

HENRIQUE RODRIGUES COELHO

**TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO:
Isquemia e reperfusão, avaliação toxicogenética e dos efeitos da
fosfatidilcolina em ensaio pré-clínico**

**CAMPO GRANDE
2016**

HENRIQUE RODRIGUES COELHO

**TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO:
Isquemia e reperfusão, avaliação toxicogenética e dos efeitos da
fosfatidilcolina em ensaio pré-clínico**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste aprovação em Mestrado no Programa de Pós graduação em Saude objetivando o título de mestre.

Área de concentração em Tecnologia e Saúde, Cultivo celular, terapia celular e engenharia tecidual

Orientadora: Prof. Doutora Andreia Conceição Milan Brochado Antoniolli Silva

Co-Orientador: Prof. Doutor Rodrigo Juliano de Oliveira

**CAMPO GRANDE
2016**

COELHO, Henrique Rodrigues

TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO: Isquemia e reperfusão, avaliação toxicogenética e dos efeitos da fosfatidilcolina em ensaio pré-clínico. Campo Grande – MS, 2016.

50p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Twisting of the spermatic cord: ischemia and reperfusion, toxicogenetic evaluation, and the effects of phosphatidylcholine in pre-clinical trials.

1. Antioxidante 2. Morte celular 3. Ensaio do cometa 4. Ensaio do micronúcleo 5. Histopatologia.

HENRIQUE RODRIGUES COELHO

**TORÇÃO DO CORDÃO ESPERMÁTICO:
ISQUEMIA E REPERFUSÃO, AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA E DOS EFEITOS
DA FOSFATIDILCOLINA EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, objetivando o título de Mestre.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Wilson de Barros Cantero
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Marco Antonio Gonçalves
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Antonio Urt Filho
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Aos meus pais, pelo amor incondicional e dedicação.

À minha esposa, companheira e apoio em todos os momentos.

Aos meus filhos, presentes de Deus e incentivo em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a Concretização desse grande sonho.

A Professora Doutora Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva do Programa de PósGraduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e minha orientadora, por seus ensinamentos.

Ao Professor Doutor Rodrigo Juliano Oliveira, Professor do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e meu co-orientador, pelo inestimável apoio na elaboração do método desta tese, auxiliando diretamente no experimento.

Ao Professor Mestre Gustavo Falcão, Professor Assistente da Disciplina de Anatomopatologia da UFMS pelo apoio incontestável na realização do estudo histopatológico.

Ao Professor Doutor Antonio Urt Filho, Professor Adjunto da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo incentivo e apoio na realização desta pesquisa.

Aos médicos residentes do Programa de Residência Médica em Urologia do Serviço de Urologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Guilherme Maffei Lemos e Alexandre Eustáquio Buzetti de Sá, pelo auxílio e colaboração no decorrer deste trabalho.

A minha querida Esposa Patricia Manoela Scherer Coelho que auxilio e companheirismo em todo tempo. Sou muito grato a Deus pela sua vida.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar o objetivo final.

A Deus, por tudo o que tenho e não tenho, e
a seu imenso, misericordioso e infinito amor.

RESUMO

Coelho, HR. Torção do cordão espermático: Isquemia e reperfusão, avaliação toxicogenética e dos efeitos da fosfatidilcolina em ensaio pré-clínico. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

A fosfatidilcolina é o principal fosfolipídio presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas e por isso é capaz de interferir em diversos processos biológicos. Esse mesmo lipídio também possui atividade antioxidante o que o indica para a proteção de danos causados por radicais livres em condições de isquemia/reperfusão. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar os danos toxicogenéticos causados pela torção do cordão espermático, na isquemia/reperfusão, bem como os efeitos da fosfatidilcolina nessa condição urológica em ensaio pré-clínico. Os resultados indicam que a torção do cordão espermático não causa danos genotóxicos e nem mutagênicos. A fosfatidilcolina na dose de 300mg/kg é tóxica e causa mortalidade o que contraindica a sua utilização. Já a dose de 150mg/kg não causa danos toxicogenéticos e não previne, de forma estatisticamente significativa, os danos teciduais causados de falta de nutrição e oxigenação das células testiculares, apesar de ocorrer uma tendência à redução dos mesmos. Diante disso a presente pesquisa sugere que novos estudos devem ser conduzidos para esclarecer essa tendência e os efeitos terapêuticos da fosfatidilcolina na citoproteção de células germinativas em testículos submetidos à isquemia/reperfusão visto que esse composto possui características que sugerem eficiência terapêutica.

Palavras-chave: antioxidante, morte celular, ensaio do cometa, ensaio do micronúcleo, histopatologia.

ABSTRACT

Coelho, HR. Twisting of the spermatic cord: ischemia and reperfusion, toxicogenetic evaluation, and the effects of phosphatidylcholine in pre-clinical trials. 2006. Essay - Graduate (Master's degree) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

Phosphatidylcholine is the main phospholipid present in cell membranes and in lipoproteins and thus is able to interfere in various biological processes. This lipid also has antioxidant activity, indicating protection from damage caused by free radicals under conditions of ischemia/reperfusion. Given the above, the present study aimed to evaluate toxicogenetic damage caused by twisting of the spermatic cord in ischemia/reperfusion and also if phosphatidylcholine plays a role in ischemia/reperfusion condition in preclinical trials. The results indicate that the spermatic cord torsion does not cause genotoxic damage nor mutagenic. The phosphatidylcholine at the dose of 300mg / kg is toxic and thus it's not recommended to use. However, the dose of 150mg / kg does not promote toxicogenetic damage and does not statistically prevent tissue damage occurred from lack of oxygenation and nutrition of testicular cells, although there was a tendency to reduce them. Therefore this research suggests that further studies should be conducted to clarify this tendency and also, to provide a better explanation on the possible therapeutic effects of phosphatidylcholine in cytoprotection of germ cells submitted to ischemia/reperfusion.

Keywords: antioxidant, cell death, comet assay, micronucleus assay, histopathology.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Deformidade em badalo de sino, com fixação anormal da túnica vaginal do testículo. Fonte: SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013, p. 836.	19
Figura 2. Conduta nos casos de escroto agudo e TCE. Fonte: DENES; SOUZA; SOUZA, 2006, p. 5.	20
Figura 3. Torção testicular com TCE visualizada. Fonte: SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013, p. 839.	20
Figura 4. Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio. Fonte: SILVA-JR, 2002, p. 97.	22
Figura 6. Parâmetros biométricos. Valores médios $\pm$ erro padrão da média do peso dos animais ao final do período experimental. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.	35
Figura 7. Danos genéticos. A – Frequência de células lesionadas no ensaio do cometa em sangue periférico. B – Escore no ensaio do cometa em sangue periférico. C – Frequência de células micronucleadas no ensaio do micronúcleo em sangue periférico. Teste Estatístico: ANOVA ($p > 0,05$).	36
Figura 8. Parâmetros histológicos e sobrevivência dos animais no período experimental. Escores médios $\pm$ erro padrão da frequência de danos histológicos segundo Cosentino et al (1986) e Urt-Filho et al. (2012). Teste Estatístico: Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Sobrevivência dos animais no período experimental. Teste Estatístico: Qui-quadrado ($p < 0,05$). *Indica diferenças estatisticamente significativas.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise histopatológica	37
--	----

LISTA DE ABREVIações

TCE – torção do cordão espermático

ATP – adenosina trifosfato

DNA – ácido desoxirribonucleico

NO -óxido nítrico

Ca⁺⁺/Na⁺ – cálcio/sódio

DNA/RNA - ácido desoxirribonucleico/ ácido ribonucleico

EC – estresse de contenção

TNF- α – fator de necrose tumoral – alfa

TNBS – trinitrobenzenossulfônico

PC – Fosfatidilcolina

FC – Fosfatidilcolina

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

p.c. – peso corpóreo

i.p. – intraperitoneal

USA – United States of America

T1 – tempo 1

T2 – tempo 2

T3 – tempo 3

T0 – tempo inicial

LPM – baixo ponto de fusão

HE – hematoxilina/eosina

EPM – erro padrão da média

NADH – nicotinamida adenina dinucleotideo ligada com hidrogênio

ADP/ATP – difosfato adenosina/ trifosfato adenosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Torção do cordão espermático – causas, diagnóstico e tratamento	18
2.2 Lesão de Isquemia/reperfusão	22
2.3 Fosfatidilcolina	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2. Objetivo Específico	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Agente químico	30
4.2 Animais	30
4.3 Delineamento experimental	30
4.4 Procedimento operatório	31
4.5 Ensaio biológicos	32
4.5.1. Avaliação toxicogenética	32
4.5.2. Ensaio do cometa	32
4.5.3. Ensaio do micronúcleo	33
4.6. Análise histopatológica	33
4.7. Análise estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Parâmetros biométricos	35
5.2 Avaliação toxicogenética	35
5.3 Análise histopatológica	36
6 DISCUSSÃO	38

7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	55
A - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	55
B - CARTA DE ACEITE DO ARTIGO.....	56
C - ARTIGO EM INGLÊS	57

1 INTRODUÇÃO

A torção de cordão espermático é caracterizada pela torção das estruturas do cordão espermático e subsequente perda do fornecimento de sangue ao testículo ipsilateral. Esta condição é considerada uma emergência urológica, que necessita de diagnóstico e tratamento precoces para preservação do testículo e fertilidade futura (TA *et al.*, 2016). Problemas relacionados à esterilidade infertilidade tem sido considerados como problemas de saúde pública (NACHTIGALL, 2006; MACALUSO *et al.*, 2010).

A torção do cordão espermático (TCE) é uma doença comum em adolescentes e recém-nascidos, sendo considerada a causa mais comum de perda testicular nestes grupos etários. A incidência mundial da TCE é calculada em 1 em 4.000 indivíduos com idade inferior a 25 anos (ANDERSON; WILLIAMSON, 1988; RINGDAHL; TEAGUE, 2006).

Alguns homens são mais propensos a esta condição devido à problemas no tecido conjuntivo dentro do escroto. A TCE também pode ocorrer após uma lesão no escroto que resulta em um grande inchaço, ou após exercícios pesados. Em alguns casos, não existe qualquer causa clara. A condição é mais comum durante o primeiro ano de vida e no início da adolescência, contudo, também pode ocorrer na idade adulta (WAMPLER; LIANES, 2010).

Os efeitos da TCE atingem não apenas o testículo envolvido, como também o lado contralateral e o prognóstico depende da gravidade da isquemia. Se a torção for completa e prolongada ocorre atrofia testicular. Se incompleta e com restabelecimento rápido da reperusão pode haver recuperação de parte do parenquimia viável. Contudo, pode ocorrer atrofia secundária. Em termos histológicos, a torção induz, no testículo contralateral, lesão focal dos túbulos seminíferos, caracterizada por apoptose e lesão das células germinativas, possivelmente mediada por resposta imunológica celular e humoral (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

O restabelecimento rápido do fluxo sanguíneo para o testículo isquêmico é fundamental nos casos de TCE. A viabilidade do testículo em casos de torção é difícil de prever. Assim, o tratamento cirúrgico é indicado por prevenir danos

isquêmicos ao testículo. O diagnóstico é clínico e testes de diagnóstico não devem implicar em atraso do tratamento (SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

O tratamento cirúrgico da TCE consiste na destorção manual do testículo e retorno do mesmo à sua posição anatômica e orquipexia (MANSBACH; FORBES; PETERS, 2005; BOLLN; DRIVER; YOUNGSON, 2006). No caso de ocorrência de necrose testicular a orquiectomia é indicada (SESSIONS *et al.*, 2003; ANDERSON; WILLIAMSON, 1988), bem como a orquipexia do testículo contralateral, por profilaxia (PRATER; OVERDORF, 1991; FILHO *et al.*, 2004).

A isquemia testicular generalizada, que pode ocorrer devido à torção do cordão espermático, se dá pela oclusão do retorno venoso que causa edema e ruptura vascular. Após, com a oclusão arterial impede-se a oxigenação e nutrição dos tecidos, podendo ocasionar morte das células germinativas, das células de Leydig e até mesmo necrose testicular. Ocorrem alterações histológicas no órgão que sofreu a isquemia e também no testículo contralateral causada pela reperfusão (JESUS, 2000).

A lesão causada pela reperfusão do testículo ocorre devido ao estresse oxidativo, marcado pelo aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio que causam peroxidação das membranas lipídicas levando a destruição celular por apoptose (DAVENPORT, 1996; FILHO *et al.*, 2004; AITKEN; ROMAN, 2008; LEE *et al.*, 2012). A junção destes eventos pode causar alteração no DNA (ácido desoxirribonucleico), pela desregulação de vias genéticas, alteração do ciclo e da proliferação celular com o aumento de eventos apoptóticos (WEI; YAN; ZHOU, 2013).

Uma possível forma de proteção contra essas espécies reativas é a defesa antioxidante endógena desempenhada, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase, glutational peroxidase, catalase e glutational-S-transferase (AITKEN; ROMAN, 2008). No entanto, no caso da TCE, onde há aumento da produção das espécies reativas, terapias a base de antioxidantes e/ou de compostos que sejam capazes de potencializar esses efeitos podem ser utilizados (WU *et al.*, 1993; LIEBER *et al.*, 1997; IKEDA *et al.*, 2011), como é o caso da fosfatidilcolina.

A fosfatidilcolina (FC) é o principal fosfolípido presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas e por isso é capaz de interferir em diversos processos biológicos (VAN MEER, 1989), sobretudo, porque os seus metabólitos são importantes mediadores da sinalização intracelular (CUI; HOUWELING, 2002), da

inflamação (EXTON, 1994; POMPÉIA ; CURY-BOAVENTURA; CURI, 2003) e da imunomodulação (COURRÈGES *et al.*, 2003).

Estudos relatam que a fosfatidilcolina aumenta a solubilidade do colesterol e, por isso, pode alterar a composição dos depósitos de gordura e inibir a agregação plaquetária, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (BIALECKA, 1997; BROOK, 1986; MEL'CHINSKAIA; GROMNATSKII; KIRICHENKO, 2000; ZEMAN; ZAK; STOLBA, 1995). Relata-se, também, o seu uso terapêutico em distúrbios mentais (GROWDON, 1987; ADIBHATLA; HATCHER 2007), na preservação de neurônios e em doenças hepáticas relacionadas ao uso abusivo de álcool (PANOS *et al.*, 1990; SCHULLER-PEREZ; SAN MARTIN, 1985; KNUCHEL, 1979), infecção viral, como nas hepatites, (MUETING; DOHN; REIKOWSKI, 1972; HIRAYAMA; OKAMURA; TANIKAWA, 1978; YANO; KOGA; SHIRAHAMA, 1978; KOSINA; BUDKA; KOLOUCH, 1992; JENKINS; PORTMANN; EDDLESTON, 1982; VISCO, 1985; HANTÁK *et al.*, 1990; TSYRKUNOV, 1992; FRIEDMAN; MARTIN; MUNOZ, 1996; KIDD, 1996) e no tratamento da tuberculose (MARPAUNG; TARIGAN; ZEIN, 1988; KUNTZ, 1989; KIDD, 1996).

Frente ao exposto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar os danos toxicogénéticos causados pela torção do cordão espermático, na isquemia e reperfusão, bem como os efeitos da fosfatidilcolina nessa condição urológica em ensaio pré-clínico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Torção do cordão espermático – causas, diagnóstico e tratamento

A torção do cordão espermático é responsável por aproximadamente 10%-15% dos casos de escroto agudo em crianças, e resulta em uma taxa de orquiectomia de 42% em meninos submetidos ao tratamento cirúrgico (ZHAO *et al.*, 2011; SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013; LIANG *et al.*, 2013).

A distribuição etária da torção testicular é bimodal, com um pico no período neonatal e outro pico no início da puberdade. Em recém-nascidos, a torção extravaginal é predominante (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006; CALLEWAERT; KERREBROECK, 2010; SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013), ela ocorre nos primeiros dias de vida, na fase final da fixação dos testículos (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006), apresenta inchaço escrotal, indolor, com ou sem inflamação aguda (SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

A viabilidade testicular em TCE neonatal é universalmente pobre; uma revisão de literatura de 18 séries de casos com 284 pacientes, encontrou uma taxa de recuperação de aproximadamente 9% (NANDI; MUHPHY, 2011). A orquipexia contralateral é recomendada no momento da exploração cirúrgica porque a etiologia da torção extravaginal permanece obscura (KYRIAZIS *et al.*, 2008; SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

A torção intravaginal ocorre em crianças maiores ou em adultos, tendo seu pico durante no início da puberdade. O principal sintoma é a dor, com início súbito de grande intensidade, sem relação a traumas ou exercícios físicos. O atendimento precoce facilita o diagnóstico, uma vez que o quadro inicial possibilita a melhor identificação das alterações do cordão espermático. O testículo pode estar elevado, fixo, com o epidídimo em posição medial (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006). O diagnóstico de exclusão da TCE é a presença do reflexo cremastérico (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006).

A deformidade em badalo de sino (figura 1), em que há fixação anormal da túnica vaginal do testículo, resulta em aumento da mobilidade do testículo dentro da túnica vaginal (SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).



Figura 1. Deformidade em badalo de sino, com fixação anormal da túnica vaginal do testículo. Fonte: SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013, p. 836.

Independentemente de a torção testicular ser intra ou extravaginal, ela inicialmente aumenta a pressão venosa e congestionamento, com consequente diminuição do fluxo sanguíneo arterial e isquemia. Embora os sintomas sejam tipicamente unilaterais, as condições anatômicas que predisõem à TCE devem ser presumidas como bilaterais (SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

O tratamento da TCE é cirúrgico, contudo, a destorção manual deve ser tentada quando a cirurgia não é uma opção imediata ou quando os preparativos para a exploração cirúrgica estão sendo realizados, mas esse procedimento não deve substituir ou retardar a intervenção cirúrgica (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006; SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

O ponto final subjetivo é o alívio da dor, embora a administração de analgésicos possa limitar a utilidade desta medida. O retorno do fluxo de sanguíneo ao testículo na ultrassonografia Doppler serve como um ponto final objetivo e deve ser sempre documentada. No entanto, a hiperemia relativa e os padrões de fluxo vascular alterados em um testículo recém-revascularizado podem obscurecer os resultados da ultrassonografia (SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

A figura 2 apresenta uma conduta para os casos de escroto agudo e TCE.

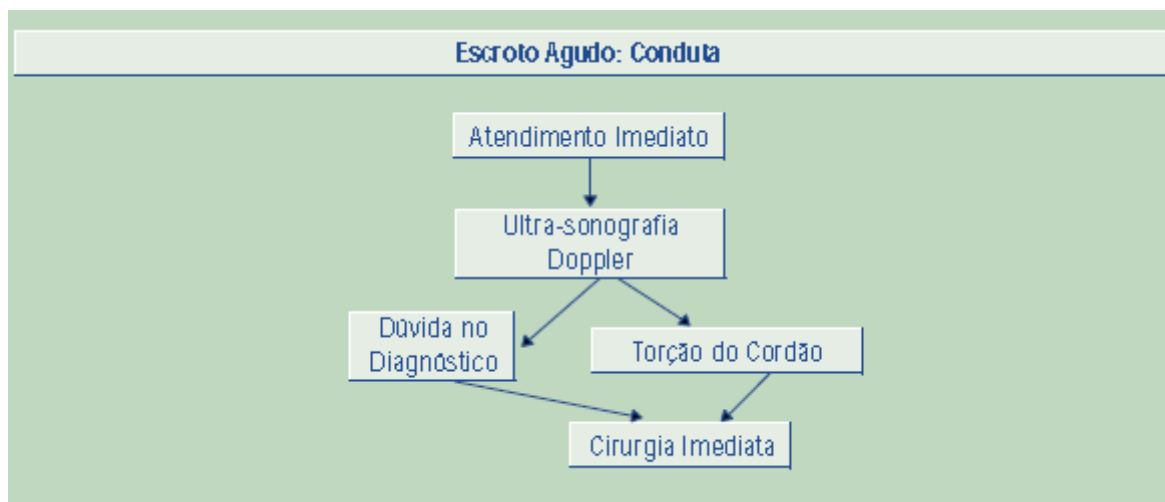


Figura 2. Conduta nos casos de escroto agudo e TCE. Fonte: DENES; SOUZA; SOUZA, 2006, p. 5.

Na fase pré-operatória dos casos de TCE, os pacientes devem ser orientados sobre a necessidade potencial de uma orquiectomia como parte do consentimento informado cirúrgico. Uma abordagem cirúrgica transescrotal é tipicamente utilizada para visualização do testículo afetado no campo operatório (figura 3). A destorção do cordão espermático afetado é realizada até que não haja mais nenhuma torção visível, e a viabilidade testicular tenha sido avaliada (SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).



Figura 3. Torção testicular com TCE visualizada. Fonte: SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013, p. 839.

A orquiectomia deve ser realizada quando o testículo afetado aparece necrótico ou não viável. As taxas de orquiectomia variam amplamente na literatura, tipicamente entre 39% a 71% na maioria das séries (YANG *et al.*, 2011; KAYE *et al.*, 2008).

A perda de testículo pode atingir 100% nos casos em que o diagnóstico não é realizado precocemente, enfatizando a necessidade de manter um elevado índice de suspeita de TCE nos casos de dor escrotal (BAYNE *et al.*, 2010). Quando o testículo afetado é considerado viável, a orquipexia com sutura permanente deve ser realizada para fixar permanentemente o testículo no escroto. A orquipexia contralateral deve ser realizada independentemente da viabilidade do testículo afetado (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006; SHARP; KIERAN; ARLEN, 2013).

A abordagem em casos de torção em testículo criptorquídico deve ser por via inguinal. Testículos inviáveis devem ser removidos por causa dos efeitos deletérios sobre o testículo normal (DENES; SOUZA; SOUZA, 2006).

DENES; SOUZA; SOUZA, (2006) afirmaram que um terço dos pacientes com escroto agudo apresentam TCE. Manobras manuais no atendimento precoce podem reposicionar o testículo, desfazendo a torção com alívio imediato da dor. Contudo, a torção parcial pode persistir e estes pacientes devem ser operados logo que possível. A incisão deve ser realizada na rafe da bolsa, o que permite acesso a ambos os compartimentos escrotais. A viabilidade do testículo torcido deve ser avaliada e o mesmo é fixado por três pontos à parede. A orquipexia contralateral é recomendada e pode ser realizada por meio da mesma incisão. A torção em testículo criptorquídico deve ser abordada por via inguinal. Testículos inviáveis devem ser removidos devido aos efeitos deletérios sobre o testículo normal.

LORENZINI *et al.* (2012) determinaram se a TCE provoca efeitos tardios sobre a espermatogênese do testículo contralateral e se a orquiepidimectomia do testículo torcido poderia preveni-los, usando parâmetros específicos da espermatogênese para elucidar os resultados conflitantes na literatura. Foram selecionados, aleatoriamente, 74 ratos machos púberes da linhagem Wistar. O grupo experimental foi formado por 40 ratos divididos em 4 subgrupos, submetidos a torção anti-horária de 1,080 graus do testículo esquerdo e sua fixação escrotal no início do experimento e à orquiepidimectomia esquerda com um, 5, 10 e 90 dias, respectivamente. O grupo controle foi formado por 24 ratos divididos em 4 subgrupos de cirurgias simuladas. Um grupo controle adicional foi formado pelos 10 ratos restantes

submetidos unicamente à orquiepidimectomia esquerda no início do experimento. Aos 90 dias, os testículos contralaterais dos subgrupos experimentais e controles foram coletados para avaliação dos parâmetros de suas espermatogêneses: peso testicular, diâmetro do túbulo seminífero, graduação de Johnsen e contagem diferencial de células germinativas. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os subgrupos experimentais e controles para todos os parâmetros analisados da espermatogênese dos testículos contralaterais. Os autores concluíram que TCE não causa efeitos tardios sobre a espermatogênese do testículo contralateral em ratos púberes e a orquiepidimectomia do testículo torcido não é necessária para fins preventivos da espermatogênese contralateral.

2.2 Lesão de Isquemia/reperfusão

A isquemia é responsável por alterações morfológicas e bioquímicas a nível testicular, implicando no aumento da produção de radicais livres de oxigênio e de azoto, num processo semelhante ao que ocorre em outros órgãos como o cérebro ou coração (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

As consequências da lesão de isquemia/reperfusão em diferentes tecidos dependem de sua duração, além disso, muitas lesões desenvolvem-se durante o estágio de reoxigenação devido à reperfusão tecidual (vide figura 4).

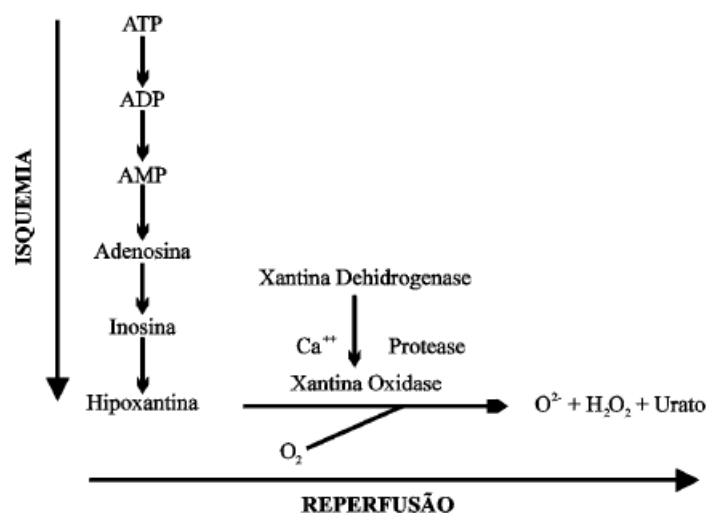


Figura 4. Mecanismo proposto para geração de radicais livres de oxigênio. Fonte: SILVA-JR, 2002, p. 97

A restauração do fluxo sanguíneo a um órgão isquêmico é essencial para a prevenção de lesões celulares irreversíveis, mas, a reperfusão por si só pode agravar o dano celular isquêmico. Os danos celulares após a reperfusão dos tecidos isquêmicos anteriormente viáveis são definidos como lesão de isquemia/reperfusão (COLLARD; GELMAN, 2001).

O termo lesão de isquemia/reperfusão descreve alterações funcionais e estruturais, que podem ser observadas com o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia. Essa lesão pode resultar em um número de efeitos deletérios, tais como (EVORA *et al.*, 1996):

- a) Necrose de células irreversivelmente lesadas;
- b) Acentuado edema celular (*cell swelling*);
- c) Restauração não uniforme do fluxo para todas as porções de tecido.

A interrupção do fluxo sanguíneo tissular afeta uma série de processos metabólicos e enzimáticos. As reservas de ATP (adenosina trifosfato) são rapidamente depletadas, e ocorre um acúmulo de lactato, a célula fica acidótica e são ativadas proteases intracelulares. Também ocorre um aumento da permeabilidade capilar que causa o edema tissular (EVORA *et al.*, 1996).

Segundo EVORA *et al.* (1996), a patogênese da lesão de isquemia/reperfusão compreende três observações básicas:

- a) O comprometimento do relaxamento vascular observado após isquemia/reperfusão afeta, primariamente, os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio;
- b) Sequestradores (*scavengers*) de radicais livres do oxigênio limitam a lesão de reperfusão;
- c) O bloqueio da ativação e adesão dos neutrófilos podem reduzir a lesão de isquemia/reperfusão.

Os radicais livres podem causar danos significativos em casos de lesão de isquemia/reperfusão, por meio de uma variedade de mecanismos, tais como (EVORA *et al.*, 1996):

- a) Peroxidação dos ácidos graxos através das membranas celulares;
- b) Oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzimas;

- c) Alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida;
- d) Direta inativação do óxido nítrico (NO), comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio;
- e) Formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com NO;
- f) Ativação de citocinas como a interleucina-1.

A isquemia induz a um estado pró-inflamatório que aumenta a vulnerabilidade dos tecidos a um novo prejuízo na reperfusão (COLLARD; GELMAN, 2001). Segundo EVORA *et al.* (1996), processos de inflamação, trombose e fatores de crescimento podem influenciar o processo de isquemia/reperfusão.

A modificação da lesão de isquemia/reperfusão inclui os seguintes mecanismos (EVORA *et al.*, 1996):

- O paradoxo do oxigênio responsabilizado pela produção de radicais livres;
- O paradoxo do cálcio com grande influxo celular deste íon;
- Disfunção endotelial com comprometimento do tono vascular; e
- Ativação e adesão de neutrófilos.

SILVA-JR. *et al.* (2002) afirmaram que existe uma sequência de eventos que podem relacionar a lesão de isquemia/reperfusão com a lesão inflamatória, conforme o esquema apresentado na figura 5.

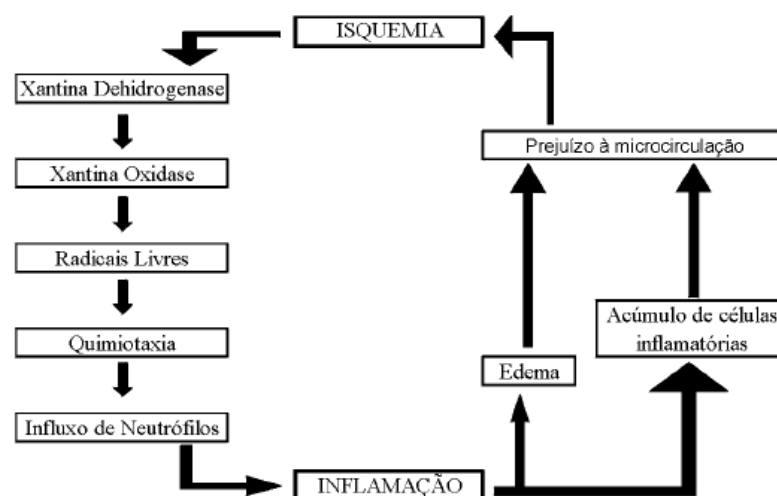


Figura 5. Sequência de eventos relacionando a lesão de isquemia/reperfusão e a lesão inflamatória. Fonte: SILVA-JR. *et al.*, 2002, p. 98.

O tempo entre a isquemia e a reperfusão é fundamental, pois nesse período podem ocorrer desde simples alterações bioquímicas até necrose celular. As principais alterações celulares induzidas pela lesão de isquemia/reperfusão são (SILVA-JR. *et al.*, 2002):

- Alteração do potencial de membrana;
- Alteração da distribuição de íons – aumento da relação $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$ (cálcio/sódio) intracelular;
- Edema celular;
- Desorganização do citoesqueleto de órgãos e tecidos;
- Diminuição da fosfocreatina;
- Acidose celular.

A terapia antioxidante tem sido considerada eficaz na prevenção ou atenuação de lesões de isquemia/reperfusão, incluindo o uso de superóxido dismutase, catalase, manitol, alopurinol, vitamina E, n- acetilcisteína, compostos quelantes de ferro, inibidores da enzima conversora da angiotensina ou dos canais de cálcio antagonistas. Apesar dos resultados promissores da terapia antioxidante com animais, os resultados desta terapia na atenuação da lesão de isquemia/reperfusão em seres humanos ainda são ambíguos. Mas, uma quantidade considerável de dados clínicos e experimentais apoiam o papel do estresse oxidativo na lesão de isquemia/reperfusão e enfatizam a importância de mecanismos de defesa antioxidante na proteção dos tecidos (COLLARD; GELMAN, 2001).

A lesão de isquemia/reperfusão resulta numa resposta inflamatória local e sistêmica, e em sua forma mais grave pode resultar em disfunção de múltiplos órgãos ou morte. Apesar de a reperfusão atempada da área isquêmica em risco ser o padrão ouro da prática clínica, estratégias terapêuticas, tais como pré-condicionamento isquêmico, reperfusão controlada e antioxidantes, terapia de neutrófilos podem impedir significativamente ou limitar as lesões de isquemia/reperfusão em seres humanos (COLLARD; GELMAN, 2001).

URT FILHO *et al.* (2012) avaliaram os efeitos do propofol como inibidor da lesão tecidual na isquemia-reperfusão testicular em ratos. Participaram do estudo 30 ratos Wistar que foram distribuídos em 3 grupos de 10 animais. No grupo 1: apenas exposição testicular; Grupo 2 e Grupo 3: isquemia testicular por torção do cordão

espermático esquerdo a 720°. No grupo 3, 45 minutos após a torção do cordão espermático foi administrado propofol 20mg/kg/hora via intraperitoneal. Após 60 minutos, nos grupos 2 e 3 foram desfeitas as torções dos cordões espermáticos e em seguida os testículos dos animais dos 3 grupos foram reposicionados no escroto. Após 90 dias foi realizada a orquiectomia bilateral para análise histológica. Os resultados demonstraram que nos túbulos seminíferos do grupo 1 não foram observadas anormalidades. Nos túbulos seminíferos do grupo 2, as anormalidades foram de 86,6% nos testículos esquerdos e 67,8% nos testículos direitos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 3 quando foram comparados os testículos. Os autores concluíram que o propofol minimiza a lesão tecidual em testículos de ratos submetidos à isquemia-reperfusão TCE.

2.3 Fosfatidilcolina

A fosfatidilcolina é um fosfolípido amplamente existente em animais, plantas, leveduras e fungos, também é chamada de lecitina. A fosfatidilcolina é o principal fosfolípido presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas e por isso é capaz de interferir em diversos processos biológicos. Esse mesmo lipídio também possui atividade antioxidante o que o indica para a proteção de danos causados por radicais livres em condições de isquemia/reperfusão (LEE; WENG; SU, 2015).

A lesão de isquemia/reperfusão que ocorre com a TCE promove a liberação de radicais livres (LEE *et al.*, 2012), e pode provocar danos no DNA/RNA (ácido desoxirribonucleico/ácido ribonucleico) (FIMOGNARI, 2015; NIKITAKI *et al.*, 2015) e, também, pode provocar peroxidação lipídica da membrana celular o que implica em uma ativação da via de apoptose celular (ACEVEDO-MORANTES *et al.*, 2012).

A fosfatidilcolina tem sido fonte de diversos estudos (DEMIRBILEK *et al.*, 2004; GHYCZY, 2008; TOKÉS *et al.*, 2011; KOVÁCS *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013), contudo, nenhum deste analisou os efeitos da fosfatidilcolina sobre a torção do cordão espermático de ratos.

DEMIRBILEK *et al.* (2004) investigaram se a fosfatidilcolina poli-insaturada (PCP) de pré-tratamento tem qualquer efeito protetor sobre a lesão da mucosa gástrica induzida pelo estresse de contenção (EC) em ratos. Participaram do estudo 40 ratos suíços albinos que foram divididos em 3 grupos: grupo 1 (n=10) foi o controle; grupo 2 (n=15) úlcera de estresse; grupo 3 (n=15) estresse de contenção

durante 4 horas a 4°C, após um período de jejum de 72 horas. Nos ratos do grupo 3, o tratamento com PCP foi iniciado 10 dias antes da contenção, a uma dosagem de 100mg/dia, por via oral. Os resultados do estudo mostraram que o tratamento prévio com PCP apresenta um efeito protetor sobre a lesão da mucosa gástrica induzida pelo estresse de contenção e pode ser útil na prevenção de úlceras gástricas induzidas por estresse.

GHYCZY (2008) afirmaram a administração dietética de fosfatidilcolina pode proteger a mucosa do intestino delgado após isquemia e reperfusão devido à sua atuação como agente anti-inflamatório.

TOKÉS *et al.* (2011) caracterizaram as propriedades neuroprotetoras da fosfatidilcolina administrada por via oral em um modelo animal (roedor) da inflamação sistêmica. Os autores concluíram que a suplementação com fosfatidilcolina não reduziu a extensão total da ativação inflamatória periférica, mas foi eficiente no combate a neurogênese perturbada, diminuindo as concentrações circulantes de TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa).

KOVÁCS *et al.* (2012) realizaram um estudo para seguir o curso do tempo de ativação inflamatória em um modelo de roedor com colite induzida por ácido 2,4,6 – trinitrobenzenossulfônico (TNBS). A hipótese do estudo foi de que dietas que incluem PC (fosfatidilcolina) oral no período pré-tratamento podem influenciar reações microcirculatórias mediadas por leucócitos nesta condição. No grupo I, ratos Wistar foram monitorizados 1 dia após a indução da colite (n=24), e no grupo II (n=24) no sexto dia após a indução da colite. Os animais pré-tratados com PC receberam uma dieta enriquecida com 2% de PC durante 6 dias antes do enema de TNBS (grupo I), ou durante 3 dias antes e 3 dias após o TNBS (grupo II). Os resultados mostraram que a PC dietética diminui a progressão eficiente mediada por citoquina de eventos inflamatórios e preservou a estrutura microvascular no intestino grosso.

LEE *et al.* (2013) ao estudaram os potenciais efeitos protetores da PC sobre o dano renal induzido pela cisplatina em ratos. A análise foi realizada por meio da avaliação da creatinina sérica, ureia, peroxidação lipídica, glutathione total, atividade da glutathione peroxidase, atividade catalase, atividade da enzima superóxido dismutase e mudanças histopatológicas. Os resultados dessas análises mostraram que a fosfatidilcolina apresentou resultados positivos. Além disso, a PC também diminuiu a degeneração tubular e hipertrofia dos glomérulos. A PC pode ter um

efeito protetor contra a nefrotoxicidade induzida por cisplatina em ratos por meio do aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

A fosfatidilcolina consiste num extrato purificado, originado da Lecitina, com 10-20% da mesma, e fornece Colina para o organismo. É uma molécula composta de ácidos saturados, insaturados e/ou poliinsaturados denominados fosfolípidos ou fosfatídeos (DEMIRBILEK *et al.*, 2004; GHYCZY, 2008).

A fosfatidilcolina (FC, 1,2 diacil-glicerol-3 fosfocolina) é um ácido graxo poliinsaturado que constitui 40 a 60% de membrana de organelas celulares como a mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso, complexo de golgi e núcleo. A fosfatidilcolina foi estudada anteriormente em isquemia/reperfusão intestinal (GHYCZY, 2008), diminuição do estresse oxidativo em sepse severa em ratos (DEMIRBILEK *et al.*, 2004), Lesão isquêmica renal (LEE *et al.*, 2013) e isquemia/reperfusão em tecido cerebral (AABDALLAH; EID, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da fosfatidilconina em testículos de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia e reperfusão por meio da torção de cordão espermático.

3.2. Objetivo Específico

Avaliar as alterações histopatológicas de testículos de ratos submetidos a torção de cordão espermático seguida de reperfusão, sob ação da fosfatidilcolina.

Avaliar o efeito toxicogenético através do ensaio do cometa e do micronúcleo em ratos submetidos a torção de cordão espermático sob ação da fosfatidilcolina

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Agente químico

A fosfatidilcolina (Lipostabil®, Laboratório Aventis, Lote 1726) foi utilizada nas doses de 150 e 300mg/kg de peso corpóreo (p.c.), via intraperitoneal (i.p.), administrada em dose única.

4.2 Animais

Foram utilizados vinte e um *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso médio de 460g, oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os animais foram alojados, em duplas ou trios, em caixas de polipropileno forradas com maravalha e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. As caixas foram mantidas em estante sob condições padronizadas de climatização com fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro), temperatura em torno de 22±2°C e umidade relativa de 55±10%. O experimento foi conduzido em concordância com as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o protocolo #509/2013.

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=7 animais/grupo): (I) Grupo Controle ou Isquemia/Reperusão – os animais tiveram o testículo esquerdo exteriorizado e o cordão espermático torcido em 720°, no sentido horário (interno), e mantido dessa forma em recipiente com solução salina à 0,9%, em temperatura ambiente, pelo período de 2 horas, quando o cordão foi destorcido e o testículo reposicionado no escroto. Em seguida, fez-se a sutura da incisão com pontos contínuos em plano único. Quinze minutos antes do reposicionamento

testicular fez-se uma aplicação de solução salina na proporção de 1,0ml/100g (p.c., i.p); (II) Grupo Fosfatidilcolina 150mg/kg (FC150) e (III) Grupo Fosfatidilcolina 300mg/kg (FC300) – os animais passam pelos mesmos procedimentos relatados para o grupo Controle, no entanto, a solução salina administrada intraperitonealmente foi substituída por fosfatidilcolina nas doses de 150 e 300mg/kg, respectivamente.

A eutanásia dos animais ocorreu 60 dias após a administração da fosfatidilcolina ou solução salina 0,9% por dose excessiva de anestésico (cloridrato de quetamina - Laboratório Fort Godge, USA) após a coleta dos testículos destinados à avaliação histopatológica.

4.4 Procedimento operatório

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. Após a obtenção do plano anestésico, procedeu-se a tricotomia da região inguinal esquerda. Em seguida, os animais foram posicionados em prancha cirúrgica em decúbito dorsal, realizou-se a antissepsia da região com solução aquosa de clorexidina (1%), colocação de campo estéril fenestrado e subsequente inguinotomia.

A via de acesso foi por incisão oblíqua de aproximadamente 1,5cm, na região inguinal esquerda, 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 esquerdo.

O testículo esquerdo foi exteriorizado e o cordão espermático torcido manualmente com duas voltas em torno do seu próprio eixo (cerca de 720°), no sentido horário, e mantido dessa forma em recipiente com 10ml de solução salina à 0,9%, em temperatura ambiente, pelo período de 2 hora. Em seguida, o testículo foi reposicionado na hemibolsa esquerda e a síntese da ferida foi realizada com pontos contínuos, em plano único, com fio de nylon 3-0 ethicon®.

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1. Avaliação toxicogenética

Vinte e quatro horas após a administração da fosfatidilcolina ou da solução salina 0,9% (T1) coletou-se duas amostras de sangue periférico, de 20µL cada, por punção da veia caudal, para realização do ensaio do cometa e micronúcleo. Novas coletas de sangue periférico (20µL) foram realizadas para o ensaio do micronúcleo também em 48h (T2) e 72h (T3) após a administração da fosfatidilcolina ou solução salina 0,9%.

4.5.2. Ensaio do cometa

Foi realizado o ensaio do cometa segundo as descrições de SINGH *et al.* (1988) com modificações de OLIVEIRA *et al.* (2015). Homogeneizou-se 20µL de sangue periférico em 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (LPM) (0,75%). Em seguida essa solução foi depositada em lâminas previamente cobertas com agarose normal (1,5%). Recobriu-se o material biológico com lamínula de vidro. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a 4°C por 20 minutos. Fez-se então a remoção das lamínulas e a imersão das mesmas em solução de lise recentemente preparada, por 1 hora, à temperatura de 4°C, protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese com tampão de pH >13,0 por um período de 20 minutos à 4°C para desnaturação do DNA. Seguiu-se a eletroforese à 25,0V e 300,0mA (1,25V/cm) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl), durante 3 ciclos de 5 minutos cada, secas ao ar livre e fixadas com álcool etílico absoluto por 10 minutos. O material foi corado posteriormente (100,0µL de brometo de etídio - 20×10^{-3} mg/mL) e analisado em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L2000) em aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Como descrito por KOBAYASHI *et al.* (1995), analisou-se 100 células por animal classificando-se os cometas em: (classe 0) células não danificadas que não apresentam cauda; (classe

1) células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; (classe 2) células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; (classe 3) células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Células apoptóticas, que apresentavam nucleóide totalmente fragmentado, não foram contabilizadas. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão às quais pertenciam pelo valor da classe.

4.5.3. Ensaio do micronúcleo

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi realizado segundo HAYASHI *et al.* (1990) com modificações de OLIVEIRA *et al.* (2015). Uma alíquota de 20µL de sangue periférico foi colocada sobre uma lâmina previamente recoberta por 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Em seguida, depositou-se uma lamínula sobre o material biológico. A lâmina permaneceu em freezer (–20°C) por um período mínimo de duas semanas. A análise foi realizada em microscópio de Epifluorescência (Bioval®, Modelo L2000), no aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram analisadas 2.000 células por animal.

4.6. Análise histopatológica

Após o período experimental de 60 dias, os testículos dos animais foram coletados, fixados em e mantidos em formalina tamponada 10% por 48 horas. Em seguida, foram seccionados em plano sagital e preparados segundo práticas de rotina histopatológica. Resumidamente, após fixação, os fragmentos de tecidos foram desidratados, limpos e impregnados em parafina. As amostras foram cortadas em micrótomo (5µm de espessura) e corados com hematoxilina/eosina (HE) para análise histopatológica em microscopia de campo claro com aumento de 1.000x (Nikon®; Modelo Eclipse e-200).

A avaliação histopatológica foi realizada em modelo duplo-cego e segundo escala de lesões proposta por COSENTINO *et al.* (1985) e modificada por URT-FILHO *et al.* (2012) sendo as lesões classificadas em: (I) Grau 1 quando apresentava arquitetura testicular normal e arranjo ordenado de células

germinativas; (II) Grau 2 quando apresentava menor organização histológica, perda da coesão entre as células germinativas e túbulos seminíferos fechados; (III) Grau 3 definido quando observa-se maior desorganização da arquitetura testicular, células germinativas com núcleo picnótico e retraído, além de túbulos seminíferos com bordos mal definidos; e (IV) Grau 4 quando os túbulos seminíferos apresentavam-se ocluídos e necrose coagulativa de células germinativas.

4.7. Análise estatística

Os valores apresentados foram expressos em média $\pm$ EPM (Erro Padrão da Média) ou porcentagem. Os dados foram analisados por ANOVA/Tukey, Kruskal-Wallis e Qui-quadrado segundo a natureza e distribuição pelo *software GraphPad Prism* (Version 3.02; *Graph-Pad Software Inc.*, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros biométricos

Os animais experimentais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controles e os grupos tratados com FC. No entanto, há uma redução do peso de FC300 se comparado com FC150 ($p < 0,05$) (Figura 6).

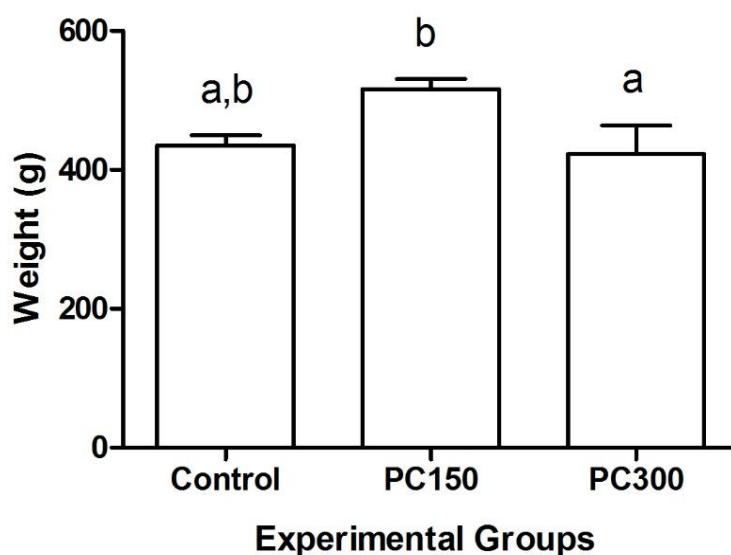


Figura 6. Parâmetros biométricos. Valores médios $\pm$ erro padrão da média do peso dos animais ao final do período experimental. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

5.2 Avaliação toxicogenética

A frequência de lesões genéticas, avaliadas tanto pelo ensaio do cometa quanto pelo ensaio do micronúcleo, demonstraram que nem a torção testicular e nem o tratamento com a fosfatidilcolina, nas duas concentrações testadas, não causaram danos genotóxicos e nem mutagênicos (Figura 7).

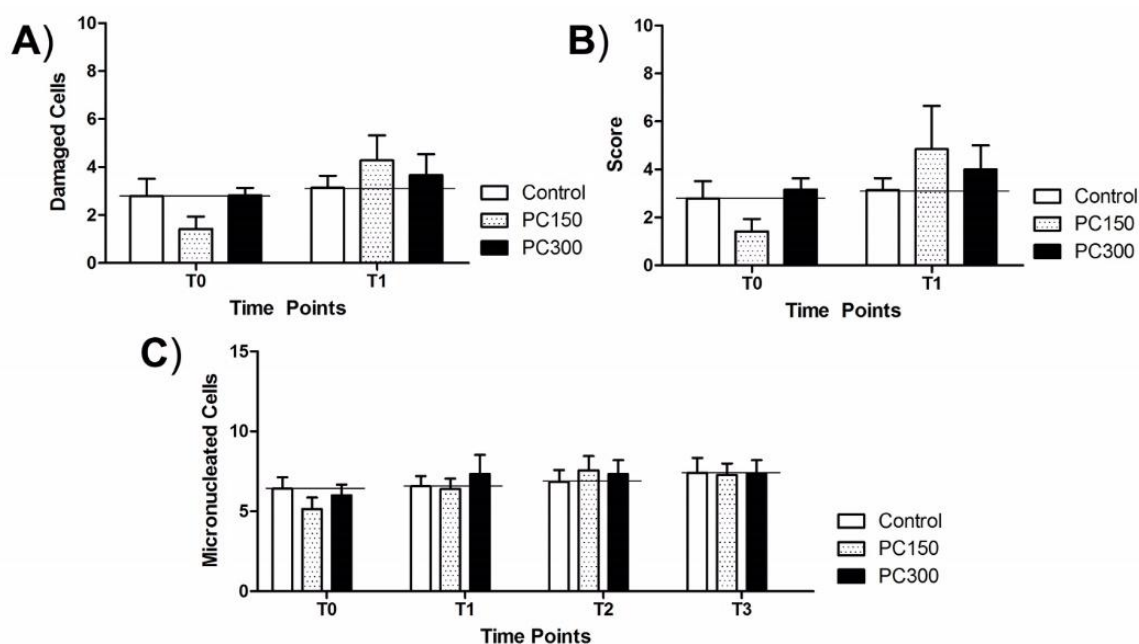


Figura 7. Danos genéticos. A – Frequência de células lesionadas no ensaio do cometa em sangue periférico. B – Escore no ensaio do cometa em sangue periférico. C – Frequência de células micronucleadas no ensaio do micronúcleo em sangue periférico. Teste Estatístico: ANOVA ($p > 0,05$).

5.3 Análise histopatológica

A histologia demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativas entre os diferentes grupos testados. No grupo FC150 observou-se viabilidade de 100% dos animais experimentais e uma tendência à redução de danos histológicos indicando importante resultado biológico. Já no grupo FC300 a redução de danos histológicos foi menor e, além disso, houve uma mortalidade de 57,14% (Figura 8).

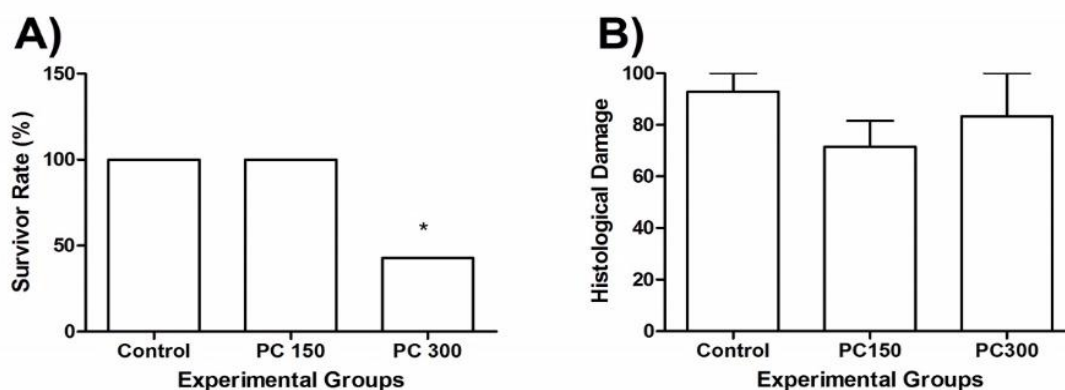


Figura 8. Parâmetros histológicos e sobrevivência dos animais no período experimental. Escores médios $\pm$ erro padrão da frequência de danos

histológicos segundo Cosentino et al (1986) e Urt-Filho et al. (2012).
 Teste Estatístico: Kruskal-Wallis ($p>0,05$). Sobrevivência dos animais no
 período experimental. Teste Estatístico: Qui-quadrado ($p<0,05$). *Indica
 diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 1: Análise histopatológica

Grupos experimentais	Score	Classe de Danos			
		Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Controle	185,71± 41,85 ^a	7,14±7,14	42,85±17,0 0	0	42,85±20,2 0
Grupo 150 mg/Kg	100,00± 34,50 ^a	28,57±10,1 0	42,85±13,0 4	7,14±7,1 4	21,42±14,8 6
Grupo 300 mg/Kg	216,66±83,33 ^a	16,66±16,6 6	16,66±16,6 6	7,14±7,1 4	66,66±33,3 3

Parâmetros histológicos dos animais no período experimental. Escores médios ± erro padrão da
 frequência de danos histológicos segundo Cosentino et al (1986) e Urt-Filho et al. (2012). Teste
 Estatístico: Kruskal-Wallis ($p>0,05$). Teste Estatístico: Qui-quadrado ($p<0,05$). *Indica diferenças
 estatisticamente significativas.

6 DISCUSSÃO

A TCE é uma condição de emergência clínica amplamente abordada na literatura científica (BARTSCH *et al.*, 1980; GUIMARÃES *et al.*, 2007; WEIN *et al.*, 2007; GHYCZY, 2008), sendo que pode ocorrer sem qualquer evento precipitante (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

A TCE leva a interrupção do retorno venoso, edema, hemorragia e ruptura do parênquima intratesticular seguida de oclusão arterial com total isquemia do órgão. Portanto o atraso no diagnóstico e na realização do tratamento adequado pode levar a necrose testicular, redução da fertilidade de 50 a 95 % infertilidade (GUIMARÃES, VASCONCELOS, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2009) e aumento a incidência de neoplasia testicular (CHILVERS; PIKE; PECKHAM, 1987).

A torção testicular pode ocorrer sem qualquer evento precipitante. Mas, tem sido sugerido como um possível fator desencadeante de TCE a diminuição da temperatura e da humidade do ar. A princípio ocorre a obstrução do retorno venoso e a evolução do quadro clínico compromete o fluxo arterial e implica em isquemia testicular. As lesões isquêmicas podem ser observadas nas primeiras quatro horas após o início da torção, e após 24 horas ainda estão presentes. O tempo de isquemia está diretamente relacionado com a viabilidade testicular (90% se <6h; 50% após 12h; e <10% se superior a 24h) (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

A TCE afeta o testículo envolvido e, também, o contralateral e seu prognóstico depende da gravidade da isquemia aguda. No caso de isquemia completa e prolongada pode ocorrer atrofia testicular. No caso de isquemia incompleta e com reperfusão, pode ocorrer recuperação de parte do parênquima testicular, contudo, também pode haver atrofia secundária (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

São crescentes os casos de esterilidade e infertilidade o que tem agravado essas importantes questões de saúde pública em escala global (NACHTIGALL, 2006). Dentre as causas citam-se os fatores genéticos, os ambientais e os idiopáticos (MACALUSO *et al.*, 2010). Algumas doenças urológicas também são incluídas nesse rol tais como as infecções do trato urogenital (SOBINOFF *et al.*, 2015), a criptorquidia (CHUNG; BROCK, 2011), a varicocele (RAMAN; WLAMSLEY, 2005; SHAFI *et al.*, 2014) e a torção do cordão espermático mediada pelos processos de isquemia/reperfusão (MARKEY *et al.*, 1994; AHMED *et al.*, 2000).

Nesse último caso, os estudos abrangem principalmente os efeitos da isquemia, e por consequência também da hipóxia, sobre as células germinativas, os danos no testículo contralateral e a reperfusão (ANTONIOELLI-SILVA *et al.*, 2005; KAR *et al.*, 2010; SCHANAIDER; ALEX; ERRICO, 2001).

Os protocolos e resultados descritos na literatura são diversos, o que dificulta a comparação dos dados, principalmente no que se refere à forma com que se promove a isquemia, que pode ser por meio da torção do cordão espermático, em diferentes graus variando de 180° a 1080°, ou até pela ligadura da artéria espermática (HARRISON; OETTLÉ, 1950; LUDWIG; HASELBERGER, 1979; SESSIONS *et al.*, 2003). No entanto, o modelo mais utilizado é o rato adulto, quando se pretende avaliar os efeitos da isquemia/reperfusão na espermatogênese (PAKYZ *et al.*, 1990; KAMADA *et al.*, 1993; ANTONIOELLI-SILVA *et al.*, 2005), com torção é de 720° por um período de 1 a 6 horas com danos persistentes por mais de 60 dias ou até mesmo irreversíveis (STEINBERGER; TIJOE, 1969; NAGLER; WHITE, 1982; BECKER; TURNER, 1995). Frente ao exposto, na presente pesquisa optou pelo protocolo de ANTONIOELLI-SILVA *et al.* (2005) com modificações, sendo o tempo de isquemia de 2 horas.

Segundo o estudo de TURNER; BROW (1993), após, no mínimo, uma hora os danos teciduais da isquemia podem ser quantificados no testículo. Logo, períodos em torno de uma hora são indicados para o desenvolvimento de terapias antioxidantes nas quais se pretende citoproteção para as células germinativas. Nesse intuito, a presente pesquisa utilizou a fosfatidilcolina que é um composto capaz de desenvolver atividade antioxidante visto que diversos tipos de lipídeos possuem essa propriedade (NWOSU; BOYD; SHELDON, 1997).

Na torção do cordão espermático, devido ao fenômeno de isquemia e reperfusão, ocorre a liberação de radicais livres (LEE *et al.*, 2012). Em geral, esses podem causar danos no DNA/RNA (FIMOIGNARI, 2015; NIKITAKI *et al.*, 2015) e peroxidação lipídica da membrana celular que ativa a via de apoptose celular (ACEVEDO-MORANTES *et al.*, 2012). No entanto, a literatura com enfoque em doenças urológicas e fertilidade correlacionada com danos genéticos é escassa. Por isso, esse estudo é pioneiro em correlacionar a ausência de alterações genéticas (genotóxicas e mutagênicas) e o evento de isquemia/reperfusão testicular, visto que a comparação de lesões genéticas antes (T0) e 24, 48 e 72 horas após o processo de isquemia/reperfusão (T1, T2 e T3, respectivamente) não modificaram as

frequências de cometa (frequência de células lesionadas e escore das classes) e nem a frequência de micronúcleos. Assim, sugere-se que apesar da literatura indicar aumentos dos níveis de radicais livres, a ponto de alterar o epitélio germinativo, essas concentrações não são suficientes para causar danos no DNA, em sangue periférico, quando esse é avaliado pelos ensaios de cometa e micronúcleo, dois importantes biomarcadores da área de genética toxicológica (VASQUEZ, 2010) e utilizados inclusive por agências regulatórias para avaliação de toxicidade e biomonitoramento, inclusive humano (MAFFEI *et al.*, 2005). Destaca-se ainda que esses ensaios quando associados a estudos de teratogenicidade e letal dominante, por exemplo, são importantes para correlação da redução da fertilidade e do aumento de alterações no desempenho reprodutivo e no desenvolvimento embrionário (MOREIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009; AUHAREK *et al.*, 2013; CUNHA-LAURA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DAVID *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014a; OLIVEIRA *et al.*, 2014b; OLIVEIRA *et al.*, 2015) com possíveis processos patológicos.

Em relação à administração de fosfatidilcolina e fenômeno de isquemia/reperfusão, observou-se que essa não é genotóxica e nem mutagênica visto que não houve alterações significativas nos grupos FC150 e FC300 se comparados o tempo T0 com T1, T2 e T3. Os dados biométricos também não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os outros dois que receberam a fosfatidilcolina (FC150 e FC300). No entanto, apesar de não haver toxicidade genética e nem redução do peso corporal, 42,86% dos animais que receberam a dose de 300mg/kg (p.c., i.p.), vieram a óbito nas primeiras horas após o tratamento com a fosfatidilcolina. Logo observa-se que essa dose pode ter apresentado toxicidade aparente que pode ser avaliada pela redução do peso corporal, opacidade dos olhos e pelos, ressecamento da mucosa, eriçamento de pelo, alteração do comportamento e da motilidade, e redução da ingestão de alimentos e água que são importantes indicativos de toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A dose (FC300) é próxima da dose capaz de matar 50% dos indivíduos da população teste, fato que contraindica o uso da mesma. No entanto, a ausência de mortalidade e dos sinais de intoxicação, somados à ausência de danos genotóxicos e mutagênicos, dizem em favor do uso da dose de 150mg/kg em terapia antioxidante na defesa de danos causados pelo processo de isquemia/reperfusão testicular.

Uma possível forma de proteção contra essas espécies reativas é a defesa antioxidante endógena desempenhada, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e glutathione-S-transferase (AITKEN; ROMAN, 2008). No entanto, no caso da torção do cordão espermático, onde há aumento da produção das espécies reativas, terapias a base de antioxidantes e/ou de compostos que sejam capazes de potencializar esses efeitos podem ser utilizados (WU *et al.*, 1993; LIEBER *et al.*, 1997; IKEDA *et al.*, 2011), como é o caso da fosfatidilcolina, no intuito de se prevenir danos citotóxicos nos tecidos submetidos à falta de nutrição e oxigenação.

Essa ausência de danos no DNA e de toxicidade, da menor dose testada, reforça a indicação da fosfatidilcolina em terapias antioxidantes buscando seus efeitos antirradicais livres para a citoproteção das células germinativas. Nesse mesmo sentido outros estudos experimentais demonstram a eficácia de drogas na atenuação das lesões de isquemia/reperfusão e dentre essas cita-se a superóxido dismutase, a catalase, o manitol, o alopurinol, a vitamina E, a N-acetilcisteína, outros compostos quelantes de ferro, inibidores da conversão angiotensina e antagonistas de canais de cálcio (CERWENKA, 1999; COLLARD; GELMAN, 2001; SILVA-JR. *et al.*, 2002; ANTONIOLLI-SILVA *et al.*, 2005).

Nas mitocôndrias, durante os danos causados pela isquemia/reperfusão, ocorre diminuição da atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio (NADH) desidrogenase, do acarreador de adenosina difosfato/adenosina trifosfato (ADP/ATP), e da ATP sintase. Além disso, dá-se o aumento da fosfolipase A₂, além do acúmulo de cálcio e o aumento da produção de radicais livres. Sabe-se que esses eventos em associação levam as células à morte e outras lesões possivelmente pela alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial externa (KONO; OSAWA; TANAKA, 1982; SILVA-JR. *et al.*, 2002). Como a fosfatidilcolina é um lipídio, que também possui atividade antioxidante (TESORIERE *et al.*, 1993; NWOSU; BOYD; SHELDON, 1997), presente e formador da maioria das membranas celulares a sua concentração e composição influenciam na integridade e funcionamento das membranas celulares e em especial na sua permeabilidade por aumentar a solubilidade do colesterol (LI *et al.*, 2006; ZOCHER *et al.*, 2013). Essas características são favoráveis ao uso da fosfatidilcolina para evitar os danos da isquemia/reperfusão. No presente estudo a avaliação histológica não demonstrou diferenças significativas entre o grupo controle e aquele que

recebeu a menor dose de fosfatidilcolina. Mas foi observada uma redução dos danos histológicos testiculares foi evidenciada.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a torção do cordão espermático não causa danos genotóxicos e nem mutagênicos.

A fosfatidilcolina na dose de 300mg/kg é tóxica e causa mortalidade o que contraindica a sua utilização.

Já a dose de 150mg/kg, a fosfatidilcolina não causa danos toxicogenéticos e não previne, de forma estatisticamente significativa, os danos teciduais causados de falta de nutrição e oxigenação das células testiculares, apesar de ocorrer uma redução dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABDALLAH, D.M.; EID, N.I. Possible neuroprotective effects of lecithin and alphotocopherol alone or in combination against ischemia/reperfusion insult in rat brain. **Journal of Biochemical Molecular Toxicology**. v.18, p. 273-278, nov. 2004.
- ACEVEDO-MORANTES, C.Y.; MELÉNDEZ, E.; SINGH, S.P.; RAMÍREZ-VICK, J.E. Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines. **Cancer Science & Therapy**. v.4, p. 271-275, 2012.
- ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F. Role of lipids in brain injury and diseases. **Future Lipidol**. v. 2, p. 403-422, ago. 2007.
- AHMED, F.A.; WHELAN, J.; JEQUIER, A.M.; CUMMINS, J. Torsion-induced injury in rat testes does not affect mitochondrial respiration or the accumulation of mitochondrial mutations. **Internacional Journal Andrology**. v.23, p. 347-356, dec. 2000.
- AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.1, p. 15-24, oct-dec. 2008.
- ANDERSON, J.B.; WILLIAMSON, R.C. Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. **The British journal of surgery**. v.75, p. 988-992, oct.1988.
- ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B.; ORTIZ, V.; SILVA, R.A.; TOGNINI, J.R.F. Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. **Acta Cirurgica Brasileira**.v.26, p. 468-470, dec. 2005.
- AUHAREK, S.A.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L.; OLIVEIRA, R.J.; CUNHA-LAURA, A.L. Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.148, p. 341-343, jun. 2013.
- BARTSCH, G.; FRANK, S.; MARBERGER, H.; MIKUZ, G. Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. **The Journal of Urology**. v.124, p. 374-378, sep.1980.
- BAYNE, A.P.; MADDEN-FUENTES, R.J.; JONES, E.A.; CISEK, L.J.; GONZALES, E.T.JR; REAVIS, K.M.; Roth, D.R.; Hsieh, M.H. Factors associated with delayed treatment of acute testicular torsion-do demographics or interhospital transfer matter? **The Journal of Urology**. v.184, p. 1743-17447, oct.2010.

BECKER, E.J.JR.; TURNER, T.T. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. **Journal of Andrology**. v.16, p. 342-351, jul-aug.1995.

BIALECKA, M. The effect of bioflavonoids and lecithin on the course of experimental atherosclerosis in rabbits. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**. v.43, p. 41-56, feb.1997.

BOLLN, C.; DRIVER, C.P.; YOUNGSON, G.G. Operative management of testicular torsion: current practice within the UK and Ireland. **Journal of Pediatric Urology**. v. 2, p. 190-193, jun.2006.

BROOK, J. Dietary soya lecithin decreases plasma triglyceride levels and inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochemical medicine and metabolic biology**. v.34, p.31-39, feb.1986.

CALLEWAERT, P.R.; VAN KERREBROECK, P. New insights into perinatal testicular torsion. **European Journal of Pediatrics**. v.169, p. 705-712, jun.2010.

CERWENKA, H. Mischinger. Postischemic oxidative stress during liver resection. In Book proceedings of 3 rd word congress of the IHPBA. Ed. Gonzales EM, Paschoal MH. Madrid. 1999;160-164.

CHILVERS, C.E.; PIKE, M.C.; PECKHAM, M.J. Torsion of the testis: a new risk factor for testicular cancer. **British Journal of Cancer**. v.55, p. 105-106, jan.1987.

CHUNG, E.; BROCK, G.B. Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. **Canadian Urological Association Journal**. v.5, p.210-214, jun. 2011.

COLLARD, C.D.; GELMAN, S. Patophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia – reperfusion injury. **Anesthesiology**. v.94, p. 1-11, jun.2001.

COSENTINO, M.J.; NISHIDA, M.; RABINOWITZ, R.; COCKETT, A.T.K. Histological changes occurring in the contralateral testis of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. **The Journal of Urology**. v. 133, p. 906-911, jun.1985.

COURRÈGES, M.C.; BENENCIA, F.; UCEDA, A.; MONSERRAT, A.J. Effect of dietary choline deficiency on immunocompetence in wistar rats. **Nutrition Research**. v. 23, p. 519-526, apr.2003.

CUI, Z.; HOUWELING, M. Phosphatidylcholine and cell death. **Biochimica et biophysica acta**. v.1585, p. 87-96, dec. 2002.

CUNHA-LAURA, A.L.; OLIVEIRA, R.J.; BARROS, A.L.C.; SIQUEIRA, J.M.; VIEIRA, M.C.; AUHAREK, S.A. Maternal exposure to *Cochlospermum regium*: a toxicological evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23, p. 374-378, mar/apr. 2013.

DAVENPORT, M. ABC of general surgery in children. Acute problems of the scrotum. **BMJ**. v.312, p. 435-437, feb.1996.

DAVID, N.; MAURO, M.O.; GONÇALVES, C.A.; PESARINI, J.R.; STRAPASSON, R.L.B.; KASSUYA, C.A.L.; STEFANELLO, M.E.A.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; OLIVEIRA, R.J. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of ethnopharmacology**. v.154, p. 370-379, jun.2014.

DEMIRBILEK, S.; GÜRSES, I.; SEZGIN, N.; KARAMAN, A.; GÜRBÜZ, N. Protective effect of polyunsaturated phosphatidylcholine pretreatment on stress ulcer formation in rats. **Journal of pediatric surgery**. v.39, p. 57-62, jan.2004.

DENES, F.T.; SOUZA, N.C.L.B.; SOUZA, A.S. Escroto agudo: diagnóstico e tratamento. **Projeto Diretrizes**. p. 1-6, 2006.

EVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**. v.66, p. 239-245, fev.1996.

EXTON, J.H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochimica et biophysica acta*. v.1212, p. 26-42, apr.1994.

FILHO, D.W.; TORRES, M.A.; BORDIN, A.L.; CREZCYNSKI-PASA, T.B.; BOVERIS, A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. **Molecular aspects of medicine**. v.25, p. 199-210, feb-apr.2004.

FIMOGNARI, C. Role of oxidative RNA damage in chronic-degenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2015, p. 1-8, 2015.

FRIEDMAN, L.S.; MARTIN, P.; MUNOZ, S.J. Liver function tests and the objective evaluation of the patient with liver disease. In: Zakim, D.; Boyer, T.D, eds. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Philadelphia: WB Saunders.p.791-833, 1996.

GHYCZY, M. Oral phosphatidylcholine pretreatment decreases Ischemia-reperfusion-induced methane generation and the inflammatory response in the small intestine. **Shock**. v.30, p. 596-602, nov.2008.

GONÇALVES, C.A.; SILVA, N.L.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; AUHAREK, A.S.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; SILVA, D.B.; SANTOS, F.J.L.;

SIQUEIRA, J.M.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetics and molecular research**. v.13, p. 4392-4405, jun.2014.

GONÇALVES, C.A.; SIQUEIRA, J.M.; CAROLLO, C.A.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; CASTRO, A.H.; FERNANDES, L.; CHAGAS, R.; AUHAREK, A.S.; OLIVEIRA, R.J. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacol**. v. 150, p. 843-850, dec. 2013.

GROWDON, J.H. Use of phosphatidylcholine in brain diseases: an overview. In: *Lecithin: technological, biological and therapeutic aspects* (Israel HG, Ansell B eds.). v.3, p.121-136,1987.

GUIMARÃES, S.B.; ARAGÃO, A.A.; SANTOS, J.M.V.; KIMURA, O.S.; BARBOSA, P.H.U.; VASCONCELOS, P.R.L. Oxidative stress induced by torsion of the spermatic cord in Young, rats. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 22, p. 30-33, jan/feb.2007.

GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L. In vivo acute changes in ATP and glucose concentrations in the testicles of prepubertal rats following unilateral torsion. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 17, p.110-115, mar/apr.2002.

HANTÁK, I.; BOCA, M.; MIKULECKÝ, M.; STANCEK, D. Essential phospholipids in the treatment of chronic hepatitis B virus infection. **Vnitřní lékařství**. v.36, p. 1164-1171, dec.1990.

HARRISON, R.G.; OETTLÉ, A.G. Pathologic changes in the rat testis following ischaemia. **Proc. Soc. Study Fertyl**. v.2, p. 6-11, 1950.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE-JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*. v.245, p.245-249, dec.1990.

HIRAYAMA, C.; OKAMURA, M.; TANIKAWA, K. The clinical effect of polyene phosphatidylcholine in chronic hepatitis in a double-blind test. **Rinsho to kenkyu**. v.55, p. 194-198, 1978.

IKEDA, R.; ISHII, K.; HOSHIKAWA, Y.; AZUMI, J.; ARAKAKI, Y.; YASUI, T.; MATSUURA, S.; MATSUMI, Y.; KONO, Y.; MIZUTA, Y.; KURIMASA, A.; HISATOME, I.; FRIEDMAN, S.L.; KAWASAKI, H.; SHIOTA, G. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 induced by transforming growth factor β 1 are the therapeutic targets of polyenylphosphatidylcholine in the suppression of human hepatic stellate cell activation. **Inflammation research**. v.60, p. 597-604, jun.2011.

JENKINS, P.J.; PORTMANN, B.P.; EDDLESTON, A.L.W.F. Use of polyunsaturated phosphatidylcholine in HBsAg negative chronic active hepatitis: results of prospective double-blind controlled trial. **Liver**. v.2, p. 77-81, jun.1982.

Jesus LE. Acute scrotum. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v.27, p. 271-278, 2000.

KAMADA, K.; TAKIHARA, H.; SHIRATAKI, S.; ISHIZU, K.; BABA, Y.; NAITO, K. Flow cytometric DNA analysis demonstrates contralateral testicular deterioration in experimental unilateral testicular torsion of prepubertal rats. **Andrologia**. v.25, p. 239-244, sep-oct.1993.

KAR, A.; OZDEN, E.; YAKUPOGLU, Y.K.; KEFELI, M.; SARIKAYA, S.; YILMAZ, A.F. Experimental unilateral spermatic cord torsion: the effect of polypolymerase enzyme inhibitor on histopathological and biochemical changes in the early and late periods in the ipsilateral and contralateral testicles. **Urology**. v.76, p. 507 e1-5, aug.2010.

KAYE, J.D.; SHAPIRO, E.Y.; LEVITT, S.B.; FRIEDMAN, S.C.; GITLIN, J.; FREYLE, J.; PALMER, L.S. Parenchymal echo texture predicts testicular salvage after torsion: potential impact on the need for emergent exploration. **The Journal of Urology**. v.180, p. 1733-1736, oct.2008.

KIDD, P.M. Phosphatidylcholine: a superior protectant against liver damage. **Alternative Medicine Review**. v.1, p. 258-274, 1996.

KNUCHEL, F. Double-blind study in patients with alcoholic toxic fatty liver. Effect of essential phospholipids on enzyme behavior and lipid composition of the serum. **Die Medizinische Welt**. v.30, p. 411 - 416, mar.1979.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**. v.3, p. 103-115, 1995.

KONO, Y.; OSAWA, K.; TANAKA, J. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. **Transplantation**. v.33, p. 150-155, feb.1982.

KOSINA, F.; BUDKA, K.; KOLOUCH, Z. Essential choline phospholipids in the treatment of viral hepatitis. **Cas. Lek. Ces**. v.120, p. 957-960, 1992.

KOVÁCS, T.; VARGA, G.; ERCES, D.; TÓKÉS, T.; TISZLAVICZ, L.; GHYCZY, M.; BOROS, M.; KASZAKI, J. Dietary phosphatidyl choline supplementation attenuates inflammatory mucosal damage in a rat model of experimental colitis. **Shock**. v. 38, p. 177-185, aug.2012.

KUNTZ, E. Pilot study with polyenyl phosphatidyl choline in severe liver insufficiency. **Die Medizinische Welt**. v.40, p. 1327-1329, 1989.

KYRIAZIS, I.D.; DIMOPOULOS, J.; SAKELLARIS, G.; WALDSCHMIDT, J.; CHARISSIS, G. Extravaginal testicular torsion: a clinical entity with unspecified surgical anatomy. **Internacional braz j urol: official journal of the Brazilian Society of Urology**. v. 34, p. 617-623, sep-oct.2008.

LEE, H.S.; KIM, B.K.; NAM, Y.; SOHN, U.D.; PARK, E.S.; HONG, S.A.; LEE, J.H.; CHUNG, Y.H.; JEONG, J.H. Protective role of phosphatidylcholine against cisplatin-induced renal toxicity and oxidative stress in rats. **Food and chemical toxicology: an internacional journal published for the British Industrial Biological Research Association**. v. 58, p. 388-393, aug.2013.

LEE, J.W.; KIM, J.I.; LEE, Y.A.; LEE, D.H.; SONG, C.S.; CHO, Y.J.; HAN, J.S. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of pediatric surgery**. v.47, p. 736-742, apr.2012.

LEE, W.J.; WENG, S.H.; SU, N.W. Individual Phosphatidylcholine Species Analysis by RP-HPLC-ELSD for Determination of Polyenylphosphatidylcholine in Lecithins. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.63, p. 3851-3858, apr.2015.

LI, Z.; AGELLON, L.B.; ALLEN, T.M.; UMEDA, M.; JEWELL, L.; MASON, A.; VANCE, D.E. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. **Cell metabolism**. v.3, p. 321-331, may.2006.

LIANG, T.; METCALFE, P.; SEVCIK, W.; NOGA, M. Retrospective review of diagnosis and treatment in children presenting to the pediatric department with acute scrotum. **AJR. American journal of roentgenology**. v.200, p. 444-449, may.2013.

LIEBER, C.S.; LEO, M.A.; ALENYIK, S.I.; ALENYIK, M.K.; DECARLI, L.M. Polyenylphosphatidylcholine decreases alcohol-induced oxidative stress in the baboon. **Alcoholism, clinical and experimental research**. v.21, p. 375-379, apr.1997.

LORENZINI, F.; TAMBARA FILHO, R.; GOMES, R.P.X.; ANDRADE, A.J.M.; ROLF, E.T.; MATIAS, J.E.F. Long-term effects of the testicular torsion on the spermatogenesis of the contralateral testis and the preventive value of the twisted testis orchiopididymectomy. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.27, p. 388-395, jun.2012.

LUDWIG, G.; HASELBERGER, J.; MÜNZENMAIER, R. Spätveränderungen des Hodengewebs bei experimenteller Samenstrangtorsion. **Urologe**. v.18, p. 350-354, 1979.

MACALUSO, M.; WRIGHT-SCHNAPP, T.J.; CHANDRA, A.; JOHNSON, R.; SATTERWHITE, C.L.; PULVER, A.; BERMAN, S.M.; WANG, R.Y.; FARR, S.L.; POLLACK, L.A. A public health focus on infertility prevention, detection, and management. **Fertility and sterility**. v.93, p. 1-10, jan.2010.

MAFFEI, F.; BUSCHINI, A.; ROSSI, C.; POLI, P.; FORTI, G.C.; HRELIA, P. Use of the Comet test and micronucleus assay on human white blood cells for in vitro assessment of genotoxicity induced by different drinking water disinfection protocols. **Environmental and molecular mutagenesis**. v.46, p. 116-125, aug.2005.

MANSBACH, J.M.; FORBES, P.; PETERS, C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**. v.159, p. 1167-1171, dec.2005.

MARKEY, C.M.; JEQUIER, A.M.; MEYER, G.T.; MARTIN, G.B. Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rats. **Journal of reproduction and fertility**. v.101, p. 643-650, aug.1994.

MARPAUNG, B.; TARIGAN, P.; ZEIN, L.H. Tuberkulostatische Kombinationen - therapie aus INH, RMP und EMB. **Therapiewoche**. v.38, p. 734-740, 1988.

MEL'CHINSKAIA, E.N.; GROMNATSKII, N.I.; KIRICHENKO, L.L. Hypolipidemic effects of alisat and lipostabil in patients with diabetes mellitus. **Terapevticheskii arkhiv**. v.72, p. 57-58, 2000.

MOREIRA, C.Q.; FARIA, M.J.S.S.; BARONEZA, J.E.; OLIVEIRA, R.J.; MOREIRA, E.G. Developmental exposure to fenproporex: reproductive and morphological evaluation. **Human & experimental toxicology**. v.24, p. 397-402, aug.2005.

MUETING, D.; DOHN, P.; REIKOWSKI, J. Effect of high doses of essential phospholipids administered intravenously and perorally on metabolism of albumin and fats and on enzymatic activity of chronically ill liver patients. **Verhandlungen der Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin**. v.17, p. 1389-1392, 1972.

NACHTIGALL, R.D. International disparities in access to infertility services. **Fertility and sterility**. v.85, p. 871-875, apr.2006.

NAGLER, H.M.; WHITE, R. The effect of testicular torsion on the contralateral testis. **The Journal of Urology**. v.128, p. 1343-1348, 1982.

NANDI, B.; MURPHY, F.L. Neonatal testicular torsion: a systematic literature review. **Pediatric surgery international**. v.27, p. 1037-1040, oct.2011.

Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat JL. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front. Chem.* 2015;3:1-15.

NOGUEIRA, V.H.; VILA, F.; OSÓRIO, L.; CAVADAS, V.; TEVES, F.; SABEL, F.; OLIVEIRA, M.; BRANCO, F.; CARVALHO, J.M.F.; MARCELO, F. Torção do cordão espermático: aspectos de diagnóstico e terapêutica. **Revista Internacional de Andrología**. v.7, p. 28-33, 2009.

NWOSU, C.V.; BOYD, L.C.; SHELDON, B. Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. **Journal of the America Oil Chemists' Society**. v.74, p. 293-297, mar.1997.

OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, M.S.; PESARINI, J.R.; MAURO, M.O.; SILVA, A.F.; SOUZA, T.R.; RIBEIRO, L.R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genetics and molecular research**. v.14, p. 834-849, feb.2015.

OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, M.S.; SILVA, A.F.; PESARINI, J.R.; MAURO, M.O.; RIBEIRO, L.R. Compounds used to produce cloned animals are genotoxic and mutagenic in mammalian assays in vitro and in vivo. **Brazilian journal of medical and biological research**. v.47, p.287-298, apr.2014a.

OLIVEIRA, R.J.; OLIVA, S.U.; DAROZ, G.A.; RUBIO, E.M. Fertility assessment and possible external structural defects on progeny from male rats chronically exposed to arsenic. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v.18, p. 5-10, jun.2005.

OLIVEIRA, R.J.; PESARINI, J.R.; SALLES, M.J.S.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.S.; LEITE, V.S.; SILVA, A.F.; MATIAZI, H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and molecular biology**. v.37, p. 111-119, mar.2014b.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.S.; SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.S.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI, H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory toxicology and pharmacology**. v.53, p. 164-173, apr.2009.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.S.; SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.S.; LEITE, V.S.; MATIAZI, H.J.; PESARINI, J.R.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI,

M.S. In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in acute treatment with multiple doses.

Genetics and molecular biology. v.36, p. 413-424, sep.2013.

PAKYZ, R.E.; HEINDEL, R.M.; KALLISH, M.; COSENTINO, M.J. Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. **Journal of andrology.** v.11, p. 401-408, sep-oct.1990.

PANOS, M.Z.; POISON, R.; JOHNSON, R.; et al. Activity of polyunsaturated phosphatidylcholine in HBsAg negative (autoimmune) chronic active hepatitis and in acute alcoholic hepatitis. In: Gundermann KJ, SchQmacher R, eds. 50th Anniversary of Phospholipid Research (EPL). **BingIn-Rhein, Germany: wbn- Verlag.** p.103-110, 1990.

POMPÉIA, C.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; CURI, C. Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. **Brazilian journal of medical and biological research.** v.36, p. 1949-1960, nov. 2003.

PRATER, J.M.; OVERDORF, B.S. Testicular torsion: a surgical emergency. **American family physician.** v.44, p. 834-840, sep.1991.

RAMAN, J.D.; WLAMSLEY, K.; GOLDSTEIN, M. Inheritance of varicoceles. **Urology.** v.65, p. 1186-1189, jun.2005.

RINGDAHL, E.; TEAGUE, L. Testicular torsion. **American family physician.** v.74, p.1739-1743, 2006.

SCHANAIDER, A.; ALEX, C.A.; ERRICO, G.; Immunological effects of acute testicular torsion on the contralateral testis in rats. **European journal of pediatric surgery.** v.21, p.370-374, dec.2001.

SCHULLER-PEREZ, A.; SAN MARTIN, F.G. Controlled study using multiply-unsaturated phosphatidylcholine in comparison with placebo in the case of alcoholic liver steatosis. **Die Medizinische Welt.** v.72, p. 517-521, 1985.

SESSIONS, A.E.; RABINOWITZ, R.; HULBERT, W.C.; GOLDSTEIN, M.M.; MEVORACH, R.A. Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. **The Journal of Urology.** v.169, p. 663-665, feb.2003.

SHAFI, H.; ESMAEILZADEH, S.; DELAVAR, M.A.; HAYDARI, F.H.; MAHDINEJAD, N.; ABEDI, S. Prevalence of Varicocele among Primary and Secondary Infertile Men: Association with Occupation, Smoking and Drinking Alcohol. **North American Journal of Medical Sciences.** v.6, p. 532-535, oct.2014.

SHARP, V.J.; KIERAN, K.; ARLEN, A.M. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. **American Family Physician**. v.88, p. 835-840, dec.2013.

SILVA-JR, O.C.; CENTURION, S.; PACHECO, E.G.; BRISOTTI, J.L.; OLIVEIRA, A.F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.17, p. 86-100, 2002.

SOBINOFF, A.P.; DANDO, S.J.; REDGROVE, K.A.; SUTHERLAND, J.M.; STANGER, S.J.; ARMITAGE, C.W.; TIMMS, P.; MCLAUGHLIN, E.A.; BEAGLEY, K.W. Chlamydia muridarum infection-induced destruction of male germ cells and sertoli cells is partially prevented by Chlamydia major outer membrane protein-specific immune CD4 cells. **Biology of reproduction**, v.92, p. 27, jan.2015.

STEINBERGER, E.; TIJOE, D.Y. Spermatogenesis in rat testis after experimental ischaemia. *Fertility and Sterility*. v.20, p. 639-649, 1969.

TA, A.; D'ARCY, F.T.; HOAG, N.; D'ARCY, J.P.; LAWRENTSCHUK, N. Testicular torsion and the acute scrotum: current emergency management. **European Journal of Emergency Medicine**. v.23, p. 160-165, jun.2016.

TESORIERE, L.; CIACCIO, M.; BONGIOMO, A.; RICCIO, A.; PINTAUDI, A.M.; LIVREA, M.A. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solution and in phosphatidylcholine liposomes. **Archives of biochemistry and biophysics**. v.307, p. 217-223, nov.1993.

TOKÉS, T.; EROS, G.; BEBES, A.; HARTMANN, P.; VÁRSZEGI, S.; VARGA, G.; KASZAKI, J.; GULYA, K.; GHYCZY, M.; BOROS, M. Protective effects of a phosphatidylcholine-enriched diet in lipopolysaccharide-induced experimental neuroinflammation in the rat. **Shock**. v.36, p. 458-465, nov.2011.

TSYRKUNOV, V.M. Lipostabil in the treatment of viral hepatitis B in subjects who abuse alcohol. **Klinicheskaja meditsina**. v.70, p. 75-78, jan.1992.

TURNER, T.T.; BROWN, K.J. Spermatogenic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. **Biology of reproduction**. v.49, p. 401-407, aug.1993.

URT-FILHO, A.; INOUE, C.S.; PONTES, J.C.D.V.; ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B.; SILVA, G.V.R.; SANTOS, C.H.M. Propofol effects on the morphology of rat testes subjected to testicular ischemia/reperfusion. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.27, p. 172-178, 2012.

VAN MEER, G. Lipid traffic in animal cells. **Annual review of cell biology**. v.5, p. 247-275, 1989.

VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**. v.25, p. 187-199, 2010.

VISCO, G.. Polyunsaturated phosphatidylcholine associated with vitamin B complex in the treatment of acute viral hepatitis B. **La Clinica Terapeutica**. v.114, p. 183-188, 1985.

WAMPLER, S.M.; LLANES M. Common scrotal and testicular problems. **Primary Care**. v.37, p. 613-626, sep.2010.

WEI, S.M.; YAN, Z.Z.; ZHOU, J. Involvement of reactive oxygen species and TATA box-binding protein-related factor 2 in testicular torsion/detorsion-induced injury. **Urology**. v.466, p. e9-e14, 2013.

WEIN, A.J.; KAVOUSSI, L.R.; NOVICK, A.C.; PARTIN, A.W.; PETERS, C.A. Campbell Walsh-Urology, 9th Edition. Philadelphia, WB Saunders Elsevier; 2007.

WU, L.M.; GUO, F.L.; LIU, Z.L.; ZHANG, Y.L.; JIA, X.Q.; LIU, Y.C. Antioxidant activity of lipophilic vitamin c derivative in dipalmitoyl phosphatidylcholine vesicles — A stopped-flow esr kinetic study. **Research on Chemical Intermediates**. v.19, p. 657-668, jan.1993.

YANG, C. JR.; SONG, B.; LIU, X.; WEI, G.H.; LIN, T.; HE, D.W. Acute scrotum in children: an 18-year retrospective study. **Pediatric Emergency Care**. v.27, p. 270-274, apr.2011.

YANO, M.; KOGA, M.; SHIRAHAMA, S. Blind assessment of liver biopsy findings in chronic hepatitis: drug efficacy trial of polyene phosphatidylcholine. **Shindan to Chiryo**. v.9, p. 1783-1789, 1978.

ZEMAN, M.; ZAK, A.; STOLBA, P. The effect of polyene phosphatidylcholine administration on lipid metabolism and glucose tolerance in patients with hyperlipoproteinemia IIB. *Sborník lékarský*. v.96, p. 43-48, 1995.

ZHAO, L.C.; LAUTZ, T.B.; MEEKS, J.J.; MAIZELS, M. Pediatric testicular torsion epidemiology using a national database: incidence, risk of orchiectomy and possible measures toward improving the quality of care. **The Journal of Urology**. v.186, p. 2009-2013, nov.2011.

ZOCHER, F.; VAN DER SPOEL, D.; POHL, P.; HUB, J.S. Local partition coefficients govern solute permeability of cholesterol-containing membranes. *Biophysical journal*. v.105, p. 2760-2770, dec.2013.

ANEXOS

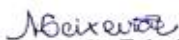
A - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 509/2013 da Pesquisadora Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva, referente ao projeto de pesquisa "Efeito da Fosfatidilcolina nos testículos de ratos submetidos a torção de cordão testicular unilateral", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 18 de outubro de 2013.


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 29 de setembro de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184

B - CARTA DE ACEITE DO ARTIGO



Ribeirão Preto, 05 de Maio de 2016

Prezados autores,

Informamos que o artigo "Twisting of the spermatid cord: ischemia and reperfusion, toxicogenetic evaluation, and the effects of phosphatidylcholine in pre-clinical trials" GMR8529, de autoria H.R.S. Coelho,, C.R. Berno,, G.R. Falcão, C.R. Hildebrand, R.J. Oliveira,, and A.C.M.B. Antonioli-Silva,, foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Research (GMR).

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 0,85, segundo JCR - junho 2013.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Francine Muniz', is positioned above the printed name and contact information.

Francine Muniz

Coordenadora editorial (Mtb 44.300)

Genetics and Molecular Research

www.funpecrp.com.br/gmr

Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991

C - ARTIGO EM INGLÊS

Twisting of the spermatic cord: ischemia and reperfusion, toxicogenetic evaluation, and the effects of phosphatidylcholine in pre-clinical trials

Running title: Twisting of the spermatic cord: trials with phosphatidylcholine

H.R.S. Coelho^{1,2}, C.R. Berno^{1,3}, G.R. Falcão⁴, C.R. Hildebrand¹, R.J. Oliveira^{1,2,3}, A.C.M.B. Antonioli-Silva^{1,2}.

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian”, Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares – EBSEH, Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina – FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil.

³Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil.

⁴Faculdade de Medicina – FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil.

Corresponding author:

Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva

Medicine College, Federal University of Mato Grosso do Sul. Cidade Universitária, S/N Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

Telephone: +55 (67) 3345-7671

Fax: +55 (67) 3345-7190

E-mail: andreia.silva@ebserh.gov.br

ABSTRACT

Phosphatidylcholine is the main phospholipid present in cell membranes and in lipoproteins and thus is able to interfere in various biological processes. This lipid also has antioxidant activity, indicating protection from damage caused by free radicals under conditions of ischemia/reperfusion. Given the above, the present study aimed to evaluate toxicogenetic damage caused by twisting of the spermatic cord in ischemia/reperfusion and also if phosphatidylcholine plays a role in

ischemia/reperfusion condition in preclinical trials. The results indicate that the spermatic cord torsion does not cause genotoxic damage nor mutagenic. The phosphatidylcholine at the dose of 300mg / kg is toxic and thus it's not recommended to use. However, the dose of 150mg / kg does not promote toxicogenetic damage and does not statistically prevent tissue damage occurred from lack of oxygenation and nutrition of testicular cells, although there was a tendency to reduce them. Therefore this research suggests that further studies should be conducted to clarify this tendency and also, to provide a better explanation on the possible therapeutic effects of phosphatidylcholine in cytoprotection of germ cells submitted to to ischemia/reperfusion.

Key words: Antioxidant, cell death, comet assay, micronucleus assay, histopathology

INTRODUCTION

Testicular torsion is a urological emergency characterized by the rotation of the spermatic cord on its own axis. This event causes biochemical and morphological changes in the testes due to ischemia/reperfusion, and if not treated and diagnosed in time, its effects will be exacerbated due to reperfusion and necrosis of the gonads (Sinha and Swedloff, 1999).

This urological condition can affect patients of all ages. However, it occurs more frequently in the neonatal period until adolescence (Gunther et al., 2006). At present, the worldwide incidence of this complication is one case per 4,000 men aged <25 years (Ringdahl and Teague, 2006). The treatment of this complication is surgical and involves the manual detorsion of the testes, restoration of their anatomical position, and orchiopexy (Bolln et al., 2006). Orchiectomy and prophylactic contralateral orchiopexy are indicated in cases of testicular necrosis (Sessions et al. 2003).

Widespread testicular ischemia/reperfusion, which can occur during torsion of the spermatic cord, is due to the occlusion of the venous return and leads to edema and vascular rupture. Subsequently, arterial occlusion prevents the oxygenation and nutrition of tissues and may cause the death of germ cells and Leydig cells and even testicular necrosis. Adding to these facts, ischemic organ injury and reperfusion of the contralateral testicle promotes histological changes (Jesus, 2000). The damage caused by the reperfusion of the testicle occurs due to the oxidative stress via the increased production of reactive oxygen and nitrogen species, which are toxic to cells and leads to membrane lipid peroxidation and apoptosis (Aitken and Roman, 2008; Lee et al., 2012). The combination of these events may cause changes in DNA via disruption of genetic pathways and changes in the cell cycle and proliferation, with a consequent increase in apoptotic events (Wei et al., 2013). One possible strategy to protect against these reactive species is endogenous antioxidant defense by the enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and glutathione-S-transferase (Aitken and Roman, 2008). However, in the case of torsion of the spermatic cord, when increased production of reactive species occurs, therapies based on antioxidants and/or compounds that enhance these effects, such as phosphatidylcholine, can be used (Ikeda et al., 2011).

Phosphatidylcholine is the main phospholipid present in cell membranes and lipoproteins and interferes with many biological processes (van Meer, 1989), and its

metabolites are important mediators of intracellular signaling (Cui and Houweling, 2002), inflammation (Pompéia et al., 2000), and immunomodulation (Courrèges et al., 2003). It has also been reported that phosphatidylcholine increases the solubility of cholesterol and therefore can change the composition of fatty deposits and inhibit platelet aggregation, reducing the risk of cardiovascular disease (Mel'Chinskaia et al., 2000). Its therapeutic use has also been reported for mental disorders (Adibhatla and Hatcher, 2007), neuronal preservation (Zweigner et al., 2004), liver disease associated with alcohol abuse (Schuller-Perez and San Martin, 1985) and viral infections including hepatitis (Tsykrunov, 1992).

Therefore, the present study aimed to evaluate the toxicogenetic damage caused by ischemia and reperfusion due to twisting of the spermatic cord and the effects of phosphatidylcholine on this urological condition in preclinical trials.

MATERIALS and METHODS

Chemical Agent

Phosphatidylcholine (Lipostabil®, Sanofi-Aventis, France, Lot 1726, 150 and 300 mg/kg body weight (b.w.), intraperitoneally (i.p.) was administered in a single dose.

Animals

Twenty-one adult male Wistar Rattus norvegicus albinus, with an average weight of 460 g, were obtained from the Central Animal Facility of the Biological Sciences Center at the Federal University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal de Mato Grosso–UFMS).

The animals were housed in pairs or trios in polypropylene boxes lined with wood shavings and fed commercial feed (Nuvital®) and filtered water *ad libitum*. The boxes were maintained on shelves in standardized conditions with a 12:12 hour light:dark photoperiod, temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and relative humidity of $55 \pm 10\%$. The experiment was conducted in accordance with the guidelines of the Universal Declaration of Animal Rights and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFMS under protocol No. 509/2013.

Experimental Design

The animals were randomly divided into three groups (seven animals per group): (I) control (ischemia/reperfusion) group; in this group, the left testis was exteriorized, and the spermatic cord was twisted 720° in a clockwise direction (internal) and maintained in that position in a container with 0.9% saline at ambient temperature for two hours, after which, the cord was untwisted and the testis was repositioned in the scrotum. Subsequently, the incision was sutured with continuous stitches in a single plane. Fifteen minutes before testicular repositioning, a saline solution was injected (i.p.) at a ratio of 1.0 mL/100 g b.w.; (II) phosphatidylcholine group (150 mg/kg, PC150); and (III) phosphatidylcholine group (300 mg/kg, PC300) animals were subjected to the same procedures performed on the control group, with the exception that the saline solution (i.p.) was replaced with phosphatidylcholine at doses of 150 and 300 mg/kg, respectively.

Euthanasia was performed 60 days after the administration of phosphatidylcholine or 0.9% saline using an overdose of anesthetic (ketamine hydrochloride; Fort Godge Laboratory, USA) after the collection of the testes for histopathological evaluation.

Surgical Procedure

The animals were anesthetized by an intramuscular injection of ketamine hydrochloride (50 mg/kg, Fort Godge Laboratory, USA) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, Burs Veterinary Supply, USA) on the lateral side of the left thigh. After anesthesia, a trichotomy was performed in the left inguinal region. Subsequently, the animals were placed on a surgical board in the supine position, antisepsis was performed with 1% chlorhexidine and the placement of a fenestrated sterile drape, and an inguinal incision was performed.

The access route was produced by an oblique incision of approximately 1.5 cm inside the left inguinal region with a No. 15 blade and No. 3 cable and opening the layers of the skin and subcutaneous tissue until visualization of the spermatic cord was possible. The spermatic cord was dissected and isolated using Adson anatomical toothless forceps, curved Kelly forceps (mosquito), and curved Metzenbaum scissors, initiating inferiorly until the left testis was exposed.

The left testis was externalized, and the spermatic cord was manually twisted clockwise in two circles around its own axis (approximately 720°). It was maintained

in this position in a container with 10 mL of 0.9% saline at ambient temperature for two hours. Subsequently, the testis was repositioned on the left hemi-scrotum, and the wound was sutured with continuous stitches on a single plane with 3-0 polyester sutures (Ethicon, Somerville, NJ).

Biological Assays

Toxicogenetic evaluation

Twenty-four hours after the administration of phosphatidylcholine or 0.9% saline (T1), two 20- μ L peripheral blood samples were collected by puncturing the tail vein to perform the comet and micronucleus assays. Other peripheral blood samples (20 μ L) were collected for the micronucleus assay at 48 hours (T2) and 72 hours (T3) after the administration of phosphatidylcholine or 0.9% saline.

Comet assay

The comet assay was performed according to the method described by Oliveira et al. (2015). A 20- μ L aliquot of peripheral blood was homogenized in 120 μ L of low-melting-point (LPM) agarose (0.75%). This solution was deposited on slides previously covered with normal agarose (1.5%). The slides were covered with a glass cover slip and cooled at 4°C for 20 minutes. The coverslips were removed and immersed in freshly prepared lysis solution for 1 hour at 4°C while being protected from light. Afterwards, the slides were transferred to an electrophoresis tank containing buffer at pH > 13.0 for 20 minutes at 4°C for DNA denaturation. This procedure was followed by electrophoresis at 25.0 V and 300.0 mA (1.25 V/cm) for 20 minutes. The slides were neutralized in buffer (pH 7.5, 0.4 M Tris-HCl) three times (five minutes each cycle), air dried, and fixed in absolute ethanol for 10 minutes. The slides were stained with 100 μ L of ethidium bromide at 20×10^{-3} mg/ml and analyzed on an epifluorescence microscope (model L2000, Bioval®) at a magnification of 400x with a 420–490 nm excitation filter of and a 520 nm barrier filter. Following the procedure of Kobayashi et al. (1995), 100 cells were analyzed per animal, and the comets were classified as class 0, undamaged cells without a tail; class 1, cells with a tail that was smaller than the diameter of the nucleoid; class 2, cells with a tail size between one and two times the diameter of the nucleoid; and class 3, cells with a tail two times larger than the diameter of the nucleoid. Apoptotic cells with a completely fragmented nucleoid were not counted. The total score was calculated by summing

the values resulting from the multiplication of the total number of cells observed in each damage category by the class value.

Micronucleus test

The micronucleus assay was performed on peripheral blood samples according to the protocol described by Oliveira et al. (2015). A 20- μ L peripheral blood aliquot was placed on a slide previously covered with 20 μ L of acridine orange (1.0 mg/mL) and covered with a cover slip. The slide was maintained at -20°C for a minimum of two weeks. The analysis was performed on an epifluorescence microscope (model L2000, Bioval®) at a magnification of 400x with a 420–490 nm excitation filter and a 520 nm barrier filter. A total of 2,000 cells were analyzed per animal.

Histopathological analysis

After the 60-day experimental period, the testes were collected, fixed, and maintained in 10% buffered formalin for 48 hours. They were sectioned in the sagittal plane and prepared for histopathological examination. Briefly, after fixation, the tissue sections were dehydrated, cleaned, and paraffin-embedded. The samples were cut on a microtome at a thickness of 5 μ m, stained with hematoxylin and eosin (HE), and examined on a bright field microscope at a magnification of 1,000x (model Eclipse e-200, Nikon®).

Histopathological evaluation was performed by a double-blind model according to the damage scale proposed by Cosentino et al. (1985) and modified by Urt-Filho et al. (2012). Damage was classified as (I) grade 1, normal testicular architecture and orderly arrangement of germ cells; (II) grade 2, lower histological organization, loss of cohesion between germ cells, and closed seminiferous tubules; (III) grade 3, higher disorganization of testicular architecture, germ cells with pyknotic and retracted nuclei, and seminiferous tubules with poorly defined edges; and (IV) grade 4, presence of occluded seminiferous tubules and coagulation necrosis of germ cells.

Statistical analysis

The values are expressed as the means $\pm$ standard error of the mean (SEM) or percentages. Data were analyzed using ANOVA and Tukey, Kruskal-Wallis, and chi-square tests, according to their nature and distribution, using GraphPad Prism software version 2.3 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The significance level was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Biometric parameters

The experimental animals were randomly divided between the experimental groups, and statistically significant differences were not observed between the control group and the groups treated with phosphatidylcholine. However, a significant decrease was observed in the weight of the PC300 group compared to PC150 group ($P < 0.05$) (Figure 1).

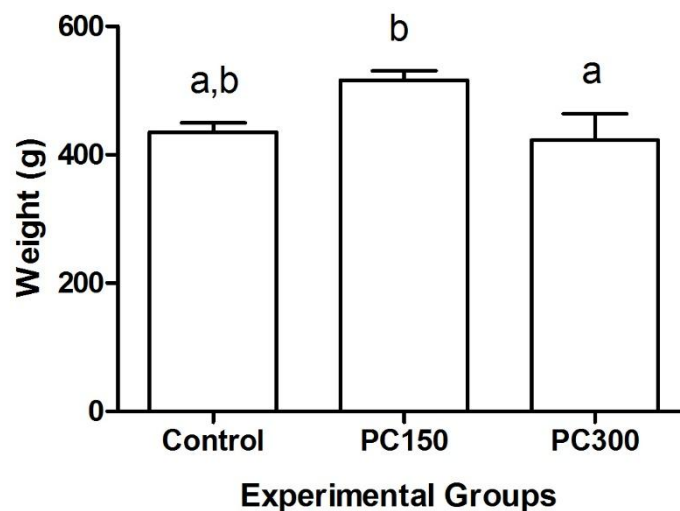


Figure 1. Biometric parameters. Means $\pm$ SEM of animal weight at the end of the experimental period. Statistical test: ANOVA/Tukey ($P < 0.05$). Different letters indicate statistically significant differences.

Toxicogenetic evaluation

The analysis of the frequency of genetic changes, according to the comet and micronucleus assays, indicated that neither testicular twisting nor treatment with

phosphatidylcholine at the two concentrations tested caused genotoxic or mutagenic damage (Figure 2).

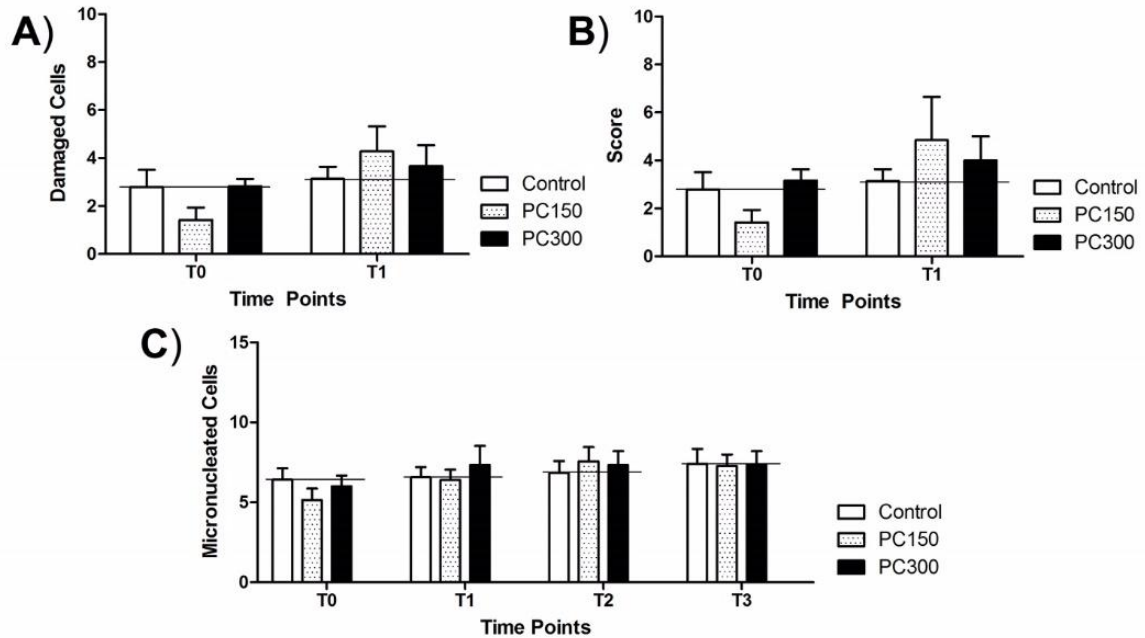


Figure 2. Genetic changes. Results are Means $\pm$ SEM. A – Frequency of damaged cells in the peripheral blood using the comet assay. B – Comet assay score in the peripheral blood. C – Frequency of micronucleated cells in the peripheral blood using the micronucleus assay. Statistical test: ANOVA ($P > 0.05$).

Survival Analysis and Histopathological Examination

The histological examination indicated no significant improvement in the groups evaluated. However, the PC150 group showed a viability of 100% and a tendency toward the reduction of histological damage, indicating an important biological result. In the PC300 group, the reduction of histological damage was smaller, and the mortality rate was 57.14% (Figure 3).

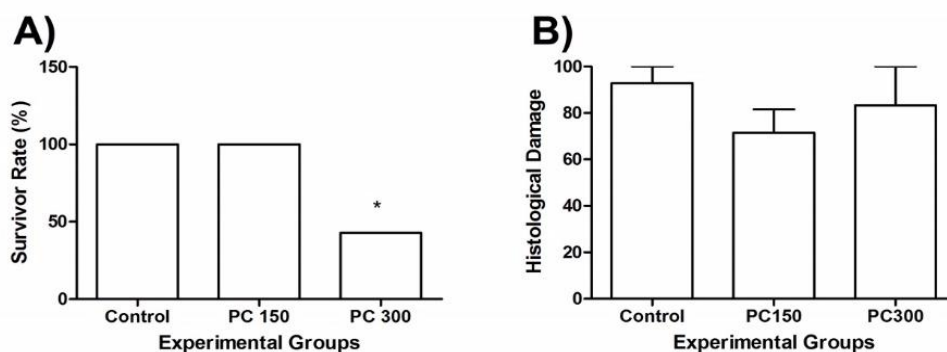


Figure 3. (A) Animal survival and (B) mean $\pm$ SEM of the frequency of histological damage according to Cosentino et al. (1985) and Urt-Filho et al. (2012). Damage was classified as (I) grade 1, normal testicular architecture and orderly arrangement of germ cells; (II) grade 2, lower histological organization, loss of cohesion between germ cells, and closed seminiferous tubules; (III) grade 3, higher disorganization of testicular architecture, germ cells with pyknotic and retracted nuclei, and seminiferous tubules with poorly defined edges; and (IV) grade 4, presence of occluded seminiferous tubules and coagulation necrosis of germ cells. Statistical test: (A) chi-square test ($P < 0.05$). *Indicates statistically significant differences. (B) Kruskal-Wallis test ($P > 0.05$).

A detailed analysis of the histological parameters indicated that the process of ischemia/reperfusion caused histological damage score of 185.71 ± 41.85 with changes classified as Classes 1 and 3. The administration of PC150 reduced the score to 100.00 ± 34.50 . Data from PC150 group showed a reduction in Class 3 damage and an increase in the analyzed fields without histological damage (Class 0). However, the PC300 treatment increased the score to 216.66 ± 83.33 as well as increased the frequency of Class 3 damage (Table 1).

Grupos experimentais	Score	Classe de Danos			
		Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Controle	$185,71 \pm 41,85^a$	$7,14 \pm 7,14$	$42,85 \pm 17,00$	0	$42,85 \pm 20,20$
Grupo 150 mg/Kg	$100,00 \pm 34,50^a$	$28,57 \pm 10,10$	$42,85 \pm 13,04$	$7,14 \pm 7,14$	$21,42 \pm 14,86$
Grupo 300 mg/Kg	$216,66 \pm 83,33^a$	$16,66 \pm 16,66$	$16,66 \pm 16,66$	$7,14 \pm 7,14$	$66,66 \pm 33,33$

DISCUSSION

Cases of sterility and infertility are increasing, and these important public health problems are being aggravated on a global scale (Nachtigall, 2006). The causes of these complications include genetic, environmental, and idiopathic factors (Macaluso et al., 2010). Some urological diseases are also included in this list,

including urogenital tract infections (Sobinoff et al., 2015), cryptorchidism (Chung and Brock, 2011), varicocele (Shafi et al., 2014), and torsion of the spermatic cord mediated by ischemia/reperfusion processes (Ahmed et al., 2000). In the latter case, studies have primarily examined the effects of ischemia/reperfusion (and consequently of hypoxia) on the germ cells, damage in the contralateral testis, and reperfusion (Antoniolli-Silva et al., 2005).

The protocols and results described in the literature are diverse, limiting data comparison, particularly with regard to the strategies that promote ischemia/reperfusion. These strategies include the twisting of the spermatic cord to different degrees (180° to 1080°) and ligation of the spermatic artery (Sessions et al., 2003). However, the most widely used model to evaluate the effect of ischemia/reperfusion on spermatogenesis with the adult rat involves a 720° rotation for one to six hours and persistent damage still after 60 days, or are even irreversible (Becker and Turner, 1995; Antoniolli-Silva et al., 2005). Therefore, the present study selected the protocol of Antoniolli-Silva et al. (2005) with modifications, and a two-hour period of ischemia/reperfusion.

According to Turner and Brown (1993), after at least one hour of ischemia/reperfusion, tissue damage can be quantified in the testis. Therefore, a period of approximately one hour is indicated for the development of antioxidant therapies for protection of the germ cells. Therefore, in the present study, we used phosphatidylcholine, which can have antioxidant activity because several types of lipids possess this property (Nwosu et al., 1997).

The ischemic and reperfusion state during the twisting of the spermatic cord causes the release of free radicals (Lee et al., 2012), which, in general, cause damage to DNA and RNA (Nikitaki et al., 2015) and peroxidation of the membrane lipid, triggering apoptosis signaling pathway (Acevedo-Morantes et al., 2012). However, few studies have evaluated the correlation between urologic diseases, fertility, and genetic damage. Therefore, the present study is the first to correlate the absence of genetic changes (genotoxic and mutagenic) and testicular ischemia/reperfusion, as the comparison of genetic lesions before ischemia/reperfusion (T0) and at 24, 48, and 72 hours after ischemia/reperfusion (T1, T2, and T3, respectively) did not change the comet frequency (frequency of damaged cells and classification scores) or the frequency of micronuclei. Although previous studies have reported increased levels of free radicals capable of changing the

germinal epithelium, these concentrations were not sufficient to cause DNA damage in peripheral blood when damage was evaluated using the comet and micronucleus assays, which are important biomarkers in the field of genetic toxicology (Vasquez, 2010) and are used by regulatory agencies to evaluate toxicity and monitoring, even in humans (Maffei et al., 2005). It is of note that these assays, when associated with teratogenicity and dominant lethal studies, help correlate reduced fertility and increased changes in reproductive performance with embryo-fetal development (David et al., 2014; Oliveira et al., 2015) and with possible pathological processes.

Regarding the administration of phosphatidylcholine, it was observed that this compound is not genotoxic or mutagenic, considering that no significant changes were observed between the FC150 and FC300 groups when the condition at T0 was compared with those at T1, T2, and T3. Biometric data also indicated no statistically significant differences between the control group and the two phosphatidylcholine groups. However, although genetic toxicity or reduced b.w. were not observed, 57.14% of the animals that received an i.p. dose of 300 mg/kg b.w. died in the first hours after treatment with phosphatidylcholine. Therefore, this dose may not cause apparent toxicity when evaluated by the decrease in b.w., opacity of the eyes and hair, mucosal dryness, hair bristling, behavior and motility changes, and lower food and water intake, which are important indicators of toxicity (Oliveira et al., 2015). However, this dose is close to that capable of killing 50% of the animals in the population evaluated (LD50), which precludes its use. Furthermore, the absence of mortality and signs of intoxication, together with the absence of genotoxic and mutagenic damage, favor the use of a dose of 150 mg/kg for antioxidant therapy against damage caused by ischemia/reperfusion.

One possible strategy to protect against these reactive species is the endogenous antioxidant defense performed by the enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and glutathione-S-transferase (Aitken and Roman, 2008). However, in the case of torsion of the spermatic cord, characterized by the increased production of reactive species, antioxidant therapies and/or compounds that enhance these effects, including phosphatidylcholine, can be used (Ikeda et al., 2011) to prevent cytotoxic injury to the tissues subjected to lack of nutrition and oxygenation.

This absence of DNA damage and toxicity using the lowest dose tested reinforces the indication of phosphatidylcholine in antioxidants therapies for the

protection of germ cells due to its activity against free radicals. In this respect, other experimental studies have demonstrated the efficacy of other drugs, including superoxide dismutase, catalase, mannitol, allopurinol, vitamin E, N-acetylcysteine, other iron-chelating compounds, angiotensin converting inhibitors, and calcium channel antagonists, for the attenuation of ischemia/reperfusion lesions (Silva-Jr et al., 2002; Antoniolli-Silva et al., 2005).

The mitochondrial damage caused by ischemia/reperfusion leads to a decrease in the activity of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), the ADP/ATP carrier, and ATP synthase. In addition, the concentrations of phospholipase A2, calcium, and free radicals are increased. It is known that the combination of these events leads to cell death and other possible changes via changes in the permeability of the outer mitochondrial membrane (Silva-Jr. et al., 2002). Considering that phosphatidylcholine has antioxidant activity (Nwosu et al., 1997) and is present in the cell membrane of most cells, its concentration and composition affect the integrity and function of cell membranes, and particularly cellular permeability, by increasing the solubility of cholesterol (Zocher et al., 2013). These characteristics favor the use of phosphatidylcholine to prevent the damage caused by ischemia/reperfusion. However, in the present study, the histological examination indicated no significant differences between the control group and the group that received the lowest dose of phosphatidylcholine; although, it was observed an improvement in the histological damage score.

Therefore, further studies should be conducted to clarify this tendency and the therapeutic effects of phosphatidylcholine for the protection of germ cells in testes subjected to ischemia/reperfusion, considering the potential therapeutic efficacy of this compound.

ACKNOWLEDGMENTS

Research funded by FUNDECT.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Acevedo-Morantes CY, Meléndez E, Singh SP, Ramírez-Vick JE (2012). Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines. *J. Cancer Sci. Ther.* 4: 271-275.
- Adibhatla RM and Hatcher JF (2007). Role of lipids in brain injury and diseases. *Future Lipidol.* 2: 403-422.
- Ahmed FA, Whelan J, Jequier AM, Cummins, J (2000). Torsion-induced injury in rat testes does not affect mitochondrial respiration or the accumulation of mitochondrial mutations. *Int. J. Androl.* 23: 347-356.
- Aitken RJ and Roman SD (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell Longev.* 1: 15-24.
- Antoniolli-Silva ACMB, Ortiz V, Silva RA, Tognini JR (2005). Effect of allopurinol on rat testicles morphology, submitted to ischaemia for spermatic cord torsion followed by reperfusion. *Acta Cirur. Bras.* 26: 468-470.
- Becker EJ Jr and Turner TT (1995). Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J. Androl.* 16: 342-351.
- Bolln C, Driver CP, Youngson GG (2006). Operative management of testicular torsion: current practice within the UK and Ireland. *J. Pediatr. Urol.* 2: 190-193.
- Chung E and Brock GB (2011). Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Can. Urol. Assoc. J.* 5: 210-214.
- Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK (1985). Histological changes occurring in the contralateral testis of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J. Urol.* 133: 906-911.
- Courrèges MC, Benencia F, Uceda A, Monserrat AJ (2003). Effect of dietary choline deficiency on immunocompetence in wistar rats. *Nutr. Res.* 23: 519-526.
- Cui Z and Houweling M (2002). Phosphatidylcholine and cell death. *Biochem. Biophys. Acta* 1585: 87-96.
- David N, Mauro MO, Gonçalves CA, Pesarini JR, et al. (2014). *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* 154: 370-379.
- Gunther P, Schenk JP, Wunsch R, Holland-Cunz S, et al. (2006). Acute testicular torsion in children: the role of sonography in the diagnostic workup. *Eur. Radiol.* 16: 2527-2532.

- Ikeda R, Ishii K, Hoshikawa Y, Azumi J, et al. (2011). Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 induced by transforming growth factor β 1 are the therapeutic targets of polyenylphosphatidylcholine in the suppression of human hepatic stellate cell activation. *Inflamm. Res.* 60: 597-604.
- Jesus LE (2000). Acute scrotum. *Rev. Col. Bras. Cir.* 27: 271-278.
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, et al. (1995). A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 3: 103-115.
- Lee JW, Kim JI, Lee YA, Lee DH, et al. (2012). Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J. Pediatr. Surg.* 47: 736-742.
- Macaluso M, Wright-Schnapp TJ, Chandra A, Johnson R, et al. (2010). A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertil. Steril.* 93: 1-10.
- Maffei F, Buschini A, Rossi C, Poli P, et al. (2005). Use of the Comet test and micronucleus assay on human white blood cells for in vitro assessment of genotoxicity induced by different drinking water disinfection protocols. *Environ. Mol. Mutagen.* 46: 116-125.
- Mel'Chinskaia EN, Gromnatskii NI, Kirichenko LL (2000). Hypolipidemic effects of alisat and lipostabil in patients with diabetes mellitus. *Ter. Arkh.* 72: 57-58.
- Nachtigall RD (2006). International disparities in access to infertility services. *Fertil. Steril.* 85: 871-875.
- Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat JL (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front. Chem.* 3: 1-15.
- Nwosu CV, Boyd LC, Sheldon B (1997). Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 293-297.
- Oliveira RJ, Mantovani MS, Pesarini JR, Mauro MO, et al. (2015). 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. *Genet. Mol. Res* 14: 834-849.
- Pompéia C, Cury-Boaventura MF, Curi C (2003). Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1949-1960.
- Ringdahl E and Teague L (2006). Testicular torsion. *Am. Fam. Physician.* 74: 1739-1743.

- Schuller-Perez A and San Martin FG (1985). Controlled study using multiply-unsaturated phosphatidylcholine in comparison with placebo in the case of alcoholic liver steatosis. *Med. Welt.* 72: 517-521.
- Sessions AE, Rabinowitz R, Hulbert WC, Goldstein MM, et al. (2003). Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. *J. Urol.* 169: 663-665.
- Shafi H, Esmaeilzadeh S, Delavar MA, Haydari FH, et al. (2014). Prevalence of Varicocele among Primary and Secondary Infertile Men: Association with Occupation, Smoking and Drinking Alcohol. *N. Am. J. Med. Sci.* 6: 532-535.
- Silva-Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, et al. (2002). Basics Aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cirur. Bras.* 17: 86-100.
- Sinha H and Swerdloff RS (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev. Reprod.* 4: 38-47.
- Sobinoff AP, Dando SJ, Redgrove KA, Sutherland JM, et al. (2015). Chlamydia muridarum infection-induced destruction of male germ cells and sertoli cells is partially prevented by Chlamydia major outer membrane protein-specific immune CD4 cells. *Biol. Reprod.* 92: 27.
- Tsyркunov VM (1992). Lipostabil in the treatment of viral hepatitis B in subjects who abuse alcohol. *Klin. Med.* 70: 75-78.
- Turner TT and Brown KJ (1993). Spermatoc cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol. Reprod.* 49: 401-407.
- Urt-Filho A, Inouye CS, Pontes JCDV, Antonioli-Silva ACMB, et al. (2012). Propofol effects on the morphology of rat testes subjected to testicular ischemia/reperfusion. *Acta Cirur. Bras.* 27: 172-178.
- Van Meer G (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 247-275.
- Vasquez MZ (2010). Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* 25: 187-199.
- Wei SM, Yan ZZ, Zhou J (2013). Involvement of reactive oxygen species and TATA box-binding protein-related factor 2 in testicular torsion/detorsion-induced injury. *Urology* 466:e9-e14.
- Zocher F, van der Spoel D, Pohl P, Hub JS (2013). Local partition coefficients govern solute permeability of cholesterol-containing membranes. *Biophys J.* 105: 2760-2770.

Zweigner J, Jackowski S, Smith SH, van der Merwe M, et al. (2004). Bacterial Inhibition of Phosphatidylcholine Synthesis Triggers Apoptosis in the Brain. *J. Exp. Med.* 5:200 99-106.