyle J, *et al*. Parenchymal echo texture predicts testicular salvage after torsion: potential impact on the need for emergent exploration. *The Journal of Urology*. 2008;180:1733-1736.

Kehinde EO, Mojiminiyi OA, Mahmoud AH, Al-Awadi KA, Al-Hunayan A, Omu AE. The significance of measuring the time course of serum malondialdehyde concentration in patients with torsion of the testis. 2003;169:2177-2180.

Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F, Shihab-Eldeen A, Omu AE, *et al*. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU International*. 2005;96:175-180.

Knight PJ, Vassy LE. The diagnosis and treatment of the acute scrotum in children and adolescents. *The Acute Scrotum in Children*. 1984;200(5):664-673.

Kolettis PN, Stowe NT, Inman SR, Thomas Junior AJ. Acute spermatic cord torsion alters the microcirculation of the contralateral testis. *The Journal of Urology*. 1996;155:350-354.

Kondala Rao AVS, Shaha C. N-acetylcysteine prevents MAA induced male germ cell apoptosis: role of glutathione and cytochrome c. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)*. 2002;527: 133-137.

Köseoglu B, Yilmaz E, Ceylan K, Uzun E, Bayram I, Hizli. The protective effect of erythropoietin infusion on testicular torsion/destorsion: an experimental study. *Int Urol Nephrol*. 2009;41:85-91.

Mansbach JM, Forbes P, Peters C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005;159:1167-1171.

Minutoli L, Antonuccio P, Polito F, Bitto A, Squadrito F, Irrera N, Nicotina PA, *et al*. Peroxisome proliferator activated receptor  $\beta/\delta$  activation prevents extracellular regulated kinase  $\frac{1}{2}$  phosphorylation and protects the testis from ischemia and reperfusion injury. *The Journal of Urology*. 2009;181:1913-1921.

Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. AS bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004;19(1):3-12.

Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int*. 2006;22:99-105.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-142.

Noske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W. Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. *The Journal of Urology*. 1998;159(1):13-16.

Palmer JS, Plzak LF, Cromie WJ. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. *The Journal of Urology*. 1997;158(3):1138-1140.

Payabvash S, Salmasi AH, Kiumehr S, Tavangar SM, Nourbakhsh B, Faghihi SH, Dehpour AR. Salutary effects of n-acetylcysteine on apoptotic damage in a rat model of testicular torsion. *Urologia Internationalis*. 2007;79:248-254.

Pekcetin C, Ergur BU, Kiray M, Begriyanik A, Tugyan K, Erbil G, et al. The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. *Pediatr Surg Int*. 2007;23:1113-1118.

Portella AOV, Montero EFS, Figueiredo LFP, Bueno AS, Thurow AA, Rodrigues FG. Effects of N-Acetylcysteine in hepatic ischemia-reperfusion injury during hemorrhagic shock. *Transplantation Proceedings*. 2004;36:846-848.

Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *The Journal of Urology*. 1997;157(1):340-345.

Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician*. 2006;74:1739-1743.

Romero FR, Gomes RPX, Lorenzini F, Erdmann TR, Filho RT. Ipsilateral testicular necrosis and atrophy after 1080-degree torsion of the spermatic cord in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2009;24(2):118-123.

Saba M, Morales CR, Lamirande E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepuberal rats. *The Journal of Urology*. 1997;157(3):1149-1154.

Scott JES. Torsion of the testis. *Postgraduate Medical Journal*. 1956;435-437.

Sessions AE, Rabinowitz R, Hulbert WC, Goldstein MM, Mevorach RA. Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. *The Journal of Urology*. 2003;169:663-665.

Silva ACMBA, Ortiz V, Silva RA, Tognini JR. Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005;20(6),468-472.

Sparks JP. Torsion of the testis. *Ann Roy Coll Surg Engl*. 1971;49:77-91.

Sukhotnik I, Miselevich I, Lurie M, Nativ O, Coran AG, Mogilner JG. The time relationship between ipsilateral testicular ischemia and germ cell apoptosis in the contralateral testis in rat. *Pediatr Surg Int*. 2005;21:512-516.

Sukhotnik I, Meyer G, Nativ O, Coran AG, Voskoboinik K, Shiloni E, *et al*. Effect of allopurinol on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int*. 2008;24:61-66.

Tanagho EA, McAninch JW. *Smith's General Urology*. 17 ed. United States: Mcgraw-Hill; 2010.

Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of Reproduction*. 1993;49:401-407.

Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *The Journal of Urology*. 2004;172:2574-2578.

Ünsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, *et al*. Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World J Urol*. 2004;22:461-465.

Üstün H, Akgül KT, Ayyildiz A, Yagmurdur H, Nuhoglu B, Karagüzel E, *et al*. Effect of phosphodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study. *Pediatr Surg Int*. 2008;24:205-211.

Yang S, Shih HJ, Chow YC, Tsai PS, Wang TY, Wang PS, *et al.* The protective role of heme oxygenase-1 induction on testicular tissues after testicular torsion and detorsion. *The Journal of Urology.* 2007;177:1928-1933.

Zanchetta R, Mastrogiacomo I, Graziotti P, Foresta C, Betterle C. Autoantibodies against leydig cells in patient after spermatic cord torsion. *Clin Exp Immunol.* 1984;55:49-57.

## NORMAS ADOTADAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Rio de Janeiro. NBR 10719, 1989; NBM 10520, 2002; NBR 6024, 2003 e NBR 6028, 2003.

Conselho Nacional de Saúde – Resolução n. 01/88: Normas de pesquisa em saúde. *Bioética* 1995;3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. 3ed. São Paulo, Bireme, 1996, 1146p.

*Index Medicus* – Bireme. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. International Committee of Medical Journals Editors. *Jornal de Pediatria*. 2007;1-20.

Zárate P. Diretrizes para elaboração de Teses e Dissertações [Apostila]. Campo Grande: Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2008.



**(ANEXO B)**

Peso (g)	<b>Grupo I</b> (Isquemia)	<b>Grupo II</b> (Isquemia + NAC)	<b>Grupo III</b> (Controle)	<b>Grupo IV</b> (Controle + NAC)
A1	260	271	255	262
A2	260	277	280	280
A3	270	269	259	263
A4	272	260	264	271
A5	300	266	270	259
A6	281	280	275	266
A7	295	272	269	278
A8	268	266	277	270
A9	277	265	263	275
A10	255	288	252	258
A11	262	261	282	269
A12	268	260	Óbito	Óbito
Média	272,33	269,58	267,81	268,27

**(ANEXO C)**

ESCORE DE LESÃO(%), CONFORME COSENTINO					ESCORE DE LESÃO(%), CONFORME COSENTINO				
<b>GRUPO</b> <b>1</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>GRUPO</b> <b>2</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
A1 TD			100		A1 TD	40	60		
A2 TD			70	30	A2 TD	10	30		60
A3 TD			20	80	A3 TD		80	20	
A4 TD		50	50		A4 TD			100	
A5 TD		40	60		A5 TD		60	40	
A6 TD		30		70	A6 TD		50	40	10
A7 TD		70	30		A7 TD		60	40	
A8 TD			100		A8 TD	10	70	20	
A9 TD	50	50			A9 TD		40	10	50
A10 TD		40	50	10	A10 TD	10	90		
A11 TD		50	50		A11 TD	50	50		
A12 TD		40	50	10	A12 TD	10	80	10	
<b>GRUPO</b> <b>1</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>GRUPO</b> <b>2</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
A1 TE	40	60			A1 TE	100			
A2 TE	50	50			A2 TE	50	50		
A3 TE	100				A3 TE	50	50		
A4 TE	50	50			A4 TE	100			
A5 TE	40	60			A5 TE	50	50		
A6 TE	80	20			A6 TE	80	20		
A7 TE	90	10			A7 TE	90	10		
A8 TE	90	10			A8 TE	50	50		
A9 TE	50	50			A9 TE	90	10		
A10 TE	90	10			A10 TE	90	10		
A11 TE	50	50			A11 TE	90	10		
A12 TE	50	50			A12 TE	90	10		

**(ANEXO D)**

ESCORE DE LESÃO(%), CONFORME COSENTINO					ESCORE DE LESÃO(%), CONFORME COSENTINO				
<b>GRUPO</b> <b>3</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>GRUPO</b> <b>4</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
A1 TD	70	25	5		A1 TD	95	5		
A2 TD	90	10			A2 TD	Abscesso			
A3 TD	90	5	5		A3 TD	10	80	5	5
A4 TD	80	20			A4 TD	40	60		
A5 TD	60	40			A5 TD	80	20		
A6 TD	80	20			A6 TD	80		20	
A7 TD	95	5			A7 TD	40	60		
A8 TD	95	5			A8 TD	50	50		
A9 TD	90	10			A9 TD	40	40	20	
A10 TD	10	80	10		A10 TD	95	5		
A11 TD	40	45	5		A11 TD	80	20		
A12 TD	ÓBITO				A12 TD	ÓBITO			
<b>GRUPO</b> <b>3</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>GRUPO</b> <b>4</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
A1 TE	90	10			A1 TE	90	10		
A2 TE	90	10			A2 TE	90	10		
A3 TE	90	10			A3 TE	80	20		
A4 TE	90	10			A4 TE	90	10		
A5 TE	90	10			A5 TE	90	10		
A6 TE	90	10			A6 TE	90	10		
A7 TE	90	10			A7 TE	90	10		
A8 TE	90	10			A8 TE	90	10		
A9 TE	90	10			A9 TE	80	20		
A10 TE	90	10			A10 TE	90	10		
A11 TE	90	10			A11 TE	100	0		
A12 TE	ÓBITO				A12 TE	ÓBITO			

**(ANEXO E)**

## ESCORES CALCULADOS

GRUPO 1				GRUPO 2			
A1 TD	300	A1 TE	160	A1 TD	160	A1 TE	100
A2 TD	330	A2 TE	150	A2 TD	310	A2 TE	150
A3 TD	380	A3 TE	100	A3 TD	220	A3 TE	150
A4 TD	250	A4 TE	150	A4 TD	300	A4 TE	100
A5 TD	260	A5 TE	160	A5 TD	240	A5 TE	150
A6 TD	340	A6 TE	120	A6 TD	260	A6 TE	120
A7 TD	230	A7 TE	110	A7 TD	240	A7 TE	110
A8 TD	300	A8 TE	110	A8 TD	210	A8 TE	150
A9 TD	150	A9 TE	150	A9 TD	310	A9 TE	110
A10 TD	270	A10 TE	110	A10 TD	190	A10 TE	110
A11 TD	250	A11 TE	150	A11 TD	150	A11 TE	110
A12 TD	270	A12 TE	150	A12 TD	200	A12 TE	110

GRUPO 3				GRUPO 4			
A1 TD	135	A1 TE	110	A1 TD	105	A1 TE	110
A2 TD	110	A2 TE	110	A2 TD	290**	A2 TE	110
A3 TD	115	A3 TE	110	A3 TD	205	A3 TE	120
A4 TD	120	A4 TE	110	A4 TD	160	A4 TE	110
A5 TD	140	A5 TE	110	A5 TD	120	A5 TE	110
A6 TD	120	A6 TE	110	A6 TD	140	A6 TE	110
A7 TD	105	A7 TE	110	A7 TD	160	A7 TE	110
A8 TD	105	A8 TE	110	A8 TD	150	A8 TE	110
A9 TD	110	A9 TE	110	A9 TD	180	A9 TE	120
A10 TD	200	A10 TE	110	A10 TD	105	A10 TE	110
A11 TD	145	A11 TE	110	A11 TD	120	A11 TE	100
A12 TD	ÓBITO	A12 TE	ÓBITO	A12 TD	ÓBITO	A12 TE	ÓBITO

\*\* Abscesso Testicular

**(ANEXO F)**

<b>Histological grading system developed by Cosentino <i>et al.</i></b>	
Grade I	Shown normal testicular architecture with an orderly, arrangement of germinal cells
Grade II	Injury showed less orderly, noncohesive germinal cells, and closely packed seminiferous tubules
Grade III	Injury exhibited disordered sloughed germinal cells with shrunken pyknotic nuclei and less distinct seminiferous tubule borders
Grade IV	Injury defined seminiferous tubules that were closely packed with coagulative necrosis of the germinal cells