

Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão¹

Effect of allopurinol on rat testicles morfology, submitted to ischaemia for spermatic cord torsion followed by reperfusion

Andréia C. M. Brochado Antonioli Silva², Valdemar Ortiz³, Roberto Antonioli da Silva⁴, João Ricardo Tognini⁵

1. Tese de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).
2. Doutora em medicina pela UNIFESP-EPM, professora adjunta do departamento de cirurgia da universidade Federal de Mato Grosso de Sul.
3. Professor Adjunto da Disciplina de Urologia da UNIFESP-EPM.
4. Médico Ortopedista, professor do programa de residência médica de Ortopedia e Traumatologia da UFMS, Doutor em Medicina pela Universidade Federal de São Paulo.
5. Professor titular do departamento de cirurgia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Doutor em medicina pela Universidade Federal de São Paulo.

RESUMO

Objetivo: Estudar o efeito do alopurinol no fenômeno de isquemia-reperfusão em testículos de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 80 ratos Wistar, adultos, distribuídos em 4 grupos: controle sem alopurinol, controle com alopurinol, torção do cordão espermático sem alopurinol e torção do cordão espermático com alopurinol. Os testículos foram retirados após 60 dias do ato operatório e processados para exame histológico à microscopia óptica, onde os túbulos seminíferos e as células espermatogênicas foram objeto de estudo. **Resultados:** A comparação entre os grupos demonstrou que houve atrofia dos testículos que foram submetidos à torção, inclusive o grupo que recebeu o alopurinol. **Conclusão:** O alopurinol não protegeu as gônadas dos efeitos da isquemia reperfusão.

Descritores: Torsão do Cordão Espermático. Testículo. Alopurinol. Ratos.

ABSTRACT

Purpose: In this investigation has been studied the effect of the alopurinol on the reperfusion injury phenomenon in testicles of rats. **Methods:** Eighty adults Wistar rats were divided in 4 groups: sham without alopurinol, sham with alopurinol, righth testicular torsion for one hour without alopurinol and righth testicular torsion for one hour with alopurinol. Bilateral orchietomy was performed 60 days of the experiment and the testis were precessed for optical microscopy, and edamined to asses the seminiferous ducts and the spermatogenic cells. **Results:** There was significant atrophy and histological damage of the righth testis. **Conclusion:** Alopurinol did not protected the testis against the effects of the reperfusion injury.

Key words: Spermatic Cord Torsion. Testis. Allopurinol. Rats.

Introdução

A torção do cordão espermático (TCE) é uma entidade clínica freqüente em jovens, caracterizando uma das emergências mais comuns na cirurgia pediátrica, afetando 1 em cada 160 homens até os 25 anos¹. Além de ser uma afecção freqüente, se não diagnosticada e tratada precocemente, leva à graves consequências chegando até à orquiectomia em 50 à 70% dos casos. Trabalhos recentes² têm demonstrado que não só a isquemia do órgão causa lesão celular, mas o restabelecimento do fluxo sanguíneo após uma situação de diminuição do aporte sanguíneo arterial cria uma situação denominada fenômeno de isquemia-reperfusão. Durante o período de hipóxia, o catabolismo de adenosina trifosfato (ATP) leva à um acúmulo de metabólito das purinas, ou seja, as xantinas e as hipoxantinas. Nesse período a xantino desidrogenase é convertida em xantino oxidase. Com a destorção do cordão, ocorre a reperfusão,

com grande aporte de oxigênio, que é o substrato requerido para que ocorra a oxidação das purinas. Ou seja, a hipoxantina é transformada em xantina e esta em ácido úrico, e como subprodutos dessa reação, aparecem uratos e superóxido radical, o qual gera, secundariamente, um radical hidroxil muito tóxico³. Esses radicais livres de oxigênio, a liberação de agentes quimiotáticos e a agregação de leucócitos, induzem á peroxidação de lipídeos com desintegração de membranas e a perda da integridade endotelial, resultando em aumento da permeabilidade vascular, morte celular e dano tecidual³. Então, na presença de um fenômeno de isquemia-reperfusão, há algumas estratégias para tentar impedir ou diminuir o efeito do mesmo. Isso pode ser feito inibindo a formação de radicais livres ou eliminando-os depois que eles forem formados³. O alopurinol tem uma estrutura análoga à da hipoxantina e compete com ela inibindo a xantino oxidase, com subsequente formação de oxipurinol, o qual forma um complexo estável com a xantino oxidase,

prevenindo futura atividade enzimática. Dessa forma, o alopurinol é usado para impedir que os RLO sejam formados, evitando sua ação nociva nas células³. Experimentos realizados com isquemia e reperfusão em outros órgãos, mostram resultados controversos sobre a capacidade do alopurinol em proteger as células dos efeitos dos RLO⁴. Devido à essa controvérsia de resultados, a intenção desse trabalho é examinar o efeito do alopurinol no testículo submetido à isquemia reperfusão. O objetivo deste trabalho foi a avaliação morfológica dos testículos de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, sob ação do alopurinol.

Métodos

Foram utilizados 80 ratos albinos, machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), variedade EPM, com peso médio de 223.5 gramas. Foram estudados quatro grupos de ratos, com 20 animais em cada grupo:

- GI - grupo sham sem alopurinol
- GII - grupo sham com alopurinol
- GIII - grupo experimento (torção) sem alopurinol
- GIV - grupo experimento (torção) com alopurinol

Todos os grupos foram examinados com 60 dias de pós operatório.

Procedimentos

No momento do experimento os animais foram pesados e anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 30 miligramas (mg) por quilo (Kg) de peso, injetados na cavidade peritoneal. A via de acesso foi feita por incisão transversa de aproximadamente 1,5 centímetros (cm), em região inguinal direita, com abertura por planos até a exposição do testículo direito, que era exteriorizado. À seguir, o procedimento variou conforme cada grupo:

- GI – o testículo direito era exteriorizado e colocado em recipiente com solução salina à 0,9% , em temperatura ambiente por um período de 1 hora. Após esse período o testículo era reposicionado no escroto, e a incisão suturada com poliamida 4-0 de forma contínua, em plano único.
- GII – o mesmo procedimento feito em GI foi aplicado nesse grupo, porém, quinze minutos antes de reposicionar o testículo era feito alopurinol, na dose de 100mg/kg de peso, via intraperitoneal.
- GIII – o testículo direito era exteriorizado e o cordão espermático era torcido à 720°, e mantido dessa forma em recipiente com solução salina à 0,9%, em temperatura ambiente, pelo período de 1 hora, quando o cordão era destorcido e o testículo reposicionado no escroto. A incisão era suturada em plano único, de forma contínua com poliamida 4-0.
- GIV – o mesmo procedimento feito no GIII foi aplicado nesse grupo, porém, quinze minutos antes de destorcer o cordão espermático e reposicionar o testículo, era injetado intraperitonealmente, 100mg/Kg de peso de alopurinol.

Após cada experimento os animais eram marcados e recolocados nas gaiolas, em grupos de seis ratos, com água e ração à vontade. Após 60 dias do experimento, os animais foram novamente anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 30mg/Kg, por via intraperitoneal. Procedia-se então à incisão inguinal primeiramente à direita, com exteriorização do respectivo testículo e exérese do mesmo. Logo à seguir, procedia-se da mesma forma à orquiectomia esquerda. Os testículos retirados eram imediatamente pesados e identificados, e armazenados individualmente em recipiente com formalina à 10%. Essas peças foram submetidas à processamento histológico e coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). Após a retirada de ambos os testículos, os animais eram submetidos à eutanásia com uma superdosagem de pentobarbital sódico.

Estudo histológico

Cada lâmina foi observada à microscopia óptica, inicialmente no aumento de 25 vezes, e posteriormente no aumento de 100 vezes. Dez campos foram observados em cada lâmina, onde se procurava saber se havia lesão nos túbulos seminíferos e/ou no seu conteúdo, ou seja, nas células espermatogênicas, células de Sertoli e membrana basal dos túbulos. Foi observado também se havia dano às células intersticiais ou de Leydig. Foi considerado presença de lesão quando nos 10 campos observados, a maioria dos túbulos, ou seja mais de 50%, tinha alterações histológicas. Alterações isoladas não foram consideradas.

Resultados

Não houve diferença significativa no peso dos animais comparando os quatro grupos, e a amostra foi considerada homogênea no que diz respeito ao peso (Tabela 1).

TABELA 1 - Valores referentes ao peso dos animais nos diversos grupos.

GI	GII	GIII	GIV
231	234	234	239
222	238	238	236
221	264	264	226
212	234	234	206
221	236	236	223
232	202	202	198
200	216	216	245
202	238	238	240
202	228	228	197
202	234	234	198
204	250	250	200
222	194	194	222
221	195	195	210
221	226	226	195
222	222	222	195
222	219	219	230
198	224	224	200
212	200	200	218
190	212	212	222
240	205	205	254

Quando se estudou a presença ou não de lesão em cada grupo e em ambos os testículos, não houve diferença significativa entre os grupos estudo, ou seja onde foi realizado torção, com e sem droga. Porém, houve diferença significativa entre os testículos direito, os quais foram submetidos à torção, e os testículos esquerdos, que não sofreram torção (Tabela 2).

TABELA 2 - Presença ou não de lesão nos testículos do diversos grupos.

	Com droga		Sem droga	
	Com lesão	Sem lesão	Com lesão	Sem lesão
Controle	0	20	0	20
Estudo	7	13	9	11
Total	7	33	9	31

1. Estudo da presença de lesão nos grupos GIII e GIV
 Teste do Qui quadrado
 $\chi^2 = 0.417$ $\chi^2 = (1gl; 5\%) = 3.841$
2. Estudo da presença de lesão nos grupos GII e GIV
 Teste de Fisher
 $P = 0.004158$
3. Estudo da presença ou não de lesão nos grupos GI e GIII
 Teste de Fisher
 $P = 0.000614$

Quando se estudou o número de óbitos que ocorreram nos diversos grupos, observou-se que em GII e GIV, ou seja nos grupos onde se usou o alopurinol, o número de óbitos foi significativamente superior (Tabela 3).

TABELA 3 - Número de óbitos observados nos grupos estudados.

	Óbitos com alopurinol		Óbitos sem alopurinol	
	Sim	não	Sim	Não
Controle	11	20	1	20
Estudo	18	20	0	20
Total	29	40	1	40

Comparação do número de óbitos entre os grupos sem uso do alopurinol (GI e GIII)

Teste de Fisher
 $P = 0.5121952$.

Discussão

O tema isquemia testicular tem sido amplamente estudado sob diversos aspectos, como o efeito da própria isquemia sobre o parênquima testicular submetido à hipóxia, o dano no testículo contralateral, os efeitos do fenômeno isquemia-reperfusão e os meios de evitar ou diminuir esses efeitos. Os trabalhos revisados na literatura mostram uma metodologia bastante variada, o que teve como consequência, resultados diversos e conflitantes. Fatores como o tipo e a espécie do animal, a sua idade, o modo de se

produzir a isquemia, o tempo de duração da isquemia e os tipos de avaliações, dificultam a análise e comparação dos trabalhos⁵. O modelo animal mais utilizado é o rato adulto⁶. Outros autores^{7,8} mostraram que os ratos de até 35 dias de vida poderiam ser comparados à fase pré-puberal humana. Hoffman, citado por Harrison e Oettlé⁹, observou que a espermatogênese dos ratos só se inicia quando eles alcançam cerca de 130 gramas de peso. Baseados nas pesquisas da maioria dos autores que trabalharam com isquemia testicular^{10,11} como, que utilizaram ratos adultos, e pelo fato de pretendermos estudar apenas as alterações da espermatogênese causadas pelo fenômeno isquemia-reperfusão, realizamos o experimento em animais adultos jovens. O modo de se promover a isquemia no testículo é também muito diverso e vai desde a ligadura da artéria espermática a vários graus de torção do cordão espermático^{12,13}, demonstraram que, no rato, cordão espermático torcido a 720° por uma ou duas horas, causa lesão testicular que não melhora após 60 dias, apesar do retorno do fluxo sanguíneo. Becker e col.¹⁴, também mostraram que após uma hora de torção do cordão a 720°, já existe dano testicular. Cosentino e col.¹⁵ estabeleceram que a torção do cordão a 720°, por 5 horas é suficiente para causar dano testicular irreversível. Dessa forma, adotamos a torção do cordão espermático a 720°. O tempo em que o testículo fica submetido à isquemia é muito importante. O fenômeno de isquemia-reperfusão foi estudado¹⁶, com períodos de 3 e 6 horas, e não encontraram diferenças entre os grupos. Isso pode ser explicado pelo fato de a hipóxia ter sido tão intensa a ponto de levar a um desaparecimento permanente da espermatogênese. A isquemia tem que ser suficiente para induzir o dano tecidual. Turner e Brown¹⁷ mostraram que o tempo para se iniciar uma terapêutica antioxidante fica em torno de 1 hora, que é o tempo mínimo para se induzir o dano tecidual. Uma ampla pesquisa com antioxidante e isquemia testicular, e tiveram resultados favoráveis nos grupos com apenas uma hora de isquemia, enquanto o mesmo não se observou nos grupos submetidos a mais de uma hora de hipóxia³. Diante dessas evidências, foi adotado o tempo de uma hora de isquemia. Becker e col.¹⁸ observaram que a hipóxia do ducto deferente leva a imobilidade dos espermatozoides, e isso pode dar uma aparente elevação da quantidade de espermatozoides. Sessenta dias após a torção, esses espermatozoides imobilizados são degradados completamente. Por essa razão, o nosso tempo de observação foi de 60 dias. O mais utilizado método de avaliação da isquemia testicular é a histologia com o uso da microscopia óptica, adotada em quase todos os trabalhos. Por meio dela, podemos estudar com facilidade e clareza os túbulos seminíferos, assim como as células espermatogênicas, de Sertoli, e também as células de Leydig. Outro método de avaliação testicular, é a passagem dos testículos, que serve como parâmetro de atrofia da gônada, alguns autores^{14,18} demonstraram em seus estudos, uma alta porcentagem de atrofia dos testículos submetidos à ligadura da artéria e torção por uma hora ou mais, respectivamente. Quando os testículos foram retirados, no 60° dia de pós operatório, procurou-se observar macroscopicamente se havia alteração de volume dos testículos direito e esquerdo e se havia diferença entre eles. A maioria dos testículos cujo cordão foi torcido (grupos

III e IV), apresentou-se com diminuição do volume em relação ao contralateral. Estudo com isquemia-reperfusão em diversos órgãos têm sido feitos. Reilly e col.⁶ definiram que o dano pela isquemia-reperfusão é uma combinação do componente isquêmico e do componente reperfusão. Em órgãos intolerantes à isquemia global o dano devido ao próprio componente isquêmico pode ser tão grande que torna sem efeito o dano pela reperfusão. Os mecanismos anti radicais livres de oxigênio são eficientes quando a porção principal do dano é causada pela reperfusão e não pela isquemia. Estudaram-se o dano por reperfusão e mecanismos antioxidantes no miocárdio canino, avaliaram o efeito da superóxido dismutase³, um antioxidante, em retalhos de pele. Ambos demonstraram resultados positivos com o uso de antioxidantes nesses tecidos submetidos à reperfusão. Foi estudado o efeito do alopurinol na isquemia mesentérica em ratas. Concluíram que essa droga é capaz de proteger o mesentério dos efeitos da reperfusão. Os órgãos variam na tolerância com a isquemia. Em órgãos como o coração e a pele os mecanismos anti radicais livres são efetivos prevenindo o dano de reperfusão após uma isquemia global. Tentou-se prevenir o dano de reperfusão em testículos depois de 60 ou 100 minutos de ligadura da artéria espermática, e observaram que os inibidores de radicais livres não protegeram o órgão do dano de reperfusão¹⁹. Para esses autores, a resposta do testículo para a isquemia-reperfusão pode ser diferente de outros órgãos. O efeito da superóxido dismutase na isquemia-reperfusão de testículos de ratos, foi observado por meio da ligadura da artéria testicular, por 60 minutos, e não se obteve efeito protetor dos antioxidantes no fenômeno de reperfusão. A isquemia-reperfusão em testículos de ratos por meio de torção do cordão espermático foi avaliada⁴, e observou-se que com uma a duas horas de torção e em seguida, ao desfazer a torção, ocorrem os efeitos da reperfusão, enquanto nos animais com períodos maiores de isquemia, não observou-se os efeitos da reperfusão, mas só da isquemia. Avaliando-se o polietilenoglicol e a superóxido dismutase como antioxidantes na torção do cordão espermático de ratos com duração de 3 horas, não se encontrou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo experimento. Estudos demonstram o efeito do alopurinol em isquemia-reperfusão testicular, sendo que a isquemia foi produzida por pinçamento (com clampes vasculares) do cordão espermático por uma hora. O alopurinol foi administrado por via oral, durante os três dias que antecederam o experimento, na dose de 50mg/kg/dia. Concluiu-se que o alopurinol não foi capaz de proteger o testículo do rato contra os efeitos da reperfusão. Trabalho com torção do cordão espermático por 1, 3 e 5 horas¹⁰, a 720°, e alopurinol via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg, feitos 30 minutos antes de desfazer a torção demonstrou que o pré-tratamento com alopurinol previne o dano pela isquemia-reperfusão e esse achado não coincide com o resultado do presente trabalho. Esses autores, utilizaram método bioquímico para determinar a concentração do ácido tiobarbitúrico reativo, que é um produto da peroxidação dos lipídeos. Prillaman e col.⁴ estudaram a torção do cordão espermático em ratos, com grupos de 1 e 2 horas de torção, a 720°, e testaram algumas drogas antioxidantes, quais sejam: superóxido dismutase, catalase, alopurinol e verapamil.

Todas as drogas foram administradas pela via intravenosa, 15 minutos antes de desfazer a torção. O alopurinol foi utilizado na dose de 25mg/ml, sendo 0,8ml por hora de infusão, durante 75 minutos, ou seja, 15 minutos antes de desfazer a torção do cordão e até 60 minutos após, no período de reperfusão. Concluíram que o uso de antioxidantes no fenômeno de reperfusão tem um efeito benéfico apenas nos casos em que o período de torção durou apenas uma hora. Estes pesquisadores utilizaram em seu estudo além do peso dos testículos, a medida da produção diária de espermatozoides e a medida da concentração venosa de testosterona, no 60° dia de pós operatório. Neste experimento, foi usado a torção do cordão espermático, a 720°, pelo período de uma hora, e o alopurinol foi usado por via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg de peso, 15 minutos antes de se desfazer a torção. Na avaliação histológica realizada não foi encontrada diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com alopurinol, apesar de se ter usado, como sugere a maioria dos trabalhos, um tempo de torção apenas o suficiente para induzir o dano tecidual. Um dano muito importante que surgiu na evolução do experimento, é que houve uma significativa mortalidade nos grupos tratados com alopurinol, quando comparados com os grupos sem a droga, indicando uma possível toxicidade da mesma. Os resultados das pesquisas com isquemia-reperfusão e antioxidantes, têm apresentado resultados diferentes e conflitantes. Dessa forma esse assunto ainda necessita de uma ampla investigação, pelo fato de que seus resultados, poderão ter aplicação clínica para um importante e frequente problema da clínica pediátrica.

Conclusão

O alopurinol não apresentou efeito protetor sobre o testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático, seguida de reperfusão.

Referências

1. Anderson JB, Willianson RCN. The fate of the human testis following unilateral torsion of the spermatic cord. *Br J Urol*. 1986;58:698-704.
2. Menger MD, Pelkan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischaemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol*. 1992;263:H1901-6.
3. Akgür FM, Kiliç K, Akgüt T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res*. 1993;21:395-9.
4. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol*. 1985;20:598-601.
5. Araujo EJ. Efeitos da torção do cordão espermático sobre os parâmetros seminiais do testículo contralateral em ratos pré puberais [Tese-Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 1998.
6. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*. 1991;161:488-500.
7. Hulbert WC, Rabinowitz R. Experimental torsion of the spermatic cord. In: O'Donnell B, Koff SA. *Pediatric urology*.

- 3ed. Cambridge: University Press; 1997. p.286-8.
8. Tijoe DY, Steinberger E. A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testis. *J Reprod Fertil.* 1970;21:489-94.
 9. Harrison RG, Oettlé AG. Pathologic changes in the rat testis following ischaemia. *Proc Soc Study Fertyl.* 1950;2:6-11.
 10. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino M.J. Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl.* 1990;11:401-8.
 11. 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. *Andrology.* 1993;25:239-44.
 12. Harrison RG, Oettlé AG. Pathologic changes in the rat testis following ischaemia. *Proc Soc Study Fertyl.* 1950;2:6-11.
 13. Ludwig G, Haselberger J, Münzenmaier R. Spätveränderungen des Hodengewebes bei experimenteller Samenstrangstorsion. *Urologe.* 1979;18:350-4.
 14. Becker EJ, Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepuberal and adult rat. *J Androl.* 1995;16:342-51.
 15. Nagler HM, White R. The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *J Urol.* 1982;128:1343-8.
 16. Steinberger E, Tijoe DY. Spermatogenesis in rat testis after experimental ischaemia. *Fertil Steril.* 1969;20:639-49.
 17. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, Kololgi S, Salzberg DA, Koontz, WW. The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol.* 1992;148:639-41.
 18. Becker EJ, Prillaman HM, Turner TT. Microvascular blood flow is altered after repair of testicular torsion in the rat? *J Urol.* 1997;157:1493-8.
 19. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod.* 1993;49:401-7.

Correspondência:

Andreia Brochado Antonioli
Rua Pitangui, 399 –
79103151 Campo Grande – MS
abrochado@hotmail.com

Conflito de interesse: nenhum
Fonte de financiamento: nenhuma

Recebimento: 20/05/2005
Revisão: 21/06/2005
Aprovação: 19/07/2005

Como citar este artigo:

Silva ACMBA, Ortiz V, Silva RA, Tognini JR. Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. *Acta Cir Bras.* [periódico na Internet] 2005 Nov-Dez;20(6). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>

ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

QUALIS “A” nacional e QUALIS “C”
internacional pela CAPES.

Indexada nas bases de dados LILACS,
SciELO e MEDLINE.