

PETERSON VIEIRA DE ASSIS

**EXPRESSÃO DE FAS LIGANTE NOS TESTÍCULOS IPSILATERAL E
CONTRALATERAL DE RATOS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO COR-
DÃO TESTICULAR UNILATERAL**

CAMPO GRANDE

2012

PETERSON VIEIRA DE ASSIS

**EXPRESSÃO DE FAS LIGANTE NOS TESTÍCULOS IPSILATERAL E
CONTRALATERAL DE RATOS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO COR-
DÃO TESTICULAR UNILATERAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Saúde e Desenvolvimento na Re-
gião Centro-Oeste, objetivando a ob-
tenção do título de Mestre.

Área de concentração em
Tecnologia e Saúde, Carcinogênese
Experimental e Estudos do Câncer na
Região Centro-Oeste.

Orientador. Prof. Doutor Ricardo Du-
tra Aydos

Co-Orientadora: Profa. Doutora Ian-
dara Schettert Silva

CAMPO GRANDE

2012

ASSIS, Peterson Vieira de

Expressão de Fas ligante nos Testículos Ipsilateral e Contralateral de Ratos Submetidos à Torção do Cordão Testicular Unilateral. Campo Grande – MS, 2012.

50p.

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

Expression of Fas ligand in the Ipsilateral and Contralateral Testicles of Rats Submitted to Unilateral Cord Torsion.

1. Proteína ligante Fas 2. Torção do Cordão Espermático 3. Estresse Oxidativo 3. Ratos.

PETERSON VIEIRA DE ASSIS

EXPRESSÃO DE FAS LIGANTE NOS TESTÍCULOS IPSILATERAL E CONTRALATERAL DE RATOS SUBMETIDOS À TORÇÃO DO CORDÃO TESTICULAR UNILATERAL

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.

Resultado: **APROVADO.**

Campo Grande (MS), **28** de **Março** de **2012.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor Ricardo Dutra Aydos
Instituição: UFMS

Prof.Doutor Marcus Vinicius Henriques Brito
Instituição: UEPA

Prof. Doutor Marco Antonio Gonçalves
Instituição: UFMS

Prof. Doutor Danilo Mathias Zanella Guerisoli
Instituição: UFMS

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.

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

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.

Ao Professor Doutor Ricardo Dutra Aydos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e meu orientador, por seus ensinamentos.

À Professora Doutora Iandara Schettert Silva, Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e minha co-orientadora, pelo inestimável apoio na elaboração do método desta tese, auxiliando diretamente no experimento.

Ao Professor Mestre Luiz Carlos Takita, Professor Assistente da Disciplina de Anatomopatologia Especial da UFMS, e ao Técnico em Imunopatologia Rodrigo Avelar pelo apoio incontestável na realização do estudo imuno-histoquímico.

Ao Professor Doutor Guido Marks, Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pela excelente sugestão do tema que originou esta pesquisa.

Ao Professor Doutor Danilo Mathias Zanello Guerisoli, Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pelo auxílio, orientação e contribuição na análise estatística.

Ao Professor Mestre 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, Henrique Rodrigues Coelho, Guilherme Maffei Lemos e Alexandre Eustáquio Buzetti de Sá, pelo auxílio e colaboração no decorrer deste trabalho.

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

RESUMO

Assis, PV. Expressão de FAS ligante nos testículos ipsilateral e contralateral de ratos submetidos à torção do cordão testicular unilateral. Campo Grande, 2012. [Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Avaliar a expressão da proteína ativadora de apoptose FAS ligante (FASL) nos testículos ipsilateral e contralateral de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia / reperfusão. Método: Ratos Wistar (n=21) distribuídos em 3 grupos, após anestesia e exposição testicular via escrotal o procedimento variou conforme os grupos: GC, grupo controle (n=5) apenas exposição de ambos os testículos seguida de orquiectomia bilateral, GI, grupo isquemia (n=8) exposição do testículo esquerdo com torção do seu cordão a 720° por 3 horas seguido de orquiectomia imediata deste testículo sem destorção e orquiectomia do testículo contralateral após 24 horas e GR, grupo reperfusão (n=8), exposição do testículo esquerdo com torção do seu cordão a 720° por 3 horas seguido de destorção e reposicionamento do testículo no escroto e orquiectomia bilateral após 24 horas, subdividindo cada grupo em 2 subgrupos conforme o lado do testículo, sendo E (esquerdo-ipsilateral) e D (direito-contralateral). Quantificação da expressão de FASL foi pela imuno-histoquímica com utilização para leitura das lâminas de microscópio acoplado com câmera digital com LAS software version 4.0.0, 2011, com conexão a notebook, selecionando-se 40 túbulos seminíferos por lâmina, e processou-se a contagem das células de Sertoli com imunoexpressão positiva para FASL com objetiva de 40x. Análise estatística revelou que o GC e GI são semelhantes ($p > 0,05$) e que as diferenças detectadas concentram-se no GR ($p < 0,05$), com aumento da imunoexpressão FASL nas células de Sertoli dos subgrupos GRD ($406,8 \pm 61,5$) e GRE ($135,3 \pm 28,9$) com predomínio estatisticamente significativo para o subgrupo GRD (testículos contralaterais do GR). Concluiu-se que a isquemia / reperfusão aumentou significativamente a expressão de FASL nos testículos contralaterais no GR, em ratos.

Palavras-chave: Proteína ligante Fas, torção do cordão espermático, estresse oxidativo, ratos.

ABSTRACT

Assis, PV. Expression of FAS ligand in the ipsilateral and contralateral testicles of rats submitted to unilateral testicular cord torsion. Campo Grande, 2012. [Essay - Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Federal University of Mato Grosso do Sul].

Objective: Evaluate the expression of apoptosis-activating protein FAS ligand (FASL) in the ipsilateral and contralateral testicles of rats submitted to ischemia / reperfusion phenomenon. Method: Wistar rats (n=21) were distributed in three groups after anesthesia and testicular exposure by scrotum way. The procedure was varied according to the groups: GC= control group (n=5) only exposure of both testicles followed by bilateral orchiectomy; GI= ischemia group (n=8) left testicular cord twist at 720 ° for 3 hours followed by immediate orchiectomy of this testicle without detorsion and also by orchiectomy of the contralateral testicle after 24 hours, and GR= reperfusion group (n=8), with left testicular cord torsion at 720 ° for 3 hours followed by detorsion and reposition of the testicles into the scrotum and bilateral orchiectomy after 24 hours, subdividing each group into two subgroups according to the testicles sides, wich are: E (left-ipsilateral) and D (right-contralateral). The quantification of FASL expression was made by immunohistochemistry. The slides reading was performed by using a microscope acoupled to a digital camera with software version 4.0.0 LAS, 2011, connected to a laptop by selecting 40 seminiferous tubules per slide, and processing the counting of Sertoli cells with positive immunostaining for FAS-L with a 40x objective. Statistical analysis revealed that the GC and GI are similar ($p>0,05$) and that the differences are concentrated in GR ($p<0,05$), with an increase in FASL immunoexpression in Sertoli cells of the GRD subgroups ($406,8 \pm 61,5$) and GRE ($135,3 \pm 28,9$) with a statistically significant predominance for subgroup GRD (contralateral testicles of GR). It was concluded that ischemia / reperfusion significantly increased the expression of FASL in the contralateral testicles of the GR in rats.

Key-words: FAS ligand protein, spermatic cord torsion, oxidative stress, rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no Grupo C (controle).....	31
Tabela 2: Contagem de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no Grupo I (isquemia).....	31
Tabela 3: Contagem de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no Grupo R (reperfusão).....	32
Tabela 4: Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante nos grupos controle, isquemia e reperfusão.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de distribuição dos animais nos diferentes grupos e subgrupos.....	25
Figura 2: A) Exposição do testículo esquerdo; B) Torção do cordão testicular esquerdo a 720°; C) Destorção do cordão testicular esquerdo; D) Sutura do escroto.....	27
Figura 3: Figura 3: A) Testículo esquerdo (ipsilateral) 24 h (GR); B) Exposição dos testículos (24h) GR.....	28
Figura 4: Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante de acordo com cada lado e grupo experimental.....	33
Figura 5: Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no testículo esquerdo dos diferentes grupos.....	34
Figura 6: Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no testículo direito dos diferentes grupos.....	35
Figura 7: Fotomicrografia de túbulos seminíferos, aumento de 400x, mostrando células de Sertoli com expressão fortemente positiva de FASL, na coloração marrom (GR).....	36
Figura 8: Fotomicrografia de túbulos seminíferos, aumento de 400x, mostrando células de Sertoli com expressão fracamente positiva de FASL (GC).....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABC	Avidin-biotin complex
Apo-1	Apolipoproteína-1
Apo-1L	Apolipoproteína-1 ligante
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bid	Bh3-interacting domain agonist
Bim	Bcl2 interacting mediator
CD	Subgrupo controle de testículos direitos
CE	Subgrupo controle de testículos esquerdos
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FADD	FAS Associated Death Domain
FAS/CD95	Proteína Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FASL/CD95-L	Ligante da proteína Fas (TNF Ligand superfamily, member 6)
FAS ligante	Ligante da proteína Fas (TNF Ligand superfamily, member 6)
GC	Grupo controle
GI	Grupo isquemia
GR	Grupo reperfusão
HD	Hexanodiona

ID	Subgrupo isquemia de testículos direitos
IE	Subgrupo isquemia de testículos esquerdos
MEHCP	Mono-2-etilhexilftalato
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MS	Mato Grosso do Sul
RD	Subgrupo reperfusão de testículos direitos
RE	Subgrupo reperfusão de testículos esquerdos
TCT	Torção do Cordão Testicular
TNF	Tumor Necrosis Factor
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
ZEA	Zearalenona

LISTA DE SÍMBOLOS

° graus

gr grama

cm centímetro

°C graus Celsius

% percentagem

mg miligrama

mm milímetro

GHz gigahertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3 OBJETIVO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODO.....	23
4.1 Aprovação.....	23
4.2 Amostra.....	23
4.3 Distribuição dos grupos.....	24
4.4 Procedimentos.....	25
4.4.1 <u>Anestesia e analgesia.....</u>	26
4.4.2 <u>Procedimento operatório.....</u>	26
4.4.3 <u>Observação pós- operatória.....</u>	27
4.4.4 <u>Preparo de blocos e lâminas.....</u>	28
4.4.5 <u>Imuno-histoquímica.....</u>	29
4.4.6 <u>Captura de imagem da microscopia.....</u>	29
4.4.7 <u>Quantificação da imuno-histoquímica.....</u>	29
4.4.8 <u>Análise estatística e metodologia.....</u>	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Comparação entre lados esquerdo e direito.....	33
5.2 Comparação entre procedimentos no lado esquerdo.....	33
5.3 Comparação entre procedimentos no lado direito.....	34

6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÃO.....	41
8 REFERÊNCIAS.....	42
9 APÊNDICE.....	47
10 ANEXO.....	50

1 INTRODUÇÃO

A torção do cordão testicular (TCT) é resultante de uma inadequada rotação do testículo em torno do seu eixo longitudinal. É uma condição patológica que torna o testículo isquêmico, e a intervenção cirúrgica é geralmente necessária para restabelecer o fluxo sanguíneo (WILLIAMSON, 1985).

A isquemia decorrente da TCT, no ser humano, é uma emergência urológica de incidência não muito rara em indivíduos jovens (WILLIAMSON, 1976).

A incidência anual é de 1 em cada 4000 homens com menos de 25 anos de idade (SKOGLUND, MCROBERTS, RAGDE, 1970; ANDERSON, WILLIAMSON, 1986; RINGDAHL, TEAGUE, 2006), representando 40% de todas as causas de escroto agudo em crianças (RODRIGUEZ, DE LORCA, FERNANDEZ, 2007).

O tratamento consiste de destorção cirúrgica e orquidopexia bilateral por acesso transescrotal, sendo indicada a orquiectomia apenas para testículos claramente inviáveis que não se reperfundem após a destorção cirúrgica, ou com necrose (JESUS, 2000).

Caso ocorra atraso no diagnóstico e no tratamento, os resultados obtidos podem ser necrose testicular, infertilidade (KRARUP, 1978; BARTSCH *et al.* 1980; FERREIRA *et al.*, 1991) e eventuais implicações médico-legais (MATTESON *et al.*, 2001; MANSBACH FORBES, PETERS, 2005; PERROTTI *et al.*, 2006; RINGHDAL, TEAGUE, 2006), bem como elevar o risco de neoplasia (CHILVERS, PIKE, PECKHAM, 1987).

A TCT, inicialmente, leva a oclusão do retorno venoso, edema, ruptura com hemorragia intersticial e, posteriormente, à oclusão arterial, com isquemia generalizada (COSENTINO *et al.*, 1986; GUIMARÃES, VASCONCELOS, 2002).

A extensão da lesão, resultado da compressão de veias e artérias, depende da duração e do grau de torção. A lesão testicular, resultante da torção e destorção, assemelha-se ao fenômeno de isquemia / reperfusão, observado em outros tecidos e pode, em parte, ser gerada pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), assim como por outros agentes oxidantes (TURNER, 1985). A isquemia / reperfusão induz à lesão aguda em vários tecidos, como, coração, cérebro, rins e testículos e é frequentemente utilizada como modelo

experimental de infarto e hiperoxigenação. Além disso, o papel da apoptose tem sido destacado na disfunção tecidual por isquemia / reperfusão, sugerindo que a apoptose pode potencialmente influenciar a extensão da lesão tecidual (TURNER *et al.*, 1997).

Em termos histológicos, a torção parece induzir, no testículo contralateral, lesão focal dos túbulos seminíferos, caracterizada por apoptose e descamação das células germinativas, possivelmente mediadas pela resposta imunitária celular e humoral (RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Atualmente, tem-se conhecimento que a apoptose é um processo vital para o desenvolvimento embrionário, manutenção da homeostase tecidual e para o funcionamento do sistema imune. Alterações no processo apoptótico podem levar ao aparecimento de diversas condições patológicas, como, doenças autoimunes e câncer (CORY, ADAMS, 2002; CORY, HUANG, ADAMS, 2003).

A morte celular programada é via comum a múltiplas enfermidades. O estresse oxidativo causado por radicais livres vem sendo implicado na gênese de várias doenças, seja por alterações da homeostase do meio externo, bem como por erros intrínsecos do metabolismo celular, orgânico e sistêmico. O mecanismo regulador da apoptose é complexo, com múltiplas vias de ativação, que não são únicas nem estáticas. Estudos moleculares vêm elucidando mecanismos de ativação, regulação e contrarregulação da apoptose, identificando proteínas de superfície celular que funcionam como receptores para agentes capazes de induzir morte celular (BREDESEN, MEHLEN, RABIZADEH, 2004).

A apoptose das células germinativas testiculares ocorre normal e continuamente ao longo da vida, e quando o ambiente testicular não pode suportar a espermatogênese, como, por exemplo, durante alterações do suporte hormonal, exposição ao calor, radiação ou exposição a compostos ambientais e quimioterapêuticos (HIKIM, SWERDLOFF, 1999).

Essas descobertas indicam que a apoptose pode ser uma via comum na indução de morte de células germinativas em testículo normal, bem como em testículo submetido à agressão. Todavia, o conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à indução de apoptose em células germinativas é ainda um tanto limitado.

A proteína FAS ligante (FASL) é um ativador da apoptose por via extrínseca que pode ser quantificado por imuno-histoquímica. Determinar o comportamento de FASL, em modelo experimental, frente ao estresse oxidativo, é importante na

compreensão da via de ativação da apoptose nos testículos submetidos ao fenômeno de isquemia / reperfusão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A lesão testicular contralateral resultante da torção do cordão testicular é controversa. Alguns autores mostraram que a torção testicular unilateral causa lesão testicular contralateral (SABA *et al.*, 1997; MOGILNER *et al.*, 2006), enquanto outros mostraram que não há lesão contralateral (TURNER, 1985; TURNER, BROWN, 1993; BECKER, PRILLAMAN, TURNER 1997; NGUYEN *et al.*, 1999; BOZLU *et al.*, 2004; KOC *et al.*, 2005; SALMASI *et al.*, 2005).

Várias teorias têm sido propostas, na tentativa de explicar o possível dano ao testículo contralateral, incluindo reação autoimune, episódios subclínicos de torção testicular contralateral, liberação de enzimas acrossômicas, reflexo vasomotor, resposta neuroendócrina, defeito subjacente na espermatogênese e anormalidade gonadal intrínseca (NGUYEN *et al.*, 1999; VISSER, HEYNS, 2003).

Cosentino *et al.* (1985) estudaram ratos pré-púberes expostos à torção de 720° do cordão testicular unilateral de 0, 1, 3, 5, 9 ou 12 horas de duração. Ao término desse tempo, os testículos danificados foram removidos ou destorcidos e recolocados no lugar. Os animais, ao atingirem 77 dias de idade, tiveram os testículos contralaterais examinados por 12 parâmetros histológicos e pontuados de acordo com o grau de patologia observado em cada um. As alterações patológicas no testículo contralateral foram dependentes da duração da torção do cordão espermático, mas foram menos graves no grupo orquiectomizado. Assim, a retirada do órgão minimizou os danos em longo prazo para o testículo contralateral.

Estudos mostraram que a perfusão testicular, em ratos, submetidos à TCT de 720°, apresentou resultados de fluxo sanguíneo residual, variando de 8% a 38,3%, utilizando técnica de dopplerfluxometria a laser que permite mensurar continuamente o fluxo sanguíneo microvascular (BECKER *et al.*, 1997; PALMER, PLZAK, CROMIE 1997).

Estudando o estresse oxidativo induzido por torção do cordão testicular, em ratos jovens, concluíram que a TCT de 720°, por 3 horas, seguida de destorção, induz à peroxidação lipídica significativa e redução de glutathione dos testículos e é, por conseguinte, um modelo válido para estudar os efeitos do estresse oxidativo da lesão de isquemia / reperfusão, em ratos (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

A FAS ligante é uma glicoproteína que foi isolada em 1994 (SUDA, NAGATA, 1994). Apresenta atividade indutora de apoptose em células portadoras da apolipoproteína FAS, em sua membrana celular, iniciando uma série de eventos que culminarão em apoptose (BREDESEN, MEHLEN, RABIZADEH, 2004), exercendo efeitos antitumorais, assim como regulando autoimunidade. Vários achados, no entanto, mostram que a sinalização FAS – FAS ligante, em situações específicas, está implicada em ativação celular, diferenciação e proliferação em via contrária à apoptose, fornecendo privilégios imunológicos ao tumor. Estudos experimentais têm sido utilizados para desvendar tais eventos, demonstrando alta complexidade no mecanismo envolvido (STRASSER, JOST, NAGATA, 2009).

A apoptose é um tipo de morte celular com morfologia relativamente uniforme, muito embora ocorra em diferentes situações, desde resposta à injúria, renovação tecidual fisiológica ou frente a mutações celulares. O termo “morte celular programada” foi sugerido pela primeira vez por Lockshin e Williams, em 1964, a partir da observação da morte regular de células de insetos. Em 1972, o termo “apoptose” (do grego *Apo*= fora e *ptosis*= cair) foi utilizado pela primeira vez, por Kerr, para descrever o processo (BREDESEN, MEHLEN, RABIZADEH, 2004).

É caracterizada por alterações morfológicas distintas no núcleo e no citoplasma, clivagem da cromatina em locais regularmente espaçados e clivagem endonucleolítica do DNA genômico em sítios internucleossômicos. Esse modo de morte celular serve como equilíbrio para a mitose no controle do tamanho dos tecidos animais e mediação dos problemas associados ao crescimento tumoral (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de EROS (HENGARTNER, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas maneiras diferentes: pela via intrínseca (mitocondrial) e pela via extrínseca (citoplasmática). A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de membrana da superfamília TNF (Tumor Necrosis Factor), como, por exemplo, FAS. Quando ativadas, geralmente pela ação de ligantes específicos, como FASL, ocorre a trimerização do receptor (também chamados de “receptores de morte”), o que, por sua vez, possibilita a ligação de uma molécula de FADD (“FAS ASSOCIATED DEATH DOMAIN”) na região citoplasmática desse receptor, FADD,

então, recruta a procaspase-8, através dos domínios e fatores de morte homólogos entre essas proteínas. A proximidade dos zimógenos promove sua dimerização e subsequente autocatálise, levando à ativação da caspase 8 (BOATRIGHT *et al.*, 2003). A caspase-8 ativada irá levar à ativação das caspases efetadoras 7 e 10 que irão desmontar a estrutura celular. Mais que isso, a caspase-8 pode também ativar as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl2, em especial, Bid e Bim, levando, assim, à ocorrência de MOMP (“Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization”) e, conseqüentemente, à liberação de proteínas pró-apoptóticas pela mitocôndria. Devido a isso, a via extrínseca é também chamada de via de amplificação de sinal, já que contribui para a ativação da via mitocondrial de morte (ADAMS, 2003).

O sistema FAS era originalmente caracterizado como sendo um mecanismo chave para indução de apoptose em células imunes (KRAMMER *et al.*, 1991). O testículo é um órgão imune privilegiado, que expressa FAS, e sabe-se que, na morte de células espermátogênicas, geralmente ocorre uma interação direta entre células de Sertoli que expressam FASL e células germinativas que expressam FAS, levando assim à eliminação das células germinativas feridas, por apoptose (XU *et al.*, 1999).

A sinalização do sistema FAS ocorre através da interação da proteína FAS (CD95, APO-1) e FAS ligante (FASL, CD95L, APO-1L) (KRAMMER *et al.*, 1991). No testículo, o sistema FAS desempenha um papel na apoptose de células germinativas, após isquemia / reperfusão, estresse e exposição do testículo a agentes tóxicos (KOJI, HISHIKAWA, 2003; BOEKELHEIDE, 2005).

Em um estudo, em ratos, utilizando substâncias tóxicas que alvejam seletivamente as células de Sertoli, mono-2-etilhexilftalato (MEHP) e 2,5 hexanodiona (2,5 HD), para estudar a apoptose em células germinativas testiculares, demonstrou-se inicialmente que a expressão FASL se localiza nas células de Sertoli e a expressão FAS nas células germinativas, e que após exposição foi identificado um aumento da regulação FASL em ambos os modelos tóxicos, sugerindo uma ativação endógena da via mediada por FAS, resultante a partir de células de Sertoli feridas, concluindo que, em estado normal, as células de Sertoli expressam FASL sinalizando parte das células germinativas FAS positiva, limitando o tamanho da produção de células germinativas que pode suportar. Após lesão, as células de Sertoli aumentam a expressão FASL para chegar a um novo

estado de equilíbrio, que corresponde à capacidade reduzida de suporte das células de Sertoli disfuncionais com menos células germinativas (LEE *et al*, 1997).

Em um estudo envolvendo o FAS e FAS ligante na apoptose de células germinativas testiculares por zearalenona (ZEA), em ratos, os autores concluíram que a exposição aguda de uma micotoxina estrogênica não esteroide (ZEA) induziu à apoptose em células germinativas de ratos machos e que essa toxicidade é parcialmente mediada através da modulação do sistema FAS e FASL. No entanto, enquanto um número máximo de células apoptóticas e um pico na expressão FAS foram observados às 12 horas, os níveis da expressão FASL aumentaram de forma tempo dependente (JEE *et al*, 2010).

Em um estudo analisando o possível envolvimento do FAS e FASL, na indução de apoptose de células germinativas em testículos normais e isquemia / reperfusão por clampeamento da artéria e veia testicular do testículo esquerdo, com pinça vascular por 60 minutos e após reperfusão por pontos de tempo (0, 12, 24 e 48 horas) em camundongos adultos machos pesando 30-40g, a apoptose foi avaliada pelo método de Tunel e pela eletroforese, em gel de DNA, e as proteínas FAS e FASL foram analisadas por Western blotting e imuno-histoquímica. A apoptose de células germinativas foi identificada no testículo normal, especialmente em torno dos estágios XI e XII, enquanto a expressão de FAS e FASL foi largamente confinada às células de Leydig e Sertoli, respectivamente. No entanto, nos testículos reperfundidos, após 1hora de isquemia, um elevado número de células Tunel positivas foram identificadas, em paralelo com o aumento de FAS positiva, em células germinativas (com pico às 24 horas), enquanto a expressão FASL, em células de Sertoli, foi quase constante, independente do avanço da reperfusão, parecendo estar ligeiramente elevada, em 24 horas. Além disso, a injeção de anticorpo anti-FAS, que bloqueia a interação entre FAS e FASL, inibiu a apoptose, como indicado pelo número reduzido de células túnel positivas, com exceção da apoptose em estágios XI e XII, indicando que o sistema FAS / FASL medeia a apoptose de células espermatogênicas nos testículos feridos, mas não a apoptose espontânea, no testículo normal (KOJI *et al.*, 2001).

Em um estudo para quantificar a expressão FASL, utilizando azoximetano que induz estresse oxidativo em mucosa gástrica de ratos Wistar, a proteína FASL foi analisada por método imuno-histoquímico, evidenciando aumento de sua expressão, 3h após a administração do azoximetano (KANOMATA, 2011).

3 OBJETIVO

Avaliar a expressão imuno-histoquímica de FAS ligante em testículos ipsilateral e contralateral de ratos submetidos à isquemia / reperfusão, por torção do cordão testicular unilateral.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aprovação

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de ética, no uso de animais, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob protocolo número 317/2011, de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, com a legislação vigente e demais disposições da Ética em Investigação que envolve diretamente os animais (certificado no anexo).

4.2 Amostra

Foram utilizados 21 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, com peso médio de 280 ± 20 gramas, com idade de 70 dias, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os animais foram alojados em salas exclusivas com ambiente adaptado às necessidades da espécie e os procedimentos experimentais realizados no laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação por sete dias prévios aos procedimentos, para observação e adaptação e, durante esse período, receberam ração balanceada própria para a espécie, água à vontade, tendo ainda permanecido alojados em gaiolas de polipropileno com tampa em arame perfilado zincado (malha 0,7 cm), com medidas de 41x31x16 cm, com o máximo de cinco animais por gaiola, em condições de iluminação controlada (323 lumens por metro quadrado), com luz, das 6 às 18 horas, e escuridão, das 18 às 6 horas, além de temperatura estável ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), mantida por ar condicionado, com umidade relativa do ar entre 50 e 70%, controlada por termo-higrômetro, higienização diária e ruídos controlados.

4.3 Distribuição dos Grupos

Aleatoriamente, os animais foram distribuídos em: **Grupo C** (n=5), **Grupo I** (n=8) e **Grupo R** (n=8), segundo o tipo de procedimento experimental (figura 1).

Grupo C (n=5) - animais submetidos à orquiectomia bilateral sem isquemia.

Grupo I (n=8) - animais submetidos à isquemia testicular esquerda seguida de orquiectomia imediata deste testículo e orquiectomia do testículo contralateral, após 24 horas.

Grupo R (n=8) – animais submetidos à isquemia e reperfusão do testículo esquerdo e orquiectomia bilateral, após 24 horas.

Os grupos foram subdivididos em subgrupos, conforme o lado do testículo:

D – direito (contralateral);

E – esquerdo (ipsilateral).

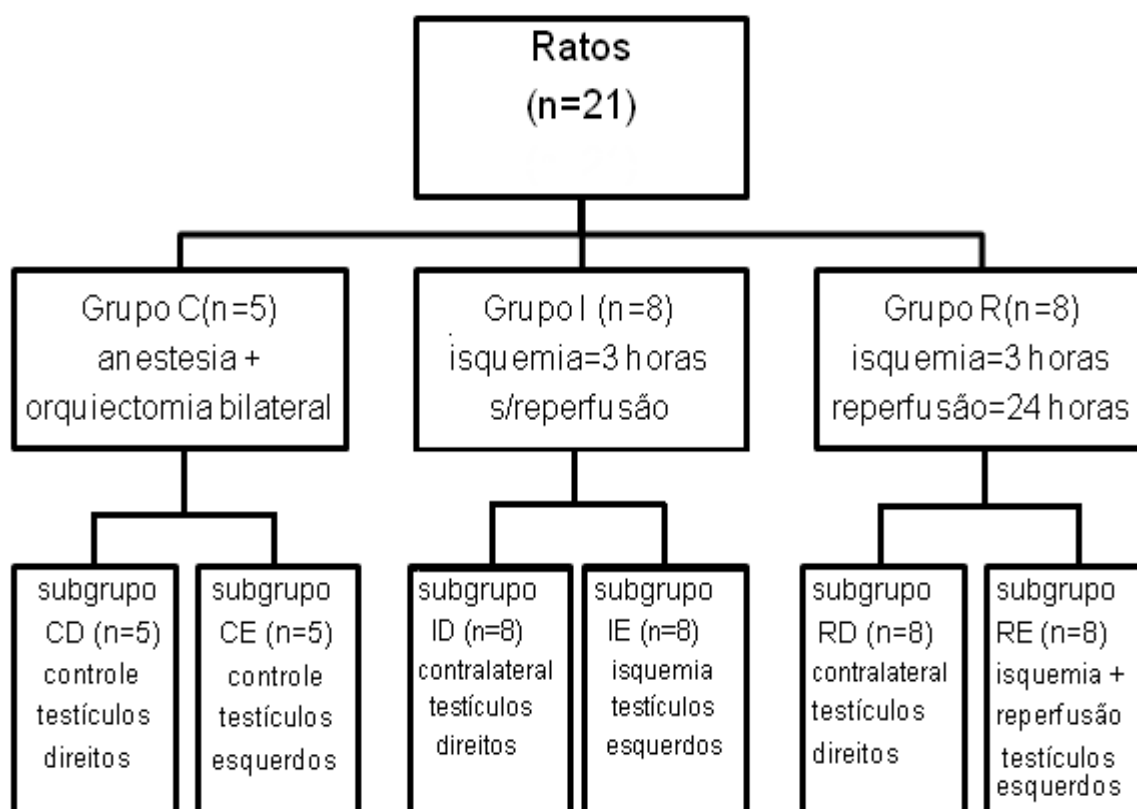


Figura 1 - Esquema de distribuição dos animais nos diferentes grupos e subgrupos.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Anestesia e analgesia

Os animais foram identificados mediante marcação na cauda, conforme cada grupo. Foram, então, pesados em balança e anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina, na dose de 0,5 mg por 100 g de peso, e cloridrato de xilazina, na dose de 0,2 mg por 100 g de peso. Após ter sido constatada a perda da reação por estímulos mecânicos, com a perda dos reflexos de endireitamento e perda de reflexo córneo-palpebral, foi realizado o procedimento operatório.

Foi administrado sulfato de morfina, na dose de 0,5 mg / animal, por via subcutânea, para analgesia.

4.4.2 Procedimento operatório

Os animais foram submetidos à raspagem dos pelos e posicionados em decúbito dorsal horizontal com exposição do escroto. Em seguida, procedeu-se a antissepsia da região escrotal, em solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10%, e colocação de campo operatório fenestrado esterilizado. Utilizando-se material de pequena cirurgia, realizou-se incisão escrotal longitudinal mediana de 20 mm de extensão, com bisturi lâmina 15 e o procedimento foi realizado conforme o grupo sorteado.

Grupo C (controle): realizada abertura da túnica vaginal esquerda e direita, com exposição de ambos os testículos (sem torção), seguida de orquiectomia bilateral.

Grupo I (isquemia): realizada abertura da túnica vaginal esquerda, com exposição do testículo esquerdo, sendo o seu cordão torcido por duas voltas completas (720°), com rotação do testículo em sentido horário. O cordão do testículo esquerdo foi mantido torcido, com o testículo envolvido em gaze umedecida em solução salina isotônica a 0,9%, por um período de 3 horas. A seguir, foi realizada a orquiectomia esquerda, sem a destorção do cordão, com clampeamento do seu cordão testicular com duas pinças hemostáticas e secção,

entre pinças, com lâmina de bisturi 15; o coto proximal do cordão foi ligado e o escroto suturado em plano único com pontos simples de fio mononylon 4.0.

Grupo R (reperfusão): realizada abertura da túnica vaginal esquerda com exposição do testículo esquerdo, sendo o seu cordão torcido por duas voltas completas (720°), com rotação do testículo em sentido horário. O cordão do testículo esquerdo foi mantido torcido com o testículo envolvido em gaze umedecida em solução salina isotônica a 0,9%, por período de 3 horas. A seguir, foi realizada a destorção completa do cordão testicular no sentido anti-horário, aguardada a melhora da coloração testicular (viável), sendo esse cordão reposicionado na bolsa testicular, em sua posição anatômica habitual, e o escroto suturado em plano único, com pontos simples de fio mononylon 4.0 (Figura 2).

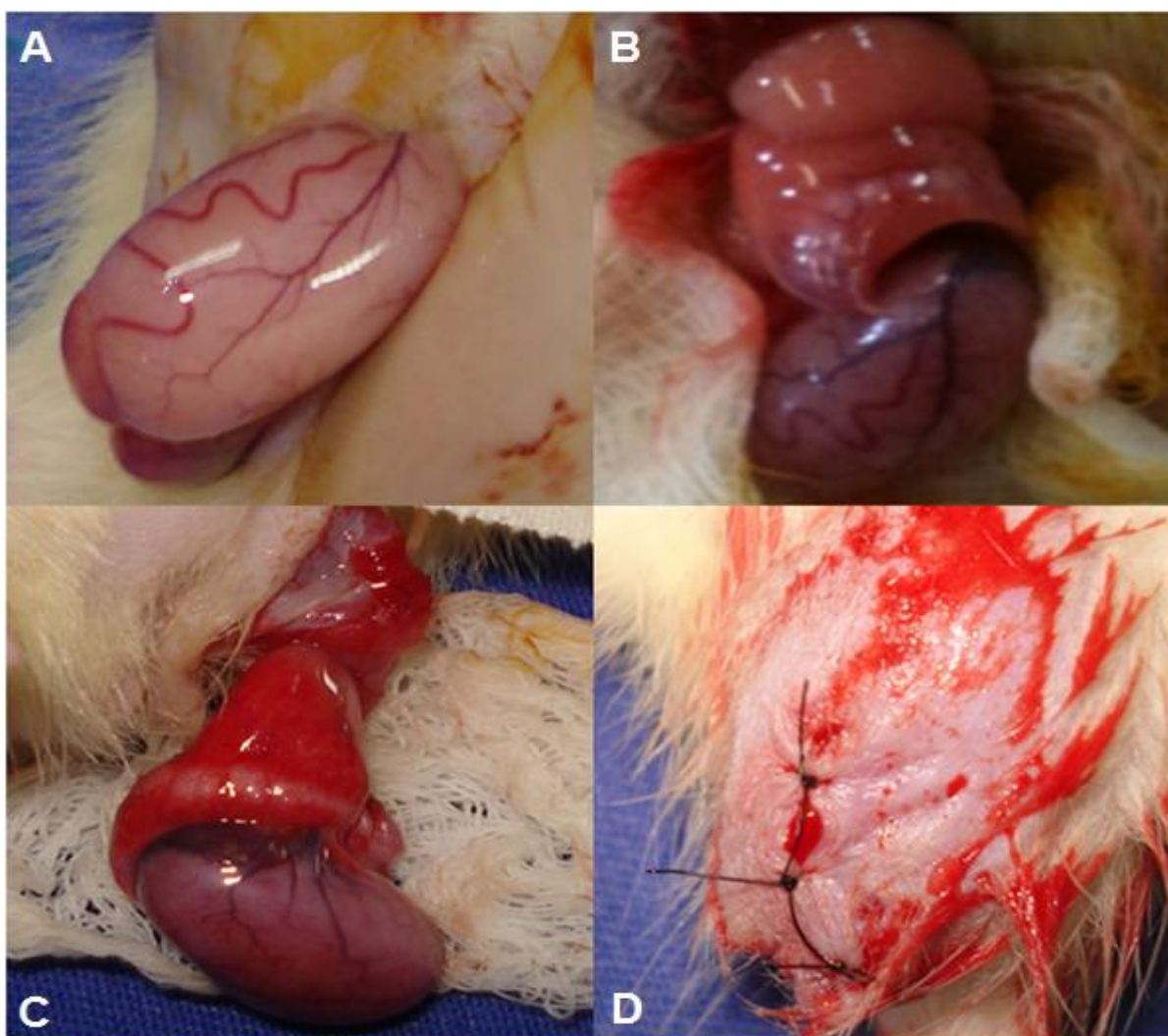


Figura 2 - A) Exposição do testículo esquerdo; B) Torção do cordão testicular esquerdo a 720° ; C) Destorção do cordão testicular esquerdo; D) Sutura do escroto.

Fonte: O autor (2012).

4.4.3 Observação pós-operatória

Os animais do grupo I e R, após recuperação anestésica, foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno e permaneceram em observação clínica, por 24 horas, com livre acesso à ração e água, em salas exclusivas, no biotério.

Concluídas as 24 horas de observação, os animais dos dois grupos receberam anestesia similar à do ato operatório, a sutura escrotal foi desfeita e a ablação cirúrgica dos testículos remanescentes realizada (Figura 3).

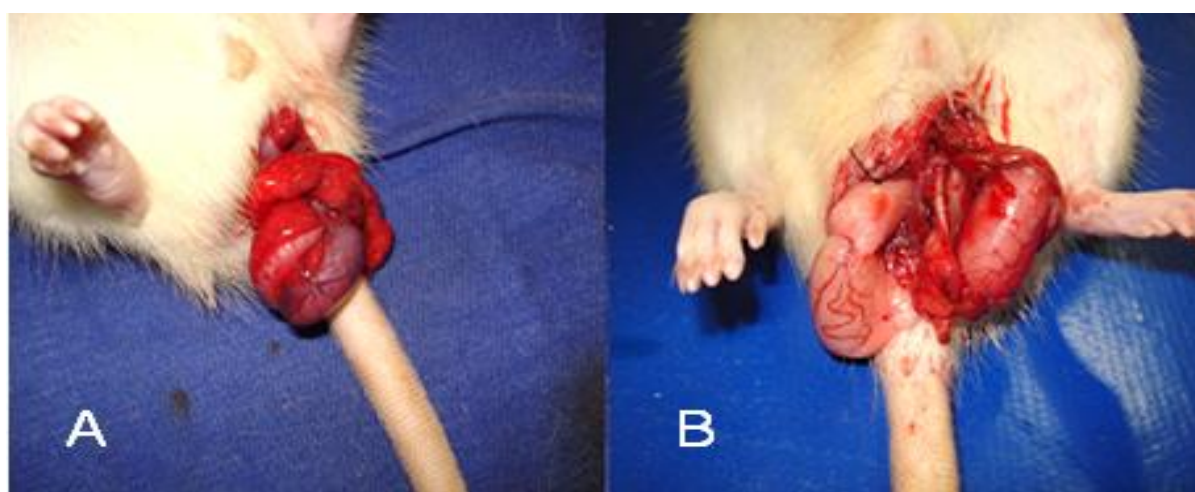


Figura 3 - A) Testículo esquerdo (ipsilateral) 24 h (GR); B) Exposição dos testículos (24h) GR.
Fonte: O autor (2012).

A eutanásia dos animais foi obtida pela injeção intraperitoneal de tiopental sódico, na dose de 10 mg por 100 gramas de peso corporal.

Todas as peças anatômicas (testículos) deste estudo, logo após serem retiradas, receberam uma incisão na túnica albugínea, na borda anterior, estendendo-se da extremidade superior à inferior, com exposição do parênquima e foram imersas em frascos individuais, com formol tamponado a 10%, identificadas por grupo e subgrupo, e encaminhadas ao laboratório de anatomopatologia Screenlab®, para processamento histotécnico, até o dia seguinte.

4.4.4 Preparo de blocos e lâminas

Recebidas em formalina e, após 12 horas de fixação, as peças cirúrgicas foram processadas no processador de tecidos modelo PT mono 2000, marca Lupe, em álcool, xileno e parafina, sucessivamente, por 12 horas, e, posteriormente, emblocadas em parafina para serem submetidas a cortes histológicos.

Os blocos de parafina foram submetidos à diérese, com micrótomo rotativo tipo Minot, marca Microm, modelo HM 315, em corte interessando o maior eixo, com 3 micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram afixados em lâminas de vidro, com carga eletrostática, para imuno-histoquímica.

4.4.5 Imuno-histoquímica

O processamento imuno-histoquímico (técnica *avidin-biotin complex*, ABC) foi realizado no laboratório Screenlab®, com a utilização de anticorpo primário anti-FAS ligante (epítipo terminação – N20, Santa Cruz®, produto SC834, lote A1812, diluição 1:100), anticorpo secundário Dako LSAB® (produto K0609, lote 10055833) e revelador de cor DAB (diamino + benzidina) Dako® (produto K3468, lote 10029914, diluição 1:10), com imunopositividade da expressão do biomarcador anti-FAS ligante, na coloração marrom.

As figuras a seguir representam as diferenças na expressão de FASL nas células de Sertoli encontradas no experimento:

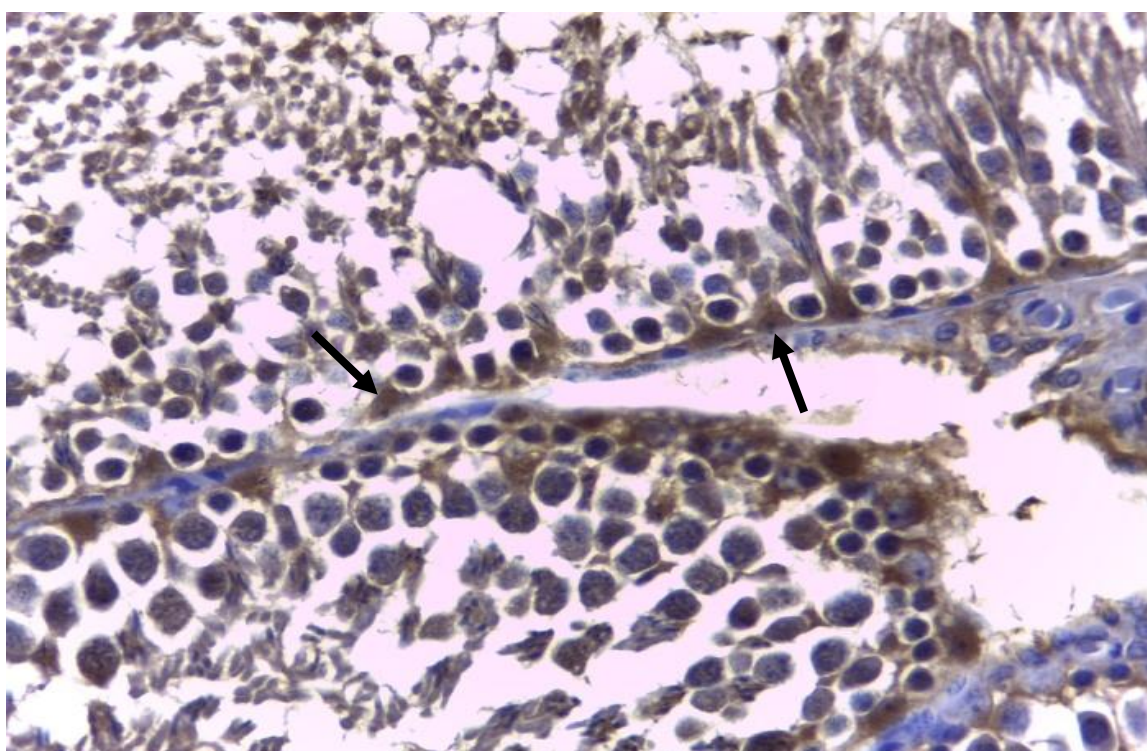


Figura 4 – Fotomicrografia de túbulos seminíferos, aumento de 400x, mostrando células de Sertoli com expressão fortemente positiva de FASL, na coloração marrom.

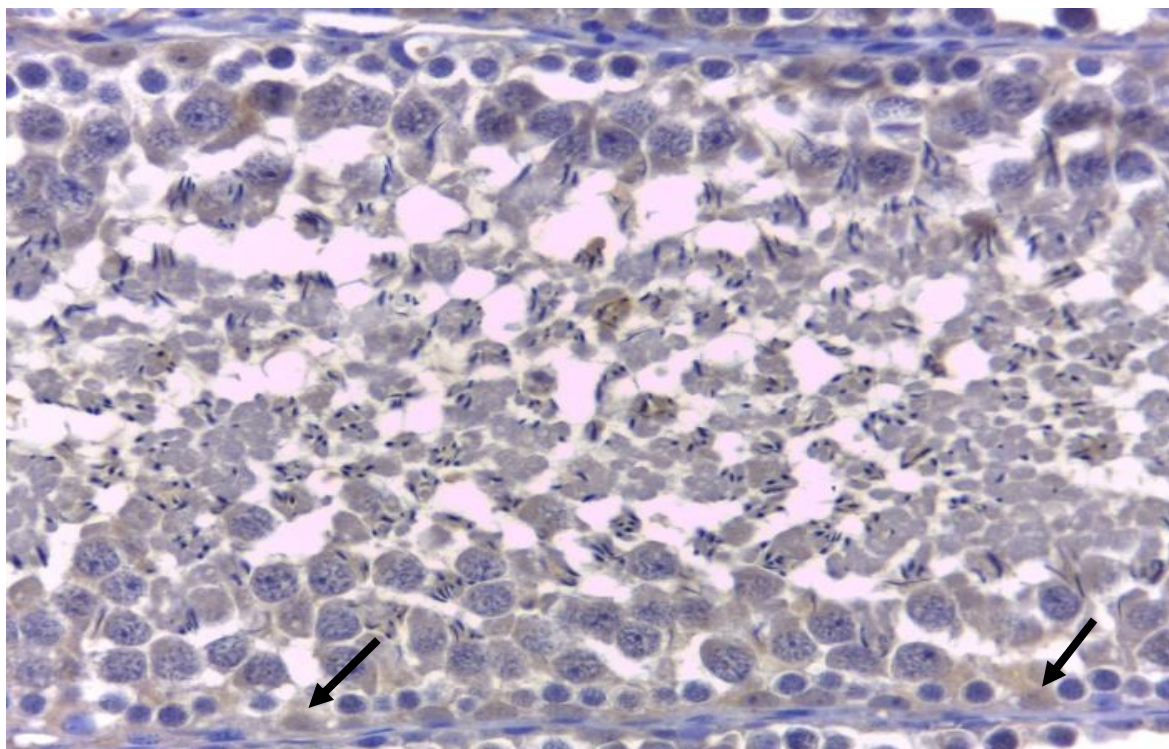


Figura 5 – Fotomicrografia de túbulos seminíferos, aumento de 400x, mostrando células de Sertoli com expressão fracamente positiva de FASL (GC).

4.4.6 Captura de imagem da microscopia

Foi utilizado, para leitura das lâminas, o microscópio LEICA, modelo DM 500, com dupla cabeça, acoplado com câmera digital LEICA ICC 50 HD, com LAS software version 4.0.0, 2011, com conexão ao notebook Dell XPS/M13 GHz, 3582 MB Ram e sistema operacional Microsoft Windows Vista® Ultimate.

4.4.7 Quantificação da imuno-histoquímica

Foram selecionados 40 túbulos seminíferos, por lâmina, previamente marcados com o software, para evitar dupla contagem. Processou-se a contagem das células de Sertoli com objetiva de 40x, identificando-se aquelas com imunoexpressão fortemente positiva para o FAS ligante (Figura 4).

4.4.8 Análise estatística e metodologia

Os resultados obtidos foram analisados, preliminarmente, de forma descritiva, obtendo-se média, desvio-padrão e intervalo de confiança de 95%, para cada um dos grupos experimentais.

O tipo de distribuição amostral dos dados foi, então, determinado pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, para que fosse possível decidir qual o teste estatístico mais adequado a cada análise.

Em seguida, os lados esquerdo e direito foram comparados para cada grupo experimental, utilizando-se o teste “t” de Student bicaudal, com dados pareados.

As comparações entre os diferentes procedimentos (controle, isquemia e reperfusão), para um mesmo lado, foram realizadas pela análise de variância com um fator (*one-way ANOVA*). Para determinação de quais grupos, apresentavam diferenças, a análise de variância foi complementada com o teste de Tukey.

Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0. Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância (α) de 5%.

As diferenças significantes foram assinaladas com um asterisco.

O desvio padrão foi informado apenas como ilustrativo.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento são apresentados nas Tabelas de número 1 a 4.

Tabela1 - Contagem de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no Grupo C (controle) - 2012

Animal	Esquerdo	Direito
1	44	41
2	43	79
3	82	40
4	47	118
5	85	41
Média	60,2	63,8
Desvio-padrão	21,4	34,6
Intervalo de confiança de 95%	33,7 a 86,7	20,9 a 106,7

Tabela 2 - Contagem de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no Grupo I (isquemia) - 2012

Animal	Esquerdo	Direito
1	123	42
2	45	43
3	43	121
4	125	47
5	84	82
6	124	123
7	81	45
8	85	47
Média	88,8	68,8
Desvio-padrão	33,5	35,3
Intervalo de confiança de 95%	60,8 a 116,7	39,2 a 98,3

Tabela 3 - Contagem de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no Grupo R (reperfusão) - 2012

Animal	Esquerdo	Direito
1	83	364
2	124	371
3	159	391
4	121	331
5	163	383
6	168	444
7	119	445
8	145	525
Média	135,3	406,8
Desvio-padrão	28,9	61,5
Intervalo de confiança de 95%	111,1 a 159,4	366,3 a 458,2

Tabela 4 – Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante nos grupos controle, isquemia e reperfusão – 2012

Grupo	Testículos		
	Ipsilateral	Contralateral	<i>p</i>
Controle	60,2 ± 21,4 ^a	63,8 ± 34,6 ^c	0,880
Isquemia	88,8 ± 33,5	68,8 ± 35,3	0,305
Reperfusão	135,3 ± 28,9 ^b	406,8 ± 61,5 ^d	<0,0001*

p referente a comparação da expressão de FASL entre os testículos ipsilateral e contralateral;

a $p > 0,05$ em relação ao grupo isquemia;

b $p < 0,05$ em relação aos grupos controle e isquemia;

c $p > 0,05$ em relação ao grupo isquemia;

d $p < 0,0001$ em relação aos grupos controle e isquemia

Ipsilateral = C, I > R $p = 0,0008$ (ANOVA)

Contralateral = C, I > R $p < 0,0001$ (ANOVA)

A Figura 6 apresenta a média e desvio-padrão dos resultados.

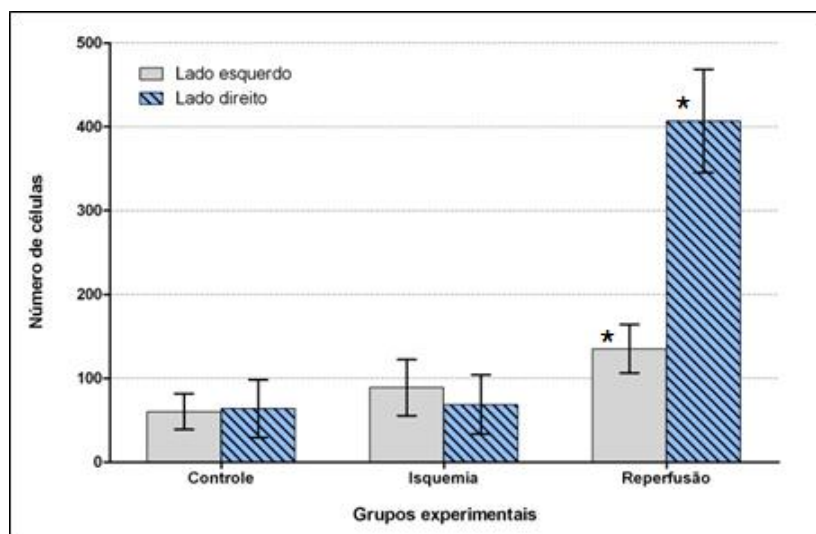


Figura 6 - Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante, de acordo com cada lado e grupo experimental.

O teste de normalidade indicou uma distribuição gaussiana (paramétrica) do universo amostral, o que autorizava o uso de testes estatísticos paramétricos.

5.1 Comparação entre lados esquerdo e direito

O grupo controle apresentou igualdade estatística ($p=0,880$) entre a contagem celular dos lados esquerdo ($60,2 \pm 21,4$) e direito ($63,8 \pm 34,6$). O mesmo foi observado no grupo no qual foi realizada a isquemia tecidual ($p=0,305$), com lados esquerdos e direito estatisticamente semelhantes ($88,8 \pm 33,5$ e $68,8 \pm 35,3$, respectivamente).

No grupo em que ocorreu reperusão, entretanto, houve diferença significativa entre os lados ($p<0,0001$), com menor número de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no lado esquerdo ($135,3 \pm 28,9$) do que no direito ($406,8 \pm 61,5$).

5.2 Comparação entre procedimentos no lado esquerdo

A Figura 7 apresenta a média e desvio-padrão dos resultados obtidos para a contagem média de células de Sertoli, que expressaram FAS ligante, no testículo esquerdo dos diferentes grupos experimentais.

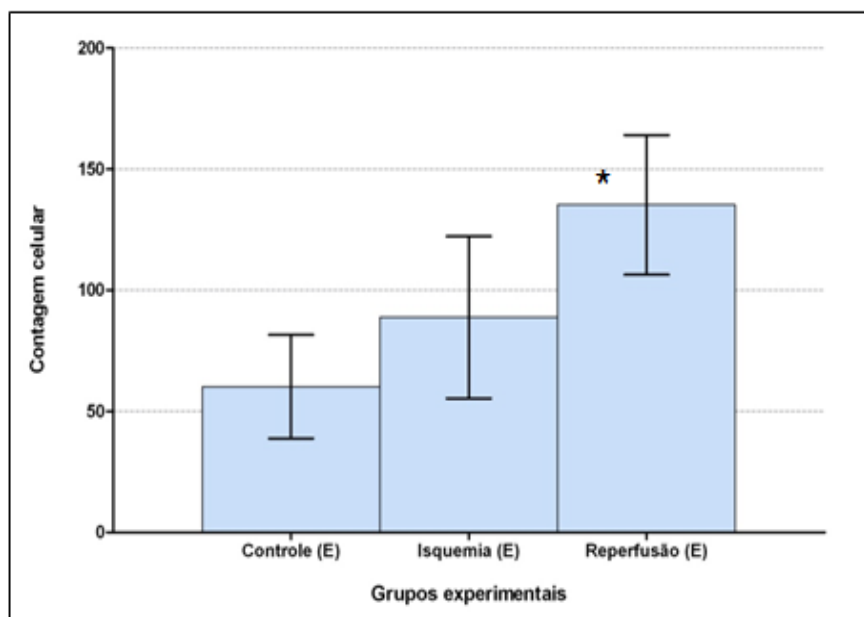


Figura 7 - Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no testículo esquerdo dos diferentes grupos.

O resultado da análise estatística acusou a presença de diferenças significantes entre os procedimentos testados ($p=0,0008$).

O teste complementar de Tukey revelou que os grupos “controle” e “isquemia” eram semelhantes ($p>0,05$), sendo que as diferenças detectadas concentravam-se no grupo “reperusão” ($p<0,05$).

5.3 Comparação entre procedimentos no lado direito

A Figura 8 apresenta a média e desvio-padrão dos resultados obtidos para a contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no testículo direito dos diferentes grupos experimentais.

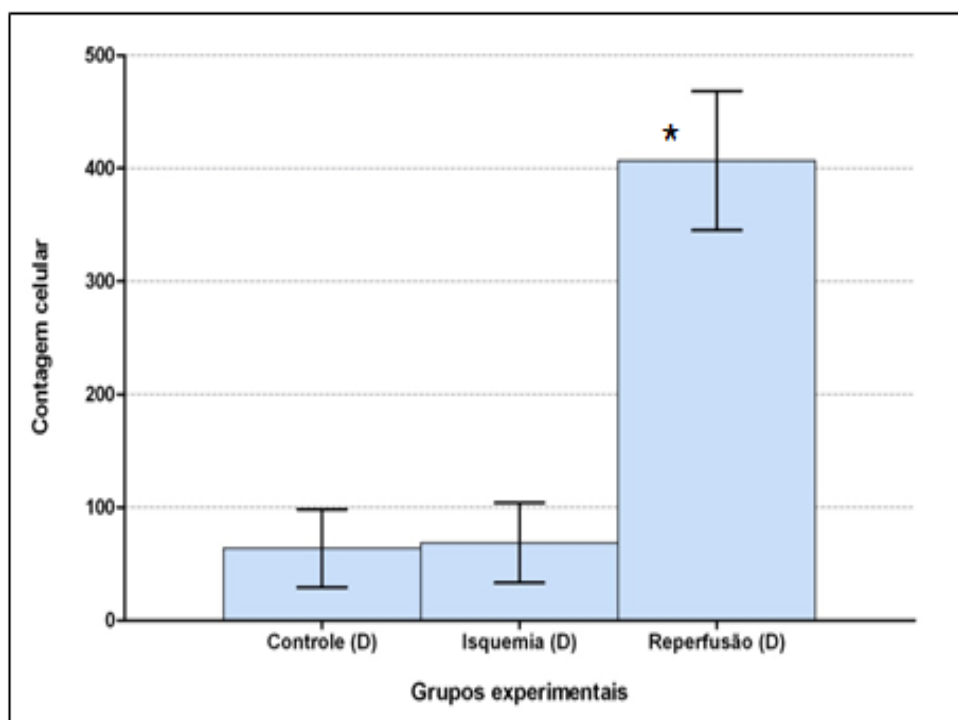


Figura 8 - Contagem média de células de Sertoli que expressaram FAS ligante no testículo direito dos diferentes grupos.

Procedimento similar foi adotado no lado direito, no qual foram detectadas diferenças entre os tratamentos experimentais ($p < 0,0001$).

O teste complementar de Tukey revelou que os grupos “controle” e “isquemia” eram semelhantes ($p > 0,05$), sendo que as diferenças detectadas concentravam-se no grupo “reperusão” ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

O assunto torção do cordão testicular vem sendo largamente pesquisado sob diversas perspectivas como o efeito da isquemia sobre o parênquima testicular, e o fenômeno de isquemia / reperfusão (TURNER, 1985), ativação da apoptose como potencial influência na extensão da lesão tecidual (TURNER *et al.*, 1997), envolvimento do sistema FAS, na indução da apoptose em células germinativas (KOJI *et al.*, 2001), o dano sobre o testículo contralateral (COSENTINO *et al.*, 1985) e os meios de se evitar ou diminuir os efeitos da torção. A metodologia diversa dos estudos tem como consequência resultados variados e divergentes.

Neste estudo, foi escolhido, como modelo animal, o rato da linhagem Wistar, por ser uma das mais utilizadas em experimentos de TCT, sendo considerado um animal dócil, com baixo custo, de fácil manipulação e condições de alojamento e por sua disponibilidade no biotério da UFMS.

Foram utilizados ratos com idade de 70 dias e peso de 280 ± 20 gramas, devido à espermatogênese normal ocorrer apenas em ratos com mais de 45 dias ou 130 gramas de peso (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997) e existirem diferenças hormonais, metabólicas e vasomotoras (SABA *et al.*, 1997) relacionadas com a idade e o peso do rato, que podem ser, em parte, responsáveis pelos resultados conflitantes descritos na literatura.

A abordagem testicular foi por incisão escrotal (COSENTINO *et al.*, 1986; BECKER, PRILLAMAN, TURNER, 1997; ERGUR *et al.*, 2008), devido se tratar de acesso rápido para o conteúdo escrotal e menor risco de morbidade e por manter íntegra a cavidade peritoneal. Turner *et al.* (1985) utilizaram incisão abdominal mediana baixa e Saba *et al.* (1997) utilizaram incisão paramediana.

Baseado na literatura que apresenta os seguintes modelos de oclusão do cordão testicular: torção de 720° , clampeamento transversal e ligadura dos elementos do cordão, optou-se, neste estudo, por TCT de 720° , pois simula, experimentalmente, a fisiologia da torção do cordão em humanos, com oclusão inicial do retorno venoso, edema, ruptura com hemorragia intersticial e posterior oclusão arterial e com isquemia finalmente (COSENTINO *et al.*, 1986; GUIMARÃES *et al.*, 2002; PALMER, PLZAK, CROMIE, 1997) e, também, devido a

um estudo utilizando ratos submetidos a TCT de 720°, por 3 horas, seguida de destorção, induzir estresse oxidativo (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Em relação ao grau de TCT que pode levar à lesão testicular, existem estudos que mostraram que, após a torção de 720°, ocorreu fluxo sanguíneo residual, variando entre 0% (TURNER, 1985), 8,8% (BECKER *et al.*, 1997) e 38,3% (PALMER, PLZAK, CROMIE, 1997) e atingindo, após a destorção, valores estatisticamente semelhantes ao fluxo sanguíneo pré-torção, variando de 24 horas (TURNER, 1985) e, após 30 dias (BECKER *et al.*, 1997; PALMER, PLZAK, CROMIE, 1997), fato esse que pode tentar explicar a lesão no testículo contralateral.

A maioria dos trabalhos mostrou lesão testicular ipsilateral, com período de torção, variando entre uma e quatro horas (TURNER *et al.*, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 2002; PRILLAMAN, TURMER, 1997; BOZLU *et al.*, 2004; ERGUR *et al.*, 2008; COSENTINO *et al.*, 1985; PALMER, PLZAK, CROMIE, 1997). Alterações patológicas no testículo contralateral foram dependentes da duração (0, 1, 3, 5, 9 e 12 h) da torção do cordão testicular (COSENTINO *et al.*, 1985).

Empregou-se, neste estudo, período de isquemia de 3 horas, conforme estudo, utilizando azoximetano que induz a estresse oxidativo em ratos, demonstrar aumento da expressão de FAS ligante após 3 horas de sua administração (KANOMATA, 2011).

No presente estudo, os animais foram submetidos à eutanásia 24 horas após o término da isquemia, ou seja, 24 horas de reperfusão no GR, devido a estudos demonstrarem aumento dos níveis de FASL, nesse período (KOJI *et al.*, 2001; JEE *et al.*, 2010).

Confirmou-se, neste estudo, que a expressão de FASL se localiza nas células de Sertoli, ocorrendo em testículos de ratos adultos normais (GC) e submetidos a estresse oxidativo (GI) e (GR), estando de acordo com estudos anteriores (XU *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1997; KOJI *et al.*, 2001; JEE *et al.*, 2010).

A maioria dos trabalhos revisados, na literatura, que estudaram a expressão de FASL em ratos, utiliza substâncias tóxicas, como, MEHP e 2,5HD (LEE *et al.*, 1997), zearalenona (JEE *et al.*, 2010) e azoximetano (KANOMATA, 2011), diferentemente deste trabalho no qual se estudou a expressão de FASL, através da indução do fenômeno de isquemia / reperfusão por torção / destorção do cordão testicular, em ratos. Observou-se que tanto o estresse oxidativo provocado por

substâncias tóxicas como o método utilizado neste estudo induziram ao aumento da expressão de FASL.

Kanomata (2011) evidenciou aumento da expressão de FASL em mucosa gástrica de ratos Wistar, 3 horas após a administração de azoximetano (estresse oxidativo), fato esse não identificado no presente estudo, que utilizou 3 horas de isquemia exclusiva (GI), demonstrando que a isquemia por si só, provavelmente, não tem a capacidade de induzir ao estresse oxidativo e, como consequência, aumentar a expressão de FASL em testículos de ratos, podendo os motivos para tais resultados serem tanto a utilização de tecidos-alvo diferentes, que respondem de maneira diversa a agressões, quanto ao método variado de indução de estresse oxidativo, utilizado em ambos os estudos.

Jee *et al.* (2010) estudaram a expressão de FASL em testículos de ratos, por pontos de tempo (3, 6, 12, 24 e 48 horas), após administração de zearalenona, e identificaram aumento estável da expressão de FASL até 48 horas.

Koji *et al.* (2001), em um estudo com ratos utilizando clampeamento da artéria e veia testiculares por grampos vasculares por 60 minutos e reperfusão por pontos de tempo (0, 12, 24 e 48 horas), identificaram células de Sertoli positivas para FASL em qualquer ponto de tempo, com ligeira elevação às 24 horas de reperfusão.

Diferentemente dos estudos citados acima, que utilizaram vários pontos de tempo após a agressão testicular, substâncias tóxicas e período de isquemia de apenas 1 hora por clampeamento, seguida de reperfusão para avaliar a expressão de FASL, o presente estudo utilizou torção do cordão testicular de 720°, por 3 horas, conforme Guimarães *et al.* (2007), e a quantificação da expressão de FASL ocorreu apenas em dois pontos de tempo: 3 horas de isquemia exclusiva (GIE) e 24 horas nos demais subgrupos, identificando um aumento significativo da expressão de FASL, apenas com 24 horas de reperfusão (GR), levando-se a crer que se poderia ter utilizado no presente estudo vários pontos de tempo para obter uma melhor avaliação do comportamento da expressão de FASL, ao longo do tempo de reperfusão, e sabendo, ainda, que se necessitaria de um maior número de animais e que o período de 3 horas de isquemia exclusiva não foi capaz de aumentar a expressão de FASL, mas que após o período de reperfusão (24 horas) ocorreu um aumento significativo da expressão FASL, pelas células de Sertoli, e que esse período de isquemia de 3 horas, seguida de reperfusão, parece ser mais eficaz na indução de um estresse oxidativo capaz de aumentar significativamente a

expressão de FASL, que o estudo de Koji *et al.* (2001), tendo conhecimento de antemão que quanto maior o período de isquemia maior será a extensão da lesão testicular (TURNER *et al.*, 1985) e que essa agressão poderá ser intensificada pela reperfusão e apoptose mediada pela FASL (TURNER *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1997).

Desses trabalhos, apenas o de Lee *et al.* (1997), utilizando MEHP e 2,5 HD, que são agentes tóxicos para as células de Sertoli, identificou aumento significativo da expressão de FASL, após exposição, demonstrando que, provavelmente, as células de Sertoli disfuncionais aumentaram a expressão de FASL para facilitar a eliminação das células germinativas que ela não tem capacidade de suportar, levando, assim, a um novo estado de equilíbrio, conclusão essa que pode sugerir que a TCT de 720°, por 3 horas, seguida de destorção de 24 horas, método utilizado no presente estudo, pode também induzir à agressão às células de Sertoli.

Em relação ao método de indução do fenômeno isquemia / reperfusão, Koji *et al.* (2001) utilizaram clampeamento dos elementos do cordão; no entanto; Cosentino *et al.* (1986), Palmer, Plzak e Cromie (1997) mostraram que TCT e o seu clampeamento produzem efeitos fisiológicos distintos, devido ao fluxo sanguíneo residual ser maior na TCT, podendo ser também uma das explicações da diferença nos resultados encontrados.

O interessante foi que comparando testículos esquerdo e direito do mesmo grupo, utilizando o teste “*t*” de student bicaudal com dados pareados, observou-se igualdade estatística no GC e GI; contudo, no GR, houve aumento estatisticamente significativo da expressão de FASL, no GRD, mostrando que a reperfusão agrava o dano tecidual no GR e que a orquiectomia pode proteger o testículo contralateral no GI, conforme descrito por Cosentino *et al.* (1985), fato esse não observado por Koji *et al.* (2001), que utilizaram o testículo contralateral apenas como controle e não utilizaram grupo isquemia exclusiva.

O esperado era que houvesse maior número de células de Sertoli que expressam FASL, nos testículos ipsilaterais do GR; no entanto, este trabalho experimental demonstrou importante aumento do número de células de Sertoli que expressam FASL, nos testículos contralaterais do GR, alertando-nos da possibilidade da reperfusão em conjunto com o aumento da expressão de FASL ser a causa do dano nesses testículos, mas necessitamos de mais pesquisas para confirmar e justificar esses resultados. Confirmando esses resultados em outros estudos, esta pode vir a ser mais uma teoria para explicar a lesão no testículo contralateral.

Mais estudos são necessários para elucidar qual o momento certo para se intervir, mantendo ou não o testículo que sofreu a torção de seu cordão, protegendo, assim, a espermatogênese do paciente e, com isso, sua capacidade reprodutiva.

7 CONCLUSÃO

A expressão de FAS ligante aumentou nos testículos ipsilateral e contralateral do grupo reperfusão, após 3 horas de isquemia e 24 horas de reperfusão, sendo mais significativa nos testículos contralaterais.

8 REFERÊNCIAS¹

- ADAMS, J. M. Ways of dying: Multiple Pathways to Apoptosis. **Genes Rev.** Oct. 5, 2003; 17(2): 2481-95.
- ANDERSON, J. B; WILLIAMSON, R.C. The fate of the human testes following unilateral torsion of the spermatic cord. **Br J Urol**, 1986; 58(6): 698-704.
- BARTSCH, G; FRANK, S.; MARBERGER, H.; MIKUZ, G. Testicular Torsion: Late results with special regard to fertility and endocrine function. **J Urol**, 1980; 124(3): 375-378.
- BECKER, E. J.; PRILLAMAN, H. M.; TURNER, T. T. Microvascular blood flow is altered after repair of testicular torsion in the rat. **J Urol**, 1997; 157(4): 1493-1498.
- BOATRIGHT, K. M.; RENATUS, M.; SCOTT, F. L.; SPERANDIO, S.; SHIN, H.; PEDERSEN, I. M.; RICCI, J. E.; EDRIS, W. A.; SUTHERLIN, D. P.; GREEN, D. R.; SALVESEN, G. S. A unified model for apical caspase activation. **Mol Cell**, 2003; 11(2): 529-41.
- BOEKELHEIDE, K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. **J Natl Cancer Inst Monogr**, 2005; 2005(34): 6–8.
- BOZLU, M.; COŞKUN, B.; CAYAN, S.; ACAR, D.; AKTAŞ, S.; ULUSOY, E.; AKBAY, E. Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase decreases long-term histologic damage in testicular ischemia-reperfusion injury. **Urology**, New York, 2004; 63(4): 791-795.
- BREDESEN, D. E.; MEHLEN, P.; RABIZADEH, S. Apoptosis and dependence receptors: A molecular basis for cellular addiction. **Physiol Rev**, 2004; 84(2): 411-430.
- CHILVERS, C. E.; PIKE, M. C.; PECKHAM, M. J. Torsion of the Testis: a new risk factor for testicular cancer. **Br J Cancer**, 1987; 55(1): 105-106.
- CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 Family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, 2002; 2(9): 647-56.
- CORY, S.; HUANG, D. C.; ADAMS, J. M. Bcl2 family roles in cells survival and oncogenesis. **Oncogene**, 2003; 22(53): 8590-8607.
- COSENTINO, M. J.; NISHIDA, M.; RABINOWITZ, R.; COCKETT, A. T. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. **J Androl**, 1986; 7(1): 23-31.
- _____. Histological changes occurring in the contralateral testis of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. **J Urol**, 1985; 133: 906-911.
- ERGUR, B. U.; KIRAY, M.; PEKCETIN, C.; BAGRIYANIK, H. A.; ERBIL, G. Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. **J Pediatr Surg**, 2008; 43(4): 722-728.

¹ Referências formatadas conforme metodologia proposta por Zárate P, Andrade SMO, Aydos, RD. Diretrizes para elaboração de Teses e Dissertações. 2ª Ed. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. UFMS; 2011. De acordo com a NBR 14724 (2005).

FERREIRA, U.; NETTOJÚNIOR, N. R.; ESTEVES, S. C.; RIVERO, M. A.; SCHIRREN, C. Comparative study of the fertility potential of men with only one testis. **Scand J Urol Nephrol**, 1991; 25(4):255-259.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Cancerol**, 2007; 53(3): 335-343.

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 Cir Bras**, São Paulo, 2007; 22(1).

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 Cir Bras**, São Paulo, 2002; 17(2).

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 2000; 407: 770-76.

HIKIM, A. P. S.; SWERDLOFF, R. S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Rev Reprod**, 1999; 4(1): 38-47.

JEE, Y. H.; NOH, E. M.; CHO, E. S.; SON, H. Y. Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. **J Vet Sci**, 2010; 11(2): 115-119.

JESUS, L. E. Acute Scrotum. **Rev Col Bras Cir**. Rio de Janeiro, 2000; 27(4): 271-278.

KANOMATA, F. **Estudo quantitativo na expressão de Fas ligante pós indução de estresse oxidativo em mucosa gástrica com administração de azoximetano, em ratos**. [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.

KOC, A.; NARCI, A.; DURU, M.; GERGERLIOGLU, H. S.; AKAYDIN, Y.; SOGUT, S. The protective role of erdosteine on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. **Mol Cell Biochem**, 2005; 280(1-2): 193-9.

KOJI, T.; HISHIKAWA, Y.; ANDO, H.; NAKANISHI, Y.; KOBAYASHI, N. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: Involvement of the Fas system in the induction of germ cells apoptosis in the damaged mouse testis. **Biol Reprod**, 2001; 64 (3): 946-954.

KOJI, T.; HISHIKAWA, Y. Germ cell apoptosis and its molecular trigger in mouse testes. **Archives of Histology and Cytology**, 2003; 66: 1-16.

KRAMMER, P. H.; BERHMANN, BIER, V.; DANIEL, P.; DHEIN, J.; FALK, M. H.; GARCIN, G.; KLAS, C.; KNIPPING, E.; LUCKING-FAMIRA, K. M.; MATZKU, S.; OEHM, A.; RICHARDS, S.; TRAUTH, B. C.; BORNKAMM, G. W.; FAULK, W.; MOLLER, P.; DEBATIN, K. M. Apoptosis in the Apo-1 System. In: TOMEI, J.; COPE, F.; (eds.). **Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death**. Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York, 1991: 87-99.

KRARUP, T. The testes after torsion. **Br J Urol**, London, Feb, 1978; 50(1):43-46.

LEE, J.; RICHBURG, J. H.; YOUNKIN, S. C.; BOEKELHEIDE, K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. **Endocrinology**, 1997; 138(5): 2081-88.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **J Insect Physiol**, 1964; 10(4): 643-649.

- MANSBACH, J. M.; FORBES, P.; PETERS, C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. **Arch Pediatr Adolesc Med**, Chicago, 2005; 159(12):1167-71.
- MATTESON, J. R.; STOCK, J. A.; HANNA, M. K.; ARNOLD, T. V.; NAGLER, H. M. Medicolegal aspects of testicular torsion. **Urology**, New York, 2001; 57(4): 783-786.
- MOGILNER, J. G.; LURIE, M.; CORAN, A. G.; NATIV, O.; SHILONI, E.; SUKHOTNIK, I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. **Pediatr Surg Int**, 2006; 22: 99-105.
- NGUYEN, L.; LIEVANO, G.; GHOSH, L.; RADHAKRISHNAN, J.; FORNELL, L.; JOHN, E. Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. **J Pediatr Surg**, New York, 1999; 34(5), 680-683.
- PALMER, J. S.; PLZAK, L. F.; CROMIE, W. J. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. **J Urol**, Linthicum, 1997; 156(3): 1138- 1140.
- PERROTTI, M.; BADGER, W.; PRADER, S.; MORAN, M. E. Medical Malpractice in Urology - 1985 to 2004: 469 consecutive cases closed with indemnity payment. **J Urol**, 2006; 176(5): 2154-2157.
- PRILLAMAN, H. M.; TURNER, T. T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. **J Urol**, 1997; 157(1): 340-345.
- RINGDAHL, E.; TEAGUE, L. Testicular Torsion. **Am Fam Physician**. Nov, 2006; 74(10): 1739-43.
- RODRIGUEZ, J M. A.; DE LORCA, A. P.; FERNANDEZ, J. C. Síndrome de Escroto Agudo. **Libro del Residente de Urología**. Asociación Española de Urología. Madrid: 2007; p.163-73.
- RODRIGUEZ, M. G.; RIVAL, C.; THEAS, M. S.; LUSTIG, L. Immunohistopathology of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. **Asian Journal of Andrology**. 2006; 8(5): 576-583.
- SABA, M.; MORALES, C. R.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. **J Urol**, 1997; 157(3): 1149-54.
- SALMASI, A.H.; BEHESHTIAN, A.; PAYABVASH, S.; DEMEHRI, S.; EBRAHIMKHANI, M. R.; KARIMZADEGAN, M.; BAHADORI, M.; PASALAR, P.; DEHPOUR, A. R. Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: experimental study in testicular torsion rat model. **Urology**, 2005; 66(6): 1338-42.
- SKOGLUND, R. W.; MCROBERTS, J.W.; RAGDE, H. Torsion of the spermatic cord: A review of the literature and an analysis of 70 new cases. **J Urol**, 1970; 104(4): 604-607.
- STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. **Immunity**, 2009; 80(1): 40-56.
- SUDA, T.; NAGATA, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. **J Exp Med**, 1994; 179(3): 873-879.
- TURNER, T. T.; BROWN, K. J. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. **Biol Reprod**, 1993; 49(2): 401-407.
- TURNER, T. T.; TUNG, K.S.; TOMOMASA, H.; WILSON, L. W. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. **Biol Reprod**, 1997; 57(6): 1267-1274.

TURNER, T. T. Acute Experimental Testicular Torsion. No effect on the contralateral testis. **J Androl**, 1985; 6(1): 65-72.

VISSER, A. J.; HEYNS, C. F. Testicular function after torsion of the spermatic cord. **BJU Int**, 2003; 92(3): 200-203.

WILLIAMSON, R. C. The Continuing Conundrum of Testicular Torsion. **Br J Surg**, 1985; 72(7):509-510.

_____. Torsion of the Testis and Allied Conditions. **Br J Surg**, 1976; 63(6): 465-476.

XU, J.P.; LI, X.; MORI, E.; GUO, M. W.; MATSUDA, I.; TAKAICHI, H.; AMANO, T.; MORI, T. Expression of Fas-Fas ligand in murine testis. **Am J Reprod Immunol**, 1999; 42(6): 381-388.

ZÁRATE, P.; ANDRADE, S. M. O.; AYDOS, R. D. **Diretrizes para elaboração de Teses e Dissertações**. Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. 2. ed. Campo Grande: UFMS, 2011. NBR 14724 (ABNT, 2005).

9 APÊNDICE

Lâmina	Número de células de Sertoli com expressão de Fas L/ 40 túbulos seminíferos
GC1D	41
GC2D	79
GC3D	40
GC4D	118
GC5D	41
GC1E	44
GC2E	43
GC3E	82
GC4E	47
GC5E	85
GID1	42
GID2	43
GID3	121
GID4	47
GID5	82
GID6	123
GID7	45
GID8	47

GIE1	123
GIE2	45
GIE3	43
GIE4	125
GIE5	84
GIE6	124
GIE7	81
GIE8	85
GRD1	364
GRD2	371
GRD3	391
GRD4	331
GRD5	383
GRD6	444
GRD7	445
GRD8	525
GRE1	83
GRE2	123
GRE3	159
GRE4	121
GRE5	163

GRE6	168
GRE7	119
GRE8	145

10 ANEXO



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 317 do Pesquisador **Peterson Vieira de Assis**, referente ao projeto de pesquisa **“Alterações histológicas, moleculares e de apoptose celular nos testículos ipsilateral e contralateral do rato em resposta a torção testicular unilateral seguido por destorção”**, 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 de 20 de junho de 2011.

Campo Grande (MS), 20 de junho de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Steinhilber', is positioned above the printed name.

Dra Joice Steinhilber
Coordenadora da CEUA