

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**FREDERICO RAMALHO ROMERO**

**NECROSE E ATROFIA TESTICULARES APÓS  
TORÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO EM RATOS**

**CURITIBA  
2008**

**FREDERICO RAMALHO ROMERO**

**NECROSE E ATROFIA TESTICULARES APÓS  
TORÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho**

**Co-Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Regina Paula Xavier Gomes**

**Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias**

**CURITIBA  
2008**

Romero, Frederico Ramalho  
Necrose e atrofia testiculares após torção do funículo  
espermático em ratos / Frederico Ramalho Romero. – Curitiba, 2008.

58 f.:il.(color.).

Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho.  
Co-Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Regina Paula Xavier Gomes.  
Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Torção do funículo espermático. 2. Torção testicular. 3.  
Necrose. 4. Cirurgia urológica masculina. I. Título.

NLW: WJ 830



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 324ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **FREDERICO RAMALHO ROMERO** com o título **NECROSE E ATROFIA TESTICULARES APÓS TORÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO EM RATOS**, na **Linha de Pesquisa:** Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos na **Área de Concentração** Nutrição e Cicatrização tendo como orientador Prof. Dr. Renato Tambara Filho.

Às sete horas e trinta minutos do dia vinte e três de setembro de dois mil e oito, no Auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Luiz Sérgio Santos, Luiz Edson Slongo e Luiz Carlos de Almeida Rocha, sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido ao tempo máximo de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.

Luiz Sérgio Santos

Luiz Edson Slongo

Luiz Carlos de Almeida Rocha



Aos meus pais, Antonio Wilson Romero e Maria Direma Ramalho Romero.

À Karen, minha esposa, e ao meu filho Miguel. Pelos ensinamentos, paciência, apoio, estímulo, amor incondicional e por tudo que alcancei.

## AGRADECIMENTOS

A São Miguel e todos os anjos, pelas bênçãos, dádivas e proteção.

Ao professor doutor Renato Tambara Filho, pelo exemplo, orientações, incentivos e confiança depositada em mim.

À doutora Regina Paula Xavier Gomes, pelo auxílio, amizade e colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao professor doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, pela oportunidade de realizar esta pós-graduação.

Ao mestre Fernando Lorenzini, pelo incentivo, auxílio, companheirismo e amizade.

Ao estudante de graduação Thomas Rolf Erdmann, pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao Centro de Pesquisas Cirúrgicas Doutor Egas Izique Penteado, por ceder as instalações de seu biotério e materiais cirúrgicos.

Aos funcionários Álvaro e Carlos do Centro de Pesquisas Cirúrgicas Doutor Egas Izique Penteado, pela vontade de sempre ajudar.

Aos biotérios do Centro Politécnico da UFPR e do Centro Universitário Positivo, pela liberação dos animais empregados neste experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro.

Aos ratos que, pequeninos, prestam um grande serviço à humanidade.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King



## RESUMO

A torção do funículo espermático é a emergência urológica resultante da rotação do testículo em torno do eixo do funículo espermático. O objetivo deste trabalho é analisar a presença de necrose testicular imediatamente após uma a quatro horas de torção de 1080 graus do funículo espermático (isquemia testicular); a presença de necrose e atrofia testiculares 60 dias após a operação de destorção do funículo espermático (isquemia/reperfusão testicular); e diferenças nas taxas de necrose testicular imediatamente após uma a quatro horas de torção de 1080 graus do funículo espermático (isquemia testicular) e 60 dias após a destorção do funículo espermático (isquemia/reperfusão testicular). Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, 42 ratos *Wistar* machos foram separados aleatoriamente em dois grupos de estudo (A e B), com 18 ratos cada, e um grupo controle (C), com 6 ratos. Todos os ratos foram submetidos inicialmente à torção de 1080 graus do funículo espermático direito, exceto o grupo controle, submetido à operação simulada. A seguir, cada grupo de estudo foi subdividido em três subgrupos de acordo com diferentes períodos de torção (isquemia testicular) – uma hora (T1), duas horas (T2) ou quatro horas (T4). Os ratos do Grupo A foram submetidos a orquiectomia e avaliação morfológica, macroscópica e microscópica, para a detecção de necrose testicular, imediatamente após o período predeterminado de torção para cada subgrupo. Os ratos do Grupo B foram submetidos a destorção do funículo espermático e mantidos em biotério por 60 dias, antes de serem submetidos a orquiectomia e avaliação histológica para se detectar a presença ou ausência de necrose e atrofia testiculares. Nenhum rato do Grupo A apresentou necrose testicular, macroscopicamente, e apenas um deles (5,5%) apresentou evidência de necrose histologicamente, em comparação com seis ratos (33,3%) do Grupo B ( $p = 0,04$ ). A incidência de necrose testicular não foi diferente entre os subgrupos T1, T2 e T4 de ambos os grupos (A e B) e o grupo controle ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve uma tendência à maior incidência de necrose e atrofia testiculares nos ratos submetidos a quatro horas de torção (T4) seguida por destorção e observação por 60 dias (Grupo B). Com base na amostra utilizada no presente estudo, pode-se concluir que a lesão por isquemia testicular resultante da torção de 1080 graus do funículo espermático causa necrose testicular em apenas 5,5% dos testículos avaliados histologicamente imediatamente após uma a quatro horas de torção. Após 60 dias, a isquemia/reperfusão testicular resultante da destorção do funículo espermático produz necrose e atrofia testiculares em 33,3% dos testículos. A taxa de necrose testicular é maior 60 dias após a destorção do funículo espermático do que imediatamente após uma a quatro horas de torção de 1080 graus do funículo espermático.

Palavras-chave: Torção do funículo espermático. Torção testicular. Necrose. Cirurgia urológica masculina.

## ABSTRACT

Torsion of the spermatic funicle is a urological emergency that results from rotation of the testis around the axis of the spermatic funicle. The objective of this manuscript is to analyze the presence of testicular necrosis immediately after one to four hours of 1,080-degree torsion of spermatic funicle (testicular ischemia); the presence of testicular necrosis and atrophy 60 days after detorsion of the spermatic funicle (testicular ischemia/reperfusion); and differences in rates of testicular necrosis immediately after one to four hours of 1,080-degree torsion of spermatic funicle (testicular ischemia), and 60 days following detorsion of the spermatic funicle (testicular ischemia/reperfusion). After approval by the Ethics and Research Committee, 42 male *Wistar* rats were randomly allocated into two study groups (A and B), with 18 rats each, and one control group (C), with six rats. Initially, all rats underwent 1,080-degree torsion of the right spermatic funicle, except for the control group, which underwent sham operation. Next, each study group was subdivided in three subgroups according to different periods of torsion (testicular ischemia) – one hour (T1), two hours (T2), and four hours (T4). Rats in Group A underwent orchiectomy and morphologic, macroscopic and microscopic, evaluation for testicular necrosis immediately after predetermined periods of torsion for each subgroup. Rats in Group B underwent spermatic funicle detorsion, and were housed for 60 days before they underwent orchiectomy, and histological evaluation for the presence or absence of testicular necrosis and atrophy. No rat in Group A had testicular necrosis, macroscopically, and only one of them (5.5%) had evidence of necrosis histologically, in comparison with six rats (33.3%) in Group B ( $p = 0.04$ ). The incidence of testicular necrosis was not different between subgroups T1, T2, and T4 in both groups (A and B), and the control group ( $p > 0.05$ ). There was, however, a tendency toward greater incidence of testicular necrosis and atrophy in the rats undergoing four hours of torsion (T4) followed by detorsion and observation for 60 days (Group B). Based on the sample used in the present study, we can conclude that testicular ischemia resulting from 1,080-degree torsion of the spermatic funicle causes testicular necrosis in only 5.5% of testes evaluated histologically immediately after one to four hours of torsion. After 60 days, testicular ischemia/reperfusion resulting from detorsion of the spermatic funicle causes necrosis and atrophy in 33.3% of testes. The rate of testicular necrosis is higher 60 days after detorsion than immediately after one to four hours of 1,080-degree torsion of the spermatic funicle.

Key words: Spermatic cord torsion. Testicular torsion. Necrosis. Male urologic surgery.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 OBJETIVOS .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1 DEFINIÇÃO E INCIDÊNCIA .....	15
2.2 HISTÓRICO.....	15
2.3 CLASSIFICAÇÃO .....	16
2.4 FATORES PREDISPOANTES.....	16
2.5 LATERALIDADE .....	17
2.6 FISIOPATOLOGIA .....	17
2.7 DIAGNÓSTICO .....	17
2.7.1 Manifestações clínicas .....	17
2.7.2 Exame físico .....	18
2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....	19
2.9 EXAMES COMPLEMENTARES .....	19
2.10 TRATAMENTO .....	19
2.10.1 Destorção manual e destorção espontânea .....	19
2.10.2 Tratamento operatório .....	20
2.10.2.1 Destorção cirúrgica e orquidopexia .....	20
2.10.2.2 Orquiectomia .....	20
2.10.2.3 Orquidopexia profilática contralateral .....	21
2.10.2.4 Orquidopexia bilateral eletiva .....	21
2.11 PROGNÓSTICO .....	21
2.12 LESÃO TESTICULAR CONTRALATERAL .....	22
2.13 MODELOS EXPERIMENTAIS .....	22
2.13.1 Modelos de isquemia testicular .....	22
2.13.2 Modelos de torção testicular .....	23
2.13.2.1 Avaliação do fluxo sanguíneo .....	23
2.13.2.2 Avaliação histológica .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	27
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA .....	27
3.1.1 Critérios de inclusão .....	27
3.1.2 Critérios de exclusão .....	27
3.1.3 Ambiente de experimentação .....	28
3.1.4 Grupo de estudo.....	28
3.1.5 Grupo controle .....	30
3.2 TÉCNICA CIRÚRGICA .....	30

3.2.1 Determinação do peso dos ratos .....	30
3.2.2 Ato anestésico .....	30
3.2.3 Preparo e posicionamento dos ratos .....	31
3.2.4 Torção do funículo espermático direito .....	31
3.2.5 Orquiectomia direita .....	33
3.2.6 Destorção do funículo espermático direito .....	33
3.2.7 Operações simuladas .....	34
3.2.7.1 Primeira operação simulada .....	34
3.2.7.2 Segunda operação simulada .....	34
3.2.8 Observação pós-cirúrgica dos ratos e eutanásia .....	34
3.2.9 Análise morfológica .....	35
3.2.9.1 Avaliação macroscópica .....	35
3.2.9.2 Processamento histológico .....	35
3.2.9.3 Estudo histológico .....	36
3.2.10 Metodologia estatística .....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 PESO DOS ANIMAIS .....	37
4.2 PERDAS DE ANIMAIS.....	38
4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	38
4.3.1 Isquemia testicular .....	38
4.3.2 Isquemia/reperfusão testicular .....	40
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	42
5.1.1 Modelo animal .....	42
5.1.1.1 Linhagem dos ratos .....	42
5.1.1.2 Idade dos ratos .....	43
5.1.2 Técnica cirúrgica .....	43
5.1.2.1 Incisão cirúrgica .....	43
5.1.2.2 Secção do gubernáculo testicular.....	44
5.1.2.3 Torção exclusiva do testículo.....	44
5.1.2.4 Oclusão do funículo espermático.....	44
5.1.2.5 Grau de torção do funículo espermático.....	45
5.1.2.6 Tempo de isquemia testicular .....	46
5.1.3 Método de avaliação da lesão testicular .....	47
5.1.4 Tempo de avaliação das lesões testiculares .....	48
5.1.5 Limitações do estudo .....	48
5.1.5.1 Sensibilidade do método de avaliação da lesão testicular .....	48
5.1.5.2 Tamanho da amostra.....	49

5.2 PERSPECTIVAS .....	49
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>APÊNDICE</b> .....	56
<b>ANEXOS</b> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Nos diversos serviços de atendimento à saúde, não é infreqüente a ocorrência de dor escrotal ou testicular. A presença de dor, rubor e aumento do volume escrotal em curto período de tempo é denominada síndrome do “escroto agudo”, que tem amplo espectro de diagnósticos diferenciais (JESUS, 2000).

A torção do funículo espermático (ou torção testicular), emergência que se manifesta através do “escroto agudo”, é resultante da rotação anômala do testículo em torno de seu eixo longitudinal. Na presença de torção do funículo espermático, avaliação clínica de urgência e tratamento imediato são fundamentais para se preservar a função do testículo envolvido (GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002). Atrasos no diagnóstico e tratamento freqüentemente resultam em necrose testicular, redução na contagem espermática, potencial redução na fertilidade (KRARUP, 1978; BARTSCH *et al.*, 1980; FERREIRA *et al.*, 1991) e eventuais repercussões médico-legais (MATTESON, 2001; MANSBACH; FORBES; PETERS, 2005; PEROTTI *et al.*, 2006; RINGDAHL; TEAGUE, 2006). Além disso, a atrofia resultante da torção testicular pode elevar o risco relativo de neoplasia testicular (CHILVERS; PIKE; PECKHAM, 1987).

O estudo da torção do funículo espermático em humanos é complexo devido à ampla variabilidade com relação à idade de manifestação, tempo e grau de torção do funículo espermático e sucesso do tratamento operatório. Nesse contexto, impõe-se a necessidade de modelos experimentais, que são importantes pois permitem avaliar relações entre a duração e o grau da torção do funículo espermático com o fluxo sangüíneo e as lesões testiculares resultantes (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997). Os mecanismos de lesão testicular homolateral e contralateral podem ser estudados (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997), assim como seus efeitos sobre a fertilidade (COSENTINO *et al.*, 1986). Além disso, diversas substâncias podem ser empregadas com o objetivo de evitar ou reduzir as lesões histológicas testiculares (PALMER *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2007; BEHESHTIAN *et al.*, 2008; ERGUR *et al.*, 2008; PAYABVASH *et al.*, 2008). Existem, no entanto, controvérsias quanto à metodologia utilizada, quanto ao tempo crítico de isquemia além do qual as alterações testiculares tornam-se irreversíveis e quanto aos efeitos da reperfusão sobre o testículo acometido.

## 1.1 OBJETIVOS

Este estudo, idealizado para avaliar a presença de necrose e atrofia testiculares em ratos submetidos a torção de 1080 graus do funículo espermático por diferentes períodos de tempo, tem os seguintes objetivos específicos:

1) Avaliar a presença de necrose testicular imediatamente após uma a quatro horas de torção (isquemia testicular).

2) Analisar a diferença na taxa de necrose testicular imediatamente após diferentes períodos – uma, duas e quatro horas – de torção (isquemia testicular).

3) Investigar a presença de necrose e atrofia testiculares 60 dias após a operação de destorção do funículo espermático com uma a quatro horas de torção (isquemia/reperfusão testicular).

4) Analisar a diferença na taxa de necrose e atrofia testiculares 60 dias após a operação de destorção com diferentes períodos – uma, duas e quatro horas – de torção (isquemia/reperfusão testicular).

5) Pesquisar a diferença na taxa de necrose testicular imediatamente após uma a quatro horas de torção (isquemia testicular) em comparação com a taxa de necrose testicular 60 dias após a operação de destorção do funículo espermático com uma a quatro horas de torção (isquemia/reperfusão testicular).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DEFINIÇÃO E INCIDÊNCIA

A torção do funículo espermático é resultante da rotação anômala do testículo em torno de seu eixo longitudinal. Sua incidência anual varia entre um para cada 4000 homens e um para cada 158 homens com menos de 25 anos de idade, com picos de incidência nos neonatos e adolescentes entrando na puberdade (SKOGLUND; McROBERTS; RAGDE, 1970; WILLIAMSON, 1976; ANDERSON; WILLIAMSON, 1986). A torção do funículo espermático corresponde a aproximadamente um quarto a um terço dos pacientes pediátricos com “escroto agudo” (SESSIONS *et al.*, 2003).

### 2.2 HISTÓRICO

O primeiro caso típico, mas não reconhecido como torção do funículo espermático, foi descrito em 1776 por Hunter (*apud* NÖSKE *et al.*). Em 1840, Delasiauve (*apud* NÖSKE *et al.*) publicou o primeiro relato de caso diagnosticado como torção do funículo espermático no testículo não-descido de um menino de 15 anos de idade. Follin (1852, *apud* NÖSKE *et al.*) estabeleceu relação entre a torção do funículo espermático e a atrofia testicular com base nos estudos experimentais de Cooper em 1823 (*apud* NÖSKE *et al.*). Em 1857, Curling (*apud* NÖSKE *et al.*) descreveu um caso de Rosenmerkel, que destorceu um testículo não-descido, reposicionando-o no escroto e fixando-o através de pontos com a túnica dartos.

Como a maioria dos casos de torção ocorria em testículos não-descidos, Nicoladoni (1885, *apud* NÖSKE *et al.*) sugeriu que a torção do funículo espermático era a complicação mais freqüente de criptorquidismo, mas isso só foi confirmado em 1952, quando Wildbolz (*apud* NÖSKE *et al.*) relatou que aproximadamente 60% de todos os casos registrados de torção do funículo espermático ocorriam em testículos não-descidos. Esses números diminuíram com a orquidopexia e a introdução do tratamento hormonal para o tratamento de testículos não-descidos na década de 30. Desde então, a maioria das torções do funículo espermático ocorre em testículos típicos.



Taylor (*apud* NÖSKE *et al.*) descreveu o primeiro recém-nascido com torção do funículo espermático em 1897, mas levou mais 73 anos até que Skoglund, McRoberts e Ragde (1970) observaram os dois picos de incidência da doença, no primeiro ano de vida e durante a puberdade.

### 2.3 CLASSIFICAÇÃO

A torção do funículo espermático pode ser intravaginal ou extravaginal. A torção intravaginal é causada por malformação congênita do processo vaginal e é responsável por 90% dos casos. Nessa malformação, a túnica vaginal alongada ou redundante recobre, além do testículo e epidídimo, parte do funículo espermático. Isso cria uma deformidade em “badalo de sino”, que permite que o testículo gire livremente no interior da túnica vaginal (PALMER *et al.*, 1997; RINGDAHL; TEAGUE, 2006; AL-SALEM, 2007). Em geral, essa malformação é bilateral, determinando probabilidade de 40% de torção contralateral assincrônica (JESUS, 2000).

A torção extravaginal ocorre próxima ao anel inguinal externo, geralmente na vida intra-uterina ou no período neonatal, pela ausência de fixação da túnica vaginal às demais camadas da bolsa (JESUS, 2000; AL-SALEM, 2007). Essa fixação normalmente ocorre por volta dos dez dias de vida extra-uterina (JESUS, 2000).

Outra forma possível de torção, muito incomum, é a torção testicular “propriamente dita”, em que a gônada sofre torção entre si e o epidídimo, na presença de fixação anômala epidídimo-testicular (JESUS, 2000).

### 2.4 FATORES PREDISPOONENTES

A torção do funículo espermático pode ocorrer após contração súbita ou espasmo do músculo cremáster, que causa rotação espiral do testículo; queda súbita da temperatura; movimentos durante sono, caminhadas e atividade sexual; atividades esportivas como ciclismo, natação, paraquedismo e patinação; traumatismo testicular; aumento do volume testicular com o início da puberdade; tumores testiculares; história de criptorquidismo ou testículo retrátil; e/ou testículos com uma porção intra-escrotal longa (NÖSKE *et al.*, 1998; JESUS, 2000; GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002; CHARLES, 2004; RINGDAHL; TEAGUE,

2006). A maioria dos casos, no entanto, ocorre na ausência de qualquer evento precipitante (RINGDAHL; TEAGUE, 2006).

## 2.5 LATERALIDADE

O testículo esquerdo parece ser acometido mais freqüentemente que o direito provavelmente devido ao maior comprimento do funículo espermático esquerdo, que tende a apresentar maior mobilidade em comparação com o direito (GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002).

## 2.6 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da torção do funículo espermático está relacionada à isquemia imposta pela torção. Em 1917, Brunzel (*apud* NÖSKE *et al.*) concordou com a teoria de Kuestner, na qual a torção do funículo espermático ocorre em sentido lateral para medial e pode ser aliviada pela destorção no sentido oposto. A torção pode, no entanto, ocorrer em sentido medial para lateral em até 33% dos casos (SESSIONS *et al.*, 2003). Inicialmente, a torção do funículo espermático oclui o retorno venoso mas não as artérias, resultando em edema, ruptura vascular com hemorragia intersticial, isquemia generalizada e, finalmente, infarto testicular (CONSENTINO *et al.*, 1986; GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002).

## 2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da torção do funículo espermático geralmente pode ser feito a partir da história clínica e exame físico do paciente mas, desde 1913, Ombredanne (*apud* NÖSKE *et al.*) advertiu para a exploração escrotal precoce nos casos suspeitos para se evitar erro diagnóstico.

### 2.7.1 Manifestações clínicas

A dor aguda, na torção do funículo espermático, é caracteristicamente escrotal, mas pode ter irradiação lombar, inguinal ou abdominal. A apresentação é

de abdome agudo em testículos não-descidos. É importante ter cuidado com história de traumatismos leves, freqüentemente evocada por pacientes ou pais para justificar o episódio, responsável por grande número de erros e retardos diagnósticos (JESUS, 2000).

Episódios álgicos anteriores ipsi e/ou contralaterais podem ocorrer (8% a 63%), com ou sem destorção espontânea (história de dor com resolução espontânea, dor seguida de atrofia testicular ou operação anterior para correção de torção de funículo espermático) (JESUS, 2000).

Náuseas ou vômitos reflexos são freqüentes e ajudam no diagnóstico diferencial com torção de apêndice testicular e orquiepididimite. Sintomas urinários não são comuns, assim como febre (JESUS, 2000).

### 2.7.2 Exame físico

O exame físico começa com a determinação da presença, posição e volume dos testículos (SILVA, 2000). Diversos sinais diagnósticos úteis foram descritos para a identificação clínica da torção do funículo espermático. Em 1917, Brunzel (*apud* NÖSKE *et al.*) observou a elevação e horizontalização do testículo acometido, causados pelo encurtamento do funículo espermático após a sua torção. Muito precocemente, pode ser visível a umbilicação da porção inferior da pele escrotal (sinal de Ger), mas o habitual é verificar edema e hiperemia progressivos da bolsa testicular (JESUS, 2000). O *pergamentknistern* (crepitação do pergaminho), descrito em 1923 por Tenckhoff (*apud* NÖSKE *et al.*), é sinal tardio de mau prognóstico. O crepitar característico, semelhante ao enfisema operatório, pode indicar lesão irreversível do testículo. Em 1934, Prehn (*apud* NÖSKE *et al.*) observou que a elevação manual do escroto alivia a dor nos casos de orquiepididimite mas não nos casos de torção de funículo, enquanto Rabinowitz, em 1984 (*apud* NÖSKE *et al.*), observou que a perda do reflexo cremastérico em crianças pode indicar torção do funículo espermático.

## 2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial da torção do funículo espermático inclui amplo espectro de doenças que se manifestam através da síndrome do “escroto agudo”. As principais etiologias incluem orquiepididimite, abscesso escrotal, edema escrotal idiopático, hérnia encarcerada, hidrocele, neoplasia testicular, torção dos apêndices testiculares, traumatismo escrotal, vasculite testicular e varicocele (JESUS, 2000; MERNAGH; CACO; DE MARIA, 2004; RINGDAHL; TEAGUE, 2006).

## 2.9 EXAMES COMPLEMENTARES

Quando o diagnóstico clínico é duvidoso, a ultra-sonografia com efeito Doppler é recurso útil no diagnóstico diferencial de torção do funículo espermático (MANSBACH; FORBES; PETERS, 2005). O exame Doppler mostra ausência de fluxo na torção completa, mas pode haver fluxo em casos de torção incompleta, torção intermitente ou no início da torção, quando apenas o fluxo venoso está ocluído. Nos casos de orquite e epididimite, vai haver fluxo aumentado no testículo e epidídimo, respectivamente (MERNAGH; CACO; DE MARIA, 2004; RINGDAHL; TEAGUE, 2006). A ultra-sonografia também pode diferenciar doença testicular de doença extratesticular (RINGDAHL; TEAGUE, 2006).

A cintilografia com pertecnetato de tecnécio 99m é mais sensível que a ultra-sonografia no diagnóstico diferencial de torção do funículo espermático, mas é pouco utilizada porque a ultra-sonografia é mais rápida e mais facilmente disponível, fatores críticos quando a condição depende de diagnóstico ágil para ter prognóstico favorável (RINGDAHL; TEAGUE, 2006).

## 2.10 TRATAMENTO

### 2.10.1 Destorção manual e destorção espontânea

A destorção manual pode fornecer tratamento não invasivo e rápido, mas não deve atrasar a intervenção cirúrgica (RINGDAHL; TEAGUE, 2006). Em 1917, Brunzel (*apud* NÖSKE *et al.*) enfatizou que a destorção manual é um tratamento

factível mas que, isoladamente, não é efetivo. Apesar de poder atenuar a urgência pelo alívio dos sintomas, a destorção manual pode ser traiçoeira porque o testículo pode permanecer parcialmente torcido, com menor grau de torção residual (SESSIONS, 2003).

A destorção espontânea pode ocorrer antes da exploração cirúrgica ou durante a indução anestésica. Sessions *et al.* (2003) relataram 12% de destorção espontânea, 50% com destorção parcial e 50% com destorção completa. Por isso, a intervenção cirúrgica ainda é indicada após aparente destorção espontânea.

### 2.10.2 Tratamento operatório

A exploração cirúrgica de urgência é mandatória em todos os casos de torção do funículo espermático com menos de 24 horas de duração, nos casos sintomáticos com duração de até 48 horas mas sem induração testicular (torção incompleta ou intermitente), ou quando há dúvida diagnóstica (VISSER; HEYNS, 2003; AL-SALEM, 2007).

#### 2.10.2.1 Destorção cirúrgica e orquidopexia

Destorção cirúrgica e orquidopexia por acesso transescrotal são aconselhados nos casos que se reperfundem prontamente após o restabelecimento do fluxo sanguíneo testicular. A maioria dos autores aconselha fixação do testículo com fios inabsorvíveis em mais de um plano geométrico para impedir recorrência da torção (JESUS, 2000).

#### 2.10.2.2 Orquiectomia

A extração testicular está indicada apenas para testículos claramente inviáveis (JESUS, 2000), que não se reperfundem após a destorção cirúrgica ou com necrose testicular.

### 2.10.2.3 Orquidopexia profilática contralateral

A orquidopexia profilática contralateral é universalmente recomendada devido à alta probabilidade de anomalia bilateral de fixação e deve ser feita sempre que possível no mesmo ato operatório (JESUS, 2000; RINGDAHL; TEAGUE, 2006; AL-SALEM, 2007).

### 2.10.2.4 Orquidopexia bilateral eletiva

A orquidopexia bilateral eletiva é aconselhada em casos (ou forte suspeita clínica) de torção com resolução espontânea ou atrofia de testículo após episódio compatível com torção do funículo espermático não tratada, assim como após destorção manual (JESUS, 2000). Alguns autores advogam operação eletiva para a torção extravaginal intra-uterina e não a consideram emergência cirúrgica (AL-SALEM, 2007).

## 2.11 PROGNÓSTICO

Os fatores mais importantes que determinam o prognóstico da torção do funículo espermático são o grau de torção do funículo e o período de tempo decorrido entre o início dos sintomas e a intervenção cirúrgica (FERREIRA *et al.*, 2000; GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002; MERNAGH; CACO; DE MARIA, 2004; VISSER; HEYNS, 2003). Em 1933, os estudos de Hellner (*apud* NÖSKE *et al.*) mostraram que um período de isquemia inferior a seis horas não resultava em lesões teciduais tardias ou prejuízo na espermatogênese de testículos jovens ou adultos. Após dez horas, a maioria dos pacientes vai apresentar atrofia significativa a não ser que tenha ocorrido destorção espontânea ou que a torção seja limitada a 180-360 graus. Todos os pacientes com torção maior que 360 graus e duração maior que 24 horas vão apresentar atrofia testicular grave. A taxa de recuperação em testículos não-descidos é pior do que em testículos descidos, com porcentagem de orquiectomia de 60% a 71% (VISSER; HEYNS, 2003). Por motivos não estabelecidos, a incidência de orquiectomia é maior em pacientes com idade acima de 18 ou 20 anos (MANSBACH; FORBES; PETERS, 2005).

## 2.12 LESÃO TESTICULAR CONTRALATERAL

A lesão testicular contralateral resultante da torção do funículo espermático 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 (TURNER, 1985; TURNER; BROWN, 1993; BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; PRILLAMAN; TURNER, 1997; NGUYEN *et al.*, 1999; BOZLU *et al.*, 2004; KOC *et al.*, 2005; SALMASI *et al.*, 2005).

Várias teorias têm sido postuladas para explicar o possível dano ao testículo contralateral, incluindo auto-imunização, 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). Outras causas de lesão testicular contralateral incluem hérnia inguinal encarcerada, criptorquidismo, varicocele, obstrução do ducto deferente e neoplasias (VISSER; HEYNS, 2003).

## 2.13 MODELOS EXPERIMENTAIS

### 2.13.1 Modelos de isquemia testicular

Numerosos trabalhos experimentais foram realizados em diferentes espécies animais com o objetivo de reproduzir as lesões isquêmicas no testículo e determinar o período crítico compatível com a reversibilidade das lesões.

Maatz (1934) observou que a ligadura da artéria e veia espermáticas internas de ratos causou destruição das células germinativas testiculares após oito horas de isquemia, com preservação das células intersticiais de Leydig e células de Sertoli. No entanto, a destruição foi bastante irregular, com algumas células germinativas não apresentando dano algum.

Oettlé e Harrison (1952) realizaram oclusão temporária da circulação testicular em ratos através da ligadura da artéria testicular sobre banda de látex. A ligadura da artéria testicular foi aplicada em sua posição superficial sob a túnica albugínea no pólo inferior do testículo. A degeneração das células espermatogênicas

ocorreu com oclusão de 40 minutos a seis horas, com persistência apenas de células de Sertoli.

Utilizando a mesma metodologia de Oettlé e Harrison (1952) para a ligadura da artéria testicular, Steinberger e Tjioe (1969) evidenciaram que a oclusão temporária do fluxo testicular por 120 minutos induziu destruição e desaparecimento da maioria das células germinativas, com preservação apenas das células de Sertoli e de algumas espermatogônias.

Em 2000, Ferreira *et al.*, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, realizaram estudo em cães com garroteamento do funículo espermático por sonda de Nelaton. Após garroteamento de duas horas, houve ausência da espermatogênese com degeneração quase completa das células germinativas, restando apenas algumas espermatogônias. Após 60 dias, esses animais mostraram recuperação completa do epitélio germinativo, com túbulos seminíferos preservados e espermatogênese ativa. Com duas horas e meia, a espermatogênese foi inteiramente abolida, com degeneração e atrofia testicular 60 dias após o garroteamento.

No entanto, todos esses estudos experimentais avaliaram a isquemia testicular utilizando ligadura ou garroteamento da artéria testicular para produzir a isquemia e, portanto, não foram estudos de torção do funículo espermático propriamente dita (TURNER, 1985). A torção do funículo difere da sua ligadura pois oclui inicialmente as veias mas, não, as artérias do funículo espermático (COSENTINO *et al.*, 1986).

## 2.13.2 Modelos de torção testicular

### 2.13.2.1 Avaliação do fluxo sangüíneo

Unlüer, Ercan e Akdas (1984), utilizando o *clearance* de xenônio-133 para mensuração do fluxo sangüíneo testicular em coelhos, observaram que a torção de 720 graus do funículo espermático reduziu o fluxo sangüíneo para 8% a 16% dos valores do grupo controle.

Utilizando técnica de microesferas radioativas, Turner (1985) observou que a torção de 720 graus do funículo espermático de ratos, por duas horas, ocluiu



completamente (0%) o fluxo sangüíneo para o testículo ipsilateral. No entanto, 24 horas após a destorção, o fluxo sangüíneo voltou ao estado normal.

Em 1993, Turner e Brown, utilizando o mesmo método de Turner (1985), relataram que o fluxo sangüíneo testicular do rato reduziu para 3% a 4% dos valores do grupo controle durante o período de uma hora de torção de 720 graus. Quatro horas após a destorção, aproximadamente metade dos testículos demonstrou valores de fluxo sangüíneo normal e metade apresentou redução no fluxo sangüíneo. O fluxo sangüíneo testicular retornou aos valores do grupo controle em todos os testículos após 24 horas de destorção e permaneceu assim após 2, 7 e 15 dias mas, após 30 dias, apresentou valores significativamente reduzidos em relação ao grupo controle. Eles concluíram que a redução no fluxo sangüíneo, no entanto, foi conseqüência, e não causa, da degeneração do epitélio seminífero normal.

Becker, Prillaman e Turner (1997) mostraram através de Doppler fluxometria a *laser* que a perfusão de testículos de ratos submetidos a torção de 720 graus reduziu de  $5,7 \pm 0,8$  unidades de perfusão para  $0,5 \pm 0,3$  unidades de perfusão (8,8%) cinco minutos após a torção, virtualmente eliminando o fluxo sangüíneo durante o período de torção. A reperfusão dos testículos submetidos a torção de 720 graus por uma hora retornou a valores indistinguíveis do fluxo microvascular pré-torção dentro de 15 minutos após a destorção e chegou a atingir 138% dos valores de fluxo pré-torção. Testículos submetidos a duas e quatro horas de torção atingiram os níveis de fluxo microvascular pré-torção após 30 minutos, mas atingiram valores máximos de fluxo inferiores a 65% dos valores pré-torção.

Em estudo comparando o grau de insuficiência vascular produzida pelo clampeamento ou pela torção de 720 graus do funículo espermático em ratos, Palmer, Plzak e Cromie (1997) mostraram através de Doppler fluxometria a *laser* que o clampeamento do funículo espermático reduziu o fluxo sangüíneo em 81,6%, enquanto a torção do funículo resultou em redução de 61,7%. Eles concluíram que o clampeamento do funículo espermático produz redução mais intensa e reprodutível do fluxo sangüíneo do que a torção de 720 graus pelo mesmo período de tempo.

Turner, Bang e Lysiak (2005) observaram, utilizando o mesmo método de Becker, Prillaman e Turner (1997) e Palmer, Plzak e Cromie (1997), que o fluxo sangüíneo testicular de ratos reduziu de  $12,6 \pm 0,9$  unidades de perfusão para  $3,1 \pm 0,4$  unidades de perfusão (24,6%) durante o período de uma hora de torção de 720 graus. A destorção resultou em fluxo sangüíneo de  $9,7 \pm 1,1$  unidades de perfusão

(77%) após cinco minutos,  $10,5 \pm 1,7$  unidades de perfusão (83,3%) após três dias, e valores estatisticamente semelhantes ao fluxo sanguíneo pré-torção após 30 dias.

#### 2.13.2.2 Avaliação histológica

Turner (1985) avaliou, em ratos, a torção de testículos no seu eixo longitudinal com 180, 360 e 720 graus de rotação por períodos de uma, duas ou quatro horas, seguida por destorção e avaliação histológica dos testículos após 7, 30 ou 60 dias. Enquanto as torções por 180 e 360 graus resultaram apenas em efeitos isquêmicos agudos leves a moderados, ele determinou que a torção de 720 graus por quatro horas produziu infarto completo do testículo, demonstrando que o fluxo sanguíneo testicular do rato é significativamente reduzido pela torção de 720 graus do funículo espermático. Sete dias após a destorção dos testículos, os testículos torcidos por uma hora apresentaram degeneração do epitélio germinativo resultando em túbulo seminífero vazio circundado por células de Sertoli e com células de Leydig presentes no espaço intersticial. Após 60 dias de destorção, a degeneração foi ainda maior. A torção por duas horas geralmente causou atrofia e oclusão dos túbulos seminíferos por material acelular e homogêneo. As células intersticiais persistiram em 40% dos testículos examinados após 30 e 60 dias de destorção. A torção testicular por quatro horas causou destruição completa dos elementos celulares tanto intra quanto extratubulares. Isso ocorreu após sete dias da torção e persistiu após 60 dias.

Consentino *et al.* (1986) avaliaram testículos de ratos submetidos a torção de 720 graus do funículo espermático por vários períodos de tempo (0, 1, 3, 5, 9 ou 12 horas). Após uma hora de torção eles encontraram perda de espermatozoides e espermátides, degeneração das camadas de células germinativas, edema e hemorragia. Desalinhamento das camadas de células germinativas e ruptura dos túbulos seminíferos ocorreram somente após cinco e nove horas de torção, respectivamente.

Saba *et al.* (1997) avaliaram histologicamente o testículo de ratos submetidos a 720 graus de torção por uma ou duas horas, seguida por destorção e reavaliação após seis horas, um dia ou uma semana. Após uma hora de torção houve alterações morfológicas nos espermátócitos primários e, ocasionalmente, nas

espermátides redondas. Nenhuma alteração morfológica foi observada nas células do espaço intersticial. Após duas horas, a torção do funículo espermático induziu mais alterações morfológicas agudas nos espermatócitos e espermátides redondas, que se soltaram do epitélio seminífero para o interior do lúmen dos túbulos, formando aglomerados multinucleados em alguns casos. As alterações degenerativas pioraram após seis horas, um dia e uma semana de destorção. Em alguns casos, toda a população de células germinativas foi eliminada e os túbulos ficaram alinhados exclusivamente por células de Sertoli.

Em 1997, Turner e Brown avaliaram testículos de ratos 30 dias após a torção de 720 graus do funículo espermático por 30 minutos e uma hora. Os testículos submetidos a 30 minutos de torção apresentaram histologia normal, enquanto aqueles submetidos a uma hora de torção apresentaram depleção ou degeneração das células germinativas e presença somente de células de Sertoli. Eles concluíram que o tempo crítico de torção para que ocorra lesão testicular grave no testículo do rato encontra-se entre 30 minutos e uma hora.

Em estudo comparando o clampeamento e a torção de 720 graus do funículo espermático do rato, Palmer, Plzak e Cromie (1997) mostraram que o clampeamento do funículo espermático pelo período de quatro horas produz lesões histológicas mais graves do que a torção de 720 graus pelo mesmo período de tempo. Houve degeneração dos túbulos seminíferos em todos os casos de clampeamento, em comparação com 67% dos casos de torção do funículo espermático. Eles concluíram que, baseados neste intervalo de tempo (quatro horas), o modelo de torção de 720 graus do funículo espermático não é tão preciso quanto o clampeamento do funículo espermático para produzir isquemia testicular.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Aplicou-se neste trabalho a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1975). A manipulação laboratorial dos animais foi baseada nos relatos de Waynforth e Flecknell (1992), seguindo as disposições sobre a criação e o uso de animais para atividades de ensino e pesquisa, preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999).

A execução do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba (ANEXO 1).

#### 3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

Utilizaram-se 42 ratos albinos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e do Biotério do Centro Universitário Positivo.

##### 3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo ratos machos, com idade variando de 70 a 90 dias e peso entre 200 e 350 gramas, de bom aspecto geral, ativos e sem evidência de doença a inspeção.

##### 3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo ratos que morreram durante o período do experimento, que apresentaram complicações cirúrgicas como deiscência de sutura e infecção, ou nos quais a torção do funículo espermático não foi mantida pelo período de tempo predeterminado.

### 3.1.3 Ambiente de experimentação

Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas Doutor Egas Izique Penteado da UFPR. Os ratos foram confinados em gaiolas de polipropileno de dimensões padronizadas, com número máximo de cinco ratos por caixa, sendo mantidos durante todo o período de observação no biotério sob condições padronizadas de laboratório, com ciclo de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão em temperatura entre 20°C e 24°C. Os ratos foram alimentados com ração própria para a espécie (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil) e tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

### 3.1.4 Grupo de estudo

Inicialmente, 36 ratos foram submetidos a torção do funículo espermático direito (T0). Em seguida, de maneira aleatória, esses ratos foram divididos em dois grupos: Grupo A, com 18 ratos, submetidos a orquiectomia direita e Grupo B, com 18 ratos, submetidos a destorção do funículo espermático direito.

Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, contendo seis ratos cada, de acordo com o tempo predeterminado de torção do funículo espermático no T0. Cada subgrupo, submetido à torção por uma, duas ou quatro horas, foi denominado T1, T2 e T4, respectivamente. Dessa forma, os ratos do Grupo A receberam as denominações A-T1, A-T2 e A-T4, de acordo com o intervalo de tempo entre a torção do funículo espermático direito (T0) e a orquiectomia direita. Os ratos do Grupo B foram denominados B-T1, B-T2 e B-T4, de acordo com o intervalo de tempo entre a torção do funículo espermático (T0) e a destorção do funículo espermático.

Os ratos do Grupo A foram submetidos a eutanásia logo após a orquiectomia direita e os testículos avaliados morfológicamente, macroscopicamente e histologicamente, para a detecção de necrose testicular. Os ratos do Grupo B foram mantidos em biotério, após a destorção do funículo espermático, por 60 dias. Em seguida, esses ratos foram submetidos a orquiectomia e os testículos avaliados histologicamente para a presença ou ausência de necrose e atrofia testiculares (QUADRO 1).

Grupos		Número de ratos	Procedimento inicial (T0)	Reoperação		Eutanásia
				Tempo de torção	Tipo de operação	
A	T1	6	Torção do funículo espermático direito	1 hora	Orquiectomia direita	Imediatamente após a orquiectomia
	T2	6		2 horas		
	T4	6		4 horas		
B	T1	6		1 hora	Destorção do funículo espermático direito	Após 60 dias
	T2	6		2 horas		
	T4	6		4 horas		

QUADRO 1 – GRUPOS E SUBGRUPOS DE ESTUDO SUBMETIDOS A TORÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTAS: A = Grupo de ratos submetidos a orquiectomia direita

B = Grupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático

T0 = Procedimento inicial realizado em todos os ratos

T1 = Subgrupo de ratos submetidos a reoperação após uma hora de torção do funículo espermático

T2 = Subgrupo de ratos submetidos a reoperação após duas horas de torção do funículo espermático

T4 = Subgrupo de ratos submetidos a reoperação após quatro horas de torção do funículo espermático

### 3.1.5 Grupo controle

Seis ratos foram inicialmente submetidos a primeira operação simulada (T0) e, aleatoriamente, divididos em dois grupos: Grupo A, com três ratos, submetidos a orquiectomia direita e Grupo B, com três ratos, submetidos a segunda operação simulada. Os três ratos de cada grupo foram reoperados após uma, duas e quatro horas, respectivamente, da primeira operação simulada. Os ratos do Grupo A (A-C1, A-C2 e A-C4) foram avaliados morfológicamente imediatamente após a orquiectomia e os ratos do Grupo B (B-C1, B-C2 e B-C4) foram mantidos em observação por 60 dias antes de serem submetidos a orquiectomia para avaliação histológica (QUADRO 2).

Grupos		Número de ratos	Procedimento inicial (T0)	Reoperação		Eutanásia
				Tempo	Tipo de operação	
A	C1	1	Primeira Operação Simulada	1 hora	Orquiectomia direita	Imediatamente após a orquiectomia
	C2	1		2 horas		
	C4	1		4 horas		
B	C1	1		1 hora	Segunda Operação Simulada	Após 60 dias
	C2	1		2 horas		
	C4	1		4 horas		

QUADRO 2 – GRUPO CONTROLE

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTAS: A = Grupo de ratos submetidos a orquiectomia direita

B = Grupo de ratos submetidos a segunda operação simulada

T0 = Procedimento inicial realizado em todos os ratos

C1 = Subgrupo de ratos submetidos a reoperação após 1 hora da primeira operação simulada

C2 = Subgrupo de ratos submetidos a reoperação após 2 horas da primeira operação simulada

C4 = Subgrupo de ratos submetidos a reoperação após 4 horas da primeira operação simulada

## 3.2 TÉCNICA CIRÚRGICA

### 3.2.1 Determinação do peso dos ratos

No início do experimento, todos os ratos foram pesados em balança eletrônica de alta precisão (Ohaus Precision Standard – modelo TS-2KS, Bradford, Inglaterra).

### 3.2.2 Ato anestésico

A anestesia foi obtida com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (50mg/kg de peso corporal) e xilazina (10mg/kg de peso corporal).

### 3.2.3 Preparo e posicionamento dos ratos

Os ratos foram submetidos a tricotomia escrotal e posicionados em decúbito dorsal horizontal numa prancha de cortiça, com os quatro membros fixos a mesa cirúrgica com fita adesiva (FIGURA 1). Assepsia e anti-sepsia foram realizadas com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10% e colocação de campo operatório fenestrado estéril.



FIGURA 1 – POSICIONAMENTO DOS RATOS  
FONTE: O AUTOR (2008)

### 3.2.4 Torção do funículo espermático direito

Inicialmente (T0), em todos os subgrupos de estudo (A-T1, A-T2, A-T4, B-T1, B-T2 e B-T4), realizou-se incisão escrotal longitudinal mediana de dois centímetros de extensão com bisturi lâmina 15, interessando todos os planos do escroto até a abertura da lâmina parietal da túnica vaginal do testículo direito (FIGURA 2-A).

Após identificação do testículo direito, ele foi exposto no campo operatório (FIGURA 2-B), o gubernáculo foi seccionado (FIGURA 2-C) e o testículo torcido três voltas completas (1080 graus) em sentido horário. A torção foi mantida em posição



através da fixação com dois pontos de fio de poliéster multifilamentar 7-0 (verde) entre a túnica albugínea e a lâmina parietal da túnica vaginal (FIGURA 2-D).

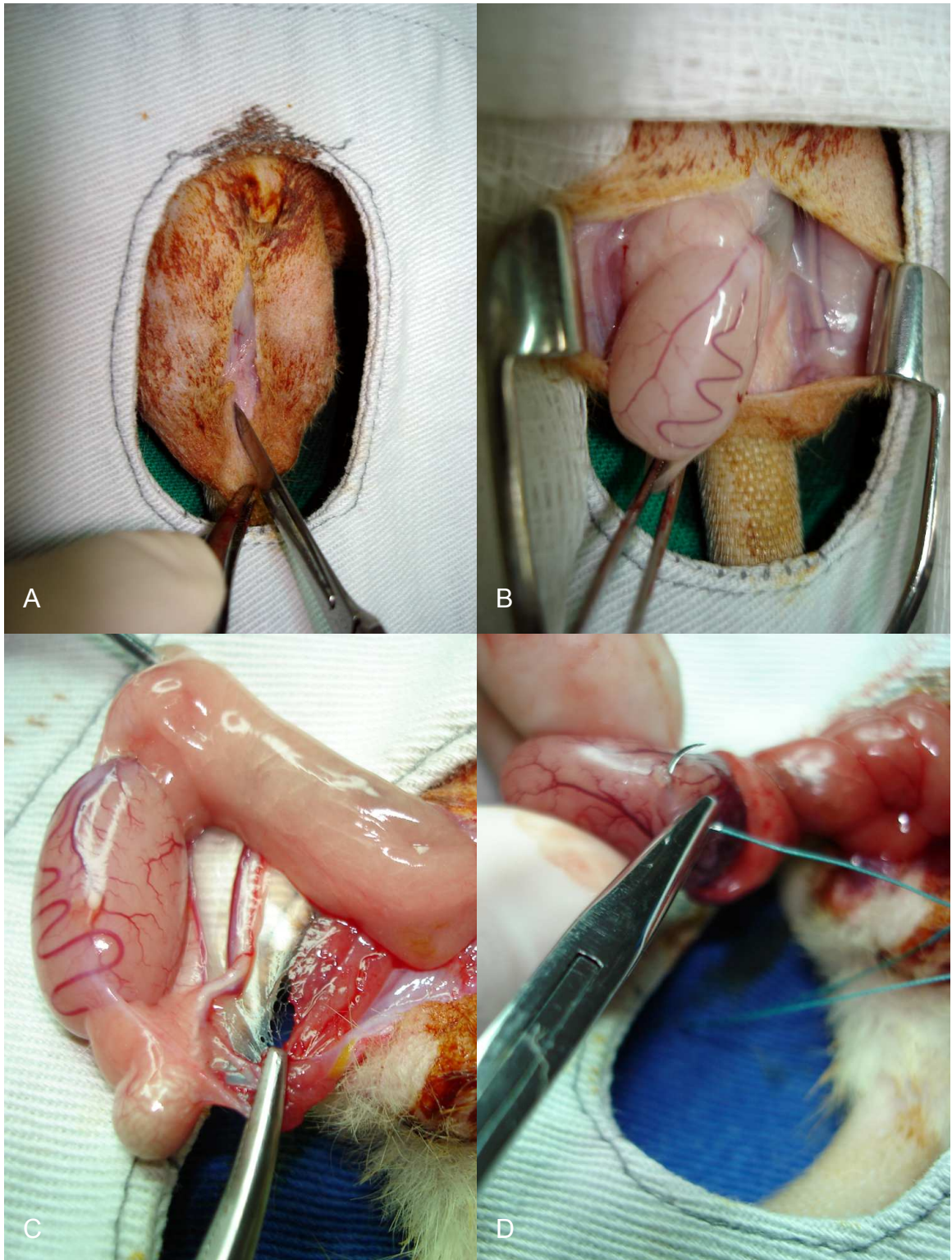


FIGURA 2 – INCISÃO ESCROTAL LONGITUDINAL MEDIANA (A); EXPOSIÇÃO DO TESTÍCULO DIREITO (B); SECÇÃO DO GUBERNÁCULO TESTICULAR (C); FIXAÇÃO DO TESTÍCULO COM FIO DE POLIÉSTER PARA MANTER A TORÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO (D)  
FONTE: O AUTOR (2008)

O testículo foi reposicionado em sua posição anatômica habitual e o escroto suturado em plano único com pontos simples, contínuos, de fio de categute 4-0 simples.

#### 3.2.5 Orquiectomia direita

Após períodos de tempo predeterminados para cada subgrupo (A-T1, A-T2, A-T4, A-C1, A-C2 e A-C4), a sutura escrotal foi seccionada e o testículo direito acessado novamente.

Os pontos de poliéster multifilamentar para fixação testicular foram seccionados. O testículo direito foi tracionado e seu funículo espermático clampeado com duas pinças hemostáticas. Após transecção do funículo com tesoura de Metzemaum, os cotos proximal e distal foram ligados com fio de algodão 4-0 e o escroto foi suturado em plano único com pontos simples, contínuos, de fio de categute 4-0.

#### 3.2.6 Destorção do funículo espermático direito

Após períodos de tempo predeterminados para cada subgrupo (B-T1, B-T2 e B-T4), a sutura escrotal foi seccionada e o testículo direito novamente acessado.

Os pontos de poliéster multifilamentar para fixação testicular foram seccionados. O testículo direito foi destorcido três voltas (1080 graus) em sentido anti-horário e mantido em posição através da fixação com dois pontos de fio de poliéster multifilamentar 7-0 entre a túnica albugínea e a lâmina parietal da túnica vaginal.

O escroto foi suturado em plano único com pontos separados, em “x”, de fio de categute 4-0.

### 3.2.7 Operações simuladas

#### 3.2.7.1 Primeira operação simulada

Nos ratos do grupo controle (A-C1, A-C2, A-C4, B-C1, B-C2 e B-C4), realizou-se incisão escrotal longitudinal mediana de dois centímetros de extensão com bisturi lâmina 15 até a abertura da lâmina parietal da túnica vaginal do testículo direito.

Após identificação do testículo direito, ele foi exposto no campo operatório e fixo, sem torção, com dois pontos de fio de poliéster multifilamentar 7-0 entre a túnica albugínea e a lâmina parietal da túnica vaginal.

O testículo foi reposicionado em sua posição anatômica habitual e o escroto suturado em plano único com pontos simples, contínuos, de fio de categute 4-0.

#### 3.2.7.2 Segunda operação simulada

Após períodos de tempo predeterminados para cada subgrupo (B-C1, B-C2 e B-C4), a sutura escrotal foi seccionada e o testículo direito novamente acessado.

Os pontos de poliéster multifilamentar para fixação testicular foram seccionados e novos pontos de fio de poliéster multifilamentar 7-0 foram realizados entre a túnica albugínea e a lâmina parietal da túnica vaginal. O escroto foi suturado em plano único com pontos separados, em “x”, de fio de categute 4-0.

### 3.2.8 Observação pós-cirúrgica dos ratos e eutanásia

Os ratos do Grupo A (A-T1, A-T2, A-T4, A-C1, A-C2 e A-C4) foram submetidos a eutanásia por meio de intoxicação anestésica por éter sulfúrico (Farmácia Magistral, Curitiba, PR, Brasil) logo após a realização da orquiectomia direita.

Os ratos do Grupo B (B-T1, B-T2, B-T4, B-C1, B-C2 e B-C4) foram identificados e encaminhados ao biotério, onde foram alojados em gaiolas de polipropileno e permaneceram em observação com livre acesso a ração e água.

A identificação dos ratos foi realizada combinando-se duas ordens numéricas para formar uma dezena de identificação, variando entre 01 e 21. O primeiro número da dezena foi determinado de acordo com: 0 – ausência de incisão na orelha dos ratos; 1 – presença de uma incisão na orelha esquerda; e 2 – presença de uma incisão na orelha direita (APÊNDICE 1-A). O segundo número da dezena de identificação foi determinado pela marcação com ácido pícrico em segmentos predeterminados do rato (APÊNDICE 1-B).

Depois de 60 dias de observação, os ratos do Grupo B foram submetidos a orquiectomia direita do mesmo modo que o descrito para os ratos do Grupo A no item 3.2.5. Em seguida, foram submetidos a eutanásia por meio de intoxicação anestésica por éter sulfúrico em recipiente fechado.

### 3.2.9 Análise morfológica

#### 3.2.9.1 Avaliação macroscópica

Após período de tempo predeterminado para cada subgrupo (A-T1, A-T2, A-T4, A-C1, A-C2 e A-C4), os testículos foram avaliados para a detecção de necrose testicular imediatamente antes do clampeamento do funículo espermático durante a orquiectomia direita. A seguir, eles foram identificados, seccionados no plano coronal e armazenados individualmente em recipientes numerados ao acaso.

#### 3.2.9.2 Processamento histológico

A preparação do material histológico seguiu os métodos de histotécnica habituais (PROPHET *et al.*, 1994). Os fragmentos foram fixados em solução de Bouin por 4 horas e submetidos a processamento histológico por meio de desidratação com álcool etílico em concentrações progressivas de 70% a 100%, diafanização em xilol, inclusão em parafina a 60°C e constituição do bloco. Na seqüência, esse bloco foi submetido a cortes de três micrômetros de espessura, submetidos a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) (ANEXO 2).

A análise e interpretação anatomopatológica foi realizada de forma cega pelo patologista, sem conhecimento prévio dos grupos e subgrupos em estudo.

### 3.2.9.3 Estudo histológico

O estudo dos parâmetros histológicos foi efetuado por meio de microscopia óptica com auxílio do microscópio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tóquio, Japão).

As amostras foram examinadas em aumentos variáveis, de 40 a 600 vezes, em um total de dez campos de grande aumento. A lesão histológica pesquisada foi a necrose hemorrágica testicular, isoladamente ou em associação à atrofia testicular. A presença de lesão foi considerada quando, nos dez campos observados, a maioria dos túbulos, ou seja, mais de 50%, tiveram alterações histológicas. Alterações isoladas não foram consideradas.

### 3.2.10 Metodologia estatística

O peso dos ratos foi analisado como variável quantitativa contínua e exposto como média  $\pm$  desvio padrão. O teste t de Student foi utilizado para comparar as médias de peso entre os subgrupos de estudo e o grupo controle. Os resultados encontrados durante a análise morfológica foram considerados variáveis qualitativas nominais dicotômicas (presença ou ausência de necrose testicular e presença ou ausência de atrofia testicular). A comparação entre os subgrupos de estudo e o grupo controle foi feita pelo teste exato de Fisher. Os cálculos foram realizados com auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences for Windows* (SPSS, Chicago, Estados Unidos), versão 13.0. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PESO DOS ANIMAIS

O peso médio dos 48 ratos no início do experimento foi de 294,1g  $\pm$  26,0g, variando de 238g a 350g. Não houve diferença no peso médio dos ratos entre os subgrupos do estudo (TABELA 1).

TABELA 1 – PESO DOS ANIMAIS NOS GRUPOS A E B EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

Subgrupos	Peso Médio (grama)	Desvio padrão	Peso Mínimo	Peso Máximo	Valor de p <sup>(1)</sup>
A-T1	277,7	14,3	265	304	0,098
A-T2	305,2	13,0	293	323	0,991
A-T4	279,6	19,9	258	301	0,125
B-T1	290,5	36,6	238	339	0,758
B-T2	286,8	24,8	259	327	0,282
B-T4	301,7	15,9	281	322	0,751
C	314,8	34,4	263	350	-

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTAS: A-T1 = Subgrupo de ratos submetidos a orquiectomia direita após uma hora de torção do funículo espermático

A-T2 = Subgrupo de ratos submetidos a orquiectomia direita após duas horas de torção do funículo espermático

A-T4 = Subgrupo de ratos submetidos a orquiectomia direita após quatro horas de torção do funículo espermático

B-T1 = Subgrupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático após uma hora de torção e, após 60 dias, orquiectomia ipsilateral

B-T2 = Subgrupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático após duas horas de torção e, após 60 dias, orquiectomia ipsilateral

B-T4 = Subgrupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático após quatro horas de torção e, após 60 dias, orquiectomia ipsilateral

C = Grupo controle

(1) = Teste t de Student

## 4.2 PERDAS DE ANIMAIS

Sete ratos morreram por ocasião do procedimento operatório, todos durante a anestesia. Esses animais foram excluídos do estudo e substituídos. Nenhum rato apresentou complicações ou morreu durante o período de observação pós-cirúrgica. A torção do funículo espermático foi mantida pelo período de tempo predeterminado em todos os ratos.

## 4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

### 4.3.1 Isquemia testicular

Dos 18 ratos submetidos inicialmente a torção de 1080 graus do funículo espermático e, após uma, duas ou quatro horas, a orquiectomia para avaliação dos efeitos da isquemia testicular sobre o testículo ipsilateral (Grupo A), nenhum rato apresentou necrose testicular, macroscopicamente (FIGURA 3), e um rato (5,5%) apresentou necrose, histologicamente (FIGURA 4). Não houve atrofia testicular. A incidência de necrose testicular não foi diferente entre os subgrupos A-T1, A-T2 e A-T4 e o grupo controle (TABELA 2).

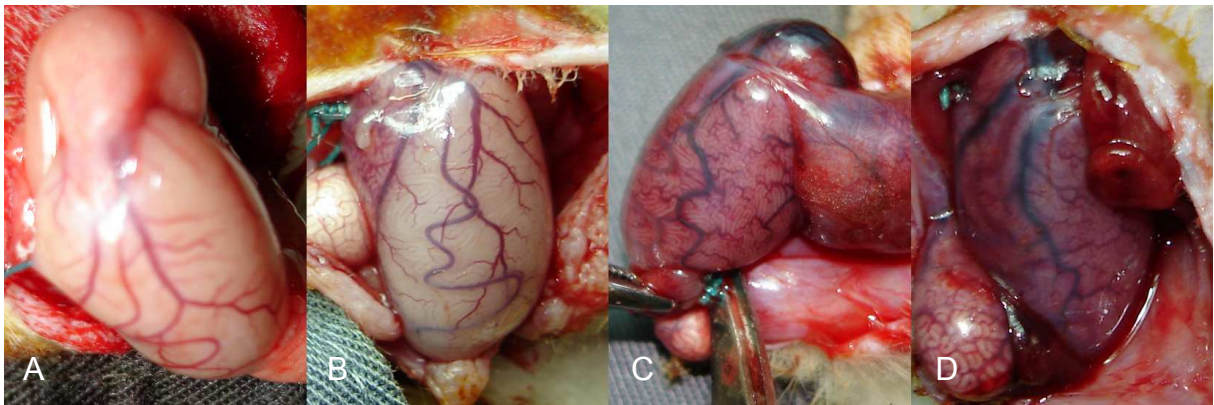


FIGURA 3 – ASPECTO MACROSCÓPICO DOS TESTÍCULOS NO GRUPO CONTROLE (A) E APÓS UMA (B), DUAS (C) E QUATRO (D) HORAS DE TORÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO  
FONTE: O AUTOR (2008)

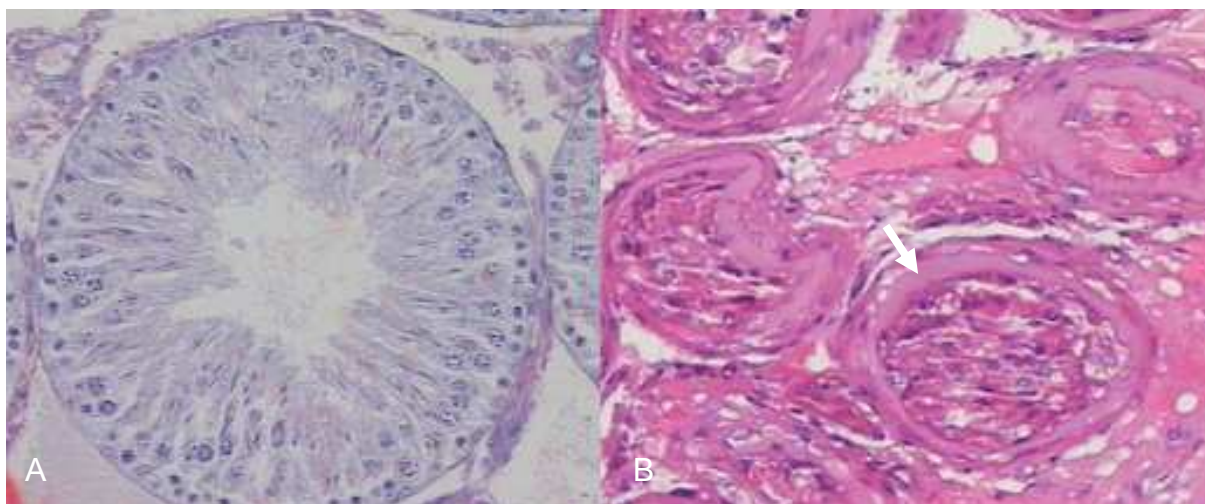


FIGURA 4 – ASPECTO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS. A – TÚBULO SEMINÍFERO NORMAL. B – TÚBULOS NECRÓTICOS, COM ACENTUADA DIMINUIÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE, CONTENDO RARAS ESPERMATOGÔNIAS OU SOMENTE CÉLULAS DE SERTOLI E APRESENTANDO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL (SETA)  
 FONTE: O AUTOR (2008)

TABELA 2 – PRESENÇA DE NECROSE TESTICULAR IPSILATERAL NO GRUPO A EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

Subgrupos	Necrose testicular				Valor de p <sup>(1)</sup>
	Macroscópica		Histológica		
	Não n. (%)	Sim n. (%)	Não n. (%)	Sim n. (%)	
A-T1	6 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	1,000
A-T2	6 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	1,000
A-T4	6 (100)	0 (0)	5 (83,3)	1 (16,7)	0,499
C	6 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	-

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTAS: n. = Número de ratos em cada subgrupo

% = Porcentagem de ratos em cada subgrupo

A-T1 = Subgrupo de ratos submetidos a orquiectomia direita após uma hora de torção do funículo espermático

A-T2 = Subgrupo de ratos submetidos a orquiectomia direita após duas horas de torção do funículo espermático

A-T4 = Subgrupo de ratos submetidos a orquiectomia direita após quatro horas de torção do funículo espermático

C = Grupo controle

(1) = Teste exato de Fisher



#### 4.3.2 Isquemia/reperfusão testicular

Dos 18 ratos submetidos a destorção do funículo espermático com uma, duas ou quatro horas de torção e, após 60 dias, a orquiectomia para avaliação dos efeitos da isquemia/reperfusão testicular sobre o testículo ipsilateral (Grupo B), seis ratos (33,3%) apresentaram necrose e atrofia testiculares (FIGURA 5). A incidência de necrose testicular no Grupo B foi maior do que no Grupo A ( $p = 0,04$ ). No entanto, a incidência de necrose e atrofia testiculares não foi diferente entre os subgrupos B-T1, B-T2 e B-T4 e o grupo controle (TABELA 3).

TABELA 3 – PRESENÇA DE NECROSE E ATROFIA DO TESTÍCULO IPSILATERAL NO GRUPO B EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

Subgrupos	Necrose e Atrofia		Valor de p <sup>(1)</sup>
	Não n. (%)	Sim n. (%)	
B-T1	5 (83,3)	1 (16,7)	0,499
B-T2	4 (66,7)	2 (33,3)	0,227
B-T4	3 (50,0)	3 (50,0)	0,090
C	6 (100)	0 (0)	-

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTAS: n. = Número de ratos em cada subgrupo

% = Porcentagem de ratos em cada subgrupo

B-T1 = Subgrupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático após uma hora de torção e, após 60 dias, orquiectomia ipsilateral

B-T2 = Subgrupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático após duas horas de torção e, após 60 dias, orquiectomia ipsilateral

B-T4 = Subgrupo de ratos submetidos a destorção do funículo espermático após quatro horas de torção e, após 60 dias, orquiectomia ipsilateral

C = Grupo controle

(1) = Teste exato de Fisher

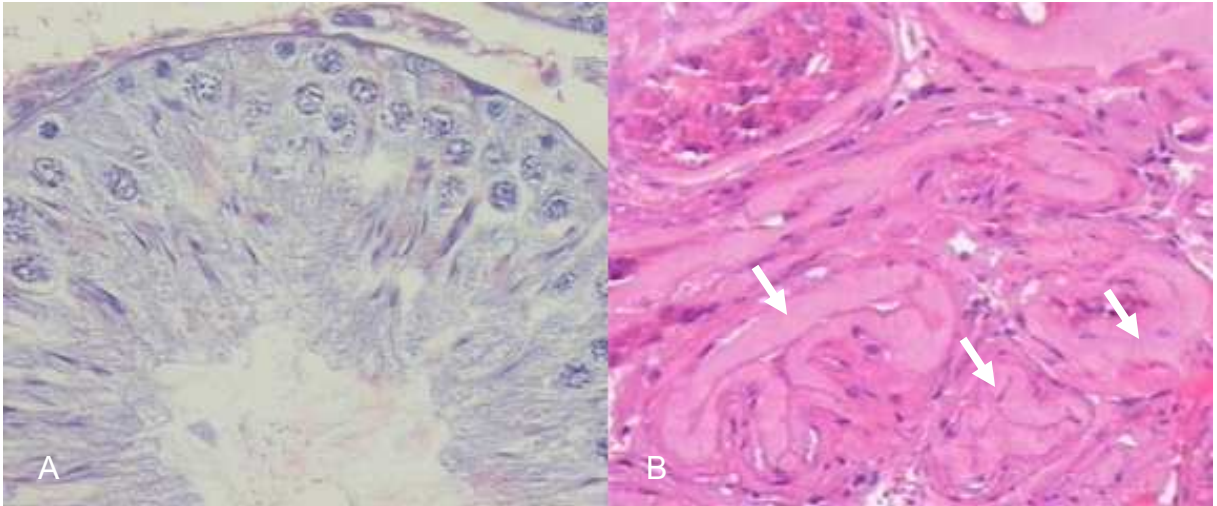


FIGURA 5 – ASPECTO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS. A – TÚBULO SEMINÍFERO SEM ALTERAÇÕES. B – TÚBULOS COM ATROFIA COMPLETA E ACENTUADO ESPESSAMENTO DA MEMBRANA BASAL (SETAS)  
FONTE: O AUTOR (2008)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O tema torção do funículo espermático tem sido amplamente estudado sob diversos aspectos, como o efeito da isquemia sobre o parênquima testicular submetido à hipóxia, os efeitos do fenômeno isquemia/reperfusão, o dano sobre o testículo contralateral e os meios de evitar ou diminuir esses efeitos. Os trabalhos revisados na literatura apresentam metodologia bastante variada, que tem como consequência resultados diversos e conflitantes. Fatores como o tipo e a espécie do animal, sua idade, o modo de se produzir a isquemia, o tempo de duração da isquemia e os métodos de avaliação das lesões testiculares dificultam a análise e comparação dos trabalhos (SILVA *et al.*, 2005).

#### 5.1.1 Modelo animal

Os modelos animais são importantes no estudo da torção do funículo espermático devido à complexidade e relativa raridade dessa emergência em humanos (SKOGLUND; McROBERTS; RAGDE, 1970; WILLIAMSON, 1976; ANDERSON; WILLIAMSON, 1986). Vários animais foram utilizados como modelo para a torção do funículo espermático, incluindo ratos, cães, coelhos e porcos (CHAKRABORTY; SINHA HIKIM; JHUNJHUNWALA, 1985; TURNER, 1985; FERREIRA *et al.*, 2000; KEHINDE *et al.*, 2005). Esses modelos são importantes pois permitem avaliar relações entre a oclusão do funículo espermático, o fluxo sangüíneo e as lesões testiculares resultantes (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997).

##### 5.1.1.1 Linhagem dos ratos

O rato é o modelo animal mais utilizado na avaliação da torção do funículo espermático. Várias linhagens foram utilizadas, incluindo *Long-Evans*, *Sprague-Dawley* e *Wistar*. Utilizou-se neste estudo ratos da linhagem *Wistar* por se tratar de modelo animal amplamente empregado em experimentos de torção do funículo

espermático, mais barato que outros modelos animais, de fácil manipulação e condições de confinamento e com volume testicular similar a outros modelos animais maiores.

#### 5.1.1.2 Idade dos ratos

Ratos com idade inferior a 35-45 dias são considerados pré-púberes (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; CONSENTINO *et al.*, 1986; SABA *et al.*, 1997; CAN *et al.*, 2004) enquanto ratos com idade superior a 120-150 dias são considerados adultos (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; ALTAY *et al.*, 2001). Ratos pré-púberes não apresentam espermatogênese completa. A espermatogênese normal ocorre somente em ratos com mais de 45 dias ou 130 gramas de peso (OETTLÉ; HARRISON, 1952; CONSENTINO *et al.*, 1986; BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997). Além disso, existem diferenças hormonais, metabólicas e vasomotoras (DAMBER; BERGH; WIDMARK, 1990; SABA *et al.*, 1997) relacionadas a idade do rato que podem ser parcialmente responsáveis pelos resultados conflitantes relatados na literatura. Alguns estudos incluíram em seu projeto ratos com uma grande variabilidade de peso (OETTLÉ; HARRISON, 1952; PALMER *et al.*, 1997), sem especificar sua idade. Nesses estudos, podem ter sido utilizados ratos pré-púberes e adultos, concomitantemente. Para evitar esses conflitos, todos os ratos utilizados no presente estudo tinham idade entre 70 e 90 dias e peso entre 200 e 350 gramas.

#### 5.1.2 Técnica cirúrgica

##### 5.1.2.1 Incisão cirúrgica

A abordagem do testículo foi realizada em diversos estudos por incisão abdominal mediana baixa (OETTLÉ; HARRISON, 1952; TURNER, 1985; MOGILNER *et al.*, 2006; BEHESHTIAN *et al.*, 2008), incisão paramediana (SABA *et al.*, 1997), incisão abdominoescrotal (ANDIRAN *et al.*, 2000), incisão ilioinguinal (SILVA *et al.*, 2005; ÇAY *et al.*, 2006; PAYABVASH *et al.*, 2008) ou incisão escrotal (CONSENTINO *et al.*, 1986; BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; GUIMARÃES

*et al.*, 2007; ERGUR *et al.*, 2008). Optou-se pelo acesso transescrotal no presente estudo por se tratar de acesso rápido para o testículo, com menor risco de morbidade por preservar a cavidade peritoneal íntegra.

#### 5.1.2.2 Secção do gubernáculo testicular

O gubernáculo é a estrutura embrionária que auxilia na migração caudal do testículo e na fixação testicular ao escroto. Previamente à torção do funículo espermático, alguns autores realizaram a secção do gubernáculo para permitir maior mobilidade testicular (TURNER; BROWN, 1993; BOZLU *et al.*, 2004; BEHESHTIAN *et al.*, 2008). Realizou-se a secção do gubernáculo neste estudo para evitar circulação colateral e permitir maior mobilidade testicular para a torção de 1080 graus.

#### 5.1.2.3 Torção exclusiva do testículo

Alguns autores liberaram o epidídimo através da secção das aderências epidídimo-testiculares, permitindo torção isolada do testículo (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; SABA *et al.*, 1997; KOC *et al.*, 2005). Nesses estudos, que avaliaram o efeito da torção testicular sobre o testículo contralateral, a liberação do epidídimo foi realizada com a finalidade de isolar o testículo como fonte exclusiva de qualquer potencial efeito contralateral. No presente trabalho, a torção do testículo foi realizada em conjunto com o epidídimo, semelhantemente ao que ocorre clinicamente em humanos.

#### 5.1.2.4 Oclusão do funículo espermático

Dois modelos têm sido tradicionalmente utilizados no estudo da oclusão do funículo espermático, incluindo a torção de 720 graus e o clampeamento transversal, ou ligadura, dos elementos do funículo. Consentino *et al.* (1986) e Palmer, Plzak e Cromie (1997) mostraram, no entanto, que a torção do funículo e o seu clampeamento produzem efeitos fisiológicos distintos, tornando difícil a interpretação dos resultados e a reprodutibilidade por outros estudos. Além disso, Palmer, Plzak e

Cromie (1997) mostraram que, enquanto o clampeamento do funículo espermático reduz o fluxo sanguíneo em 81,6%, a torção do funículo resulta em redução de apenas 61,7%.

Apesar do clampeamento do funículo espermático ser o modelo mais preciso de oclusão completa da circulação testicular, utilizou-se a torção do funículo no presente estudo pois ela simula experimentalmente a fisiopatologia da torção testicular em humanos, com oclusão inicial do retorno venoso mas não das artérias, edema, ruptura vascular com hemorragia intersticial, isquemia generalizada e, finalmente, infarto testicular (CONSENTINO *et al.*, 1986; GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002).

#### 5.1.2.5 Grau de torção do funículo espermático

Existem discrepâncias nos resultados quanto ao grau de torção do funículo espermático necessário para produzir lesão testicular. Estudos avaliando o fluxo sanguíneo após torção de 720 graus mostraram redução no fluxo variando entre 61,7% e 100% (UNLÜER; ERCAN; AKDAS, 1984; TURNER, 1985; TURNER; BROWN, 1993; BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; PALMER; PLZAK; CROMIE, 1997).

A Doppler fluxometria a *laser* é a melhor técnica para se mensurar o fluxo sanguíneo testicular, pois permite mensuração contínua do fluxo sanguíneo microvascular, enquanto a maioria dos outros métodos descritos fornece determinação estática, em períodos de tempo predeterminados, de vasos sanguíneos mais calibrosos (BECKER; PRILLAMAN; TURNER, 1997; PALMER; PLZAK; CROMIE, 1997). Utilizando essa técnica, Becker, Prillaman e Turner (1997) mostraram que a perfusão de testículos de ratos submetidos a torção de 720 graus virtualmente eliminou o fluxo sanguíneo durante o período de torção, reduzindo-o para 8% dos valores controles.

Turner (1985) relatou oclusão completa do fluxo sanguíneo testicular (0% de fluxo residual) utilizando técnica com microesferas radioativas. Posteriormente, utilizando a mesma técnica, Turner e Brown (1993) relataram valores residuais de fluxo sanguíneo de 3% a 4%.

No entanto, Unlüer, Ercan e Akdas (1984) observaram reduções mais brandas do fluxo sanguíneo após torção de 720 graus, com fluxo residual variando entre 8% e 16%, através do *clearance* de xenônio-133. Semelhantemente, Palmer, Plzak e Cromie (1997), utilizando Doppler fluxometria a *laser*, mostraram valores de fluxo sanguíneo residual de 38,3% com o mesmo grau de torção, sugerindo que a torção de 720 graus não é um modelo preciso de isquemia testicular. Apesar da torção experimental de 720 graus poder restringir acentuadamente o fluxo sanguíneo testicular, existe variação na quantidade absoluta de fluxo sanguíneo persistente para o testículo (TURNER; BROWN, 1993).

Utilizando-se 1080 graus de torção do funículo espermático, os resultados do presente estudo não evidenciaram taxas significativas de necrose testicular imediatamente após o período de torção. Esses resultados sugerem que mesmo a intensidade de torção de 1080 graus pode apresentar fluxo sanguíneo testicular residual. A presença de fluxo sanguíneo residual sugerida pelo presente trabalho e quantificada por outros estudos pode ser parcialmente explicada pela anatomia dos ratos. O canal inguinal do rato tem continuidade com a cavidade abdominal, e o testículo é impedido de retornar à cavidade abdominal apenas em função da existência de um tampão de gordura supra-epididimário (FERREIRA *et al.*, 2000). Essa relativa frouxidão do funículo espermático e do testículo pode permitir que a torção imposta ao testículo se disperse ao longo do trajeto do funículo até a cavidade abdominal, permitindo maiores valores de fluxo sanguíneo residual do que nos animais em que esses elementos são fixos às demais camadas da bolsa. Dessa maneira, graus maiores de torção seriam necessários para reduzir o fluxo sanguíneo aos níveis obtidos pelo clampeamento/ligadura do funículo.

#### 5.1.2.6 Tempo de isquemia testicular

Os resultados são conflitantes quanto ao período de tempo crítico para se detectar lesões testiculares após a torção do funículo espermático. Com a torção de 720 graus do funículo espermático, foram descritas lesões isquêmicas ipsilaterais após períodos de uma hora (TURNER; BROWN, 1993; GUIMARÃES; VASCONCELOS, 2002; BEHESHTIAN *et al.*, 2008; PAYABVASH *et al.*, 2008), duas horas (PRILLAMAN; TURNER, 1997; BOZLU *et al.*, 2004; ERGUR *et al.*, 2008), três

horas (GUIMARÃES *et al.*, 2007), quatro horas (PALMER *et al.*, 1997; OZKURKCUGIL *et al.*, 2004), cinco horas (ÇAY *et al.*, 2006), seis horas (GEZICI *et al.*, 2006) e oito horas (NGUYEN *et al.*, 1999). A maioria dos trabalhos mostrou lesão testicular com período de torção variando entre uma e quatro horas.

Como graus de torção maiores levam ao início mais rápido de isquemia (RINGDAHL; TEAGUE, 2006), empregou-se no presente estudo períodos de isquemia de uma, duas e quatro horas. O tempo necessário para causar lesão isquêmica testicular depende, no entanto, dos métodos utilizados para se determinar a lesão testicular. Métodos mais sensíveis podem potencialmente detectar lesões testiculares com menor tempo de torção.

### 5.1.3 Método de avaliação da lesão testicular

Os espécimes histológicos podem ser julgados como “normal” ou “anormal” (TURNER, 1985; TURNER; BROWN, 1993). De maneira análoga, Silva *et al.* (2005) avaliaram a presença ou ausência de lesão nos túbulos seminíferos e/ou no seu conteúdo, ou seja, nas células espermatozóides, células de Sertoli, células de Leydig e membrana basal dos túbulos. No presente estudo, utilizou-se critério semelhante para se avaliar a lesão testicular ipsilateral, investigando-se a presença ou ausência de necrose e atrofia testiculares.

Necrose e atrofia são o resultado final da isquemia tecidual causada por trombose, embolia ou obstrução mecânica. Na prática clínica, testículos necróticos têm indicação de orquiectomia para evitar lesão testicular contralateral, com potencial redução na fertilidade, e risco de neoplasia associada à atrofia testicular (KRARUP, 1978; BARTSCH *et al.*, 1980; CHILVERS; PIKE; PECKHAM, 1987; FERREIRA *et al.*, 1991). Nossos resultados mostraram que a isquemia resultante da torção de 1080 graus do funículo espermático foi insuficiente para causar necrose testicular após intervalos de tempo de uma, duas ou quatro horas, sugerindo viabilidade dos testículos. Em humanos, esses testículos seriam candidatos à preservação através da destorção cirúrgica e orquidopexia (JESUS, 2000). Após 60 dias de reperfusão, no entanto, ocorreram necrose e atrofia testiculares em 33,3% dos ratos, com incidência diretamente proporcional aos períodos de tempo de isquemia testicular. Os animais submetidos a uma, duas e quatro horas de isquemia,



seguidos por 60 dias de reperfusão, apresentaram 16,7%, 33,3% e 50% de necrose e atrofia testiculares, respectivamente. Esses resultados sugerem progressão de lesões isquêmicas não identificadas pelos métodos morfológicos utilizados no presente estudo ou o desenvolvimento de novas lesões pelo fenômeno isquemia/reperfusão. Assim, pode-se inferir que a ausência de necrose testicular durante o procedimento de destorção cirúrgica não deve ser considerada sinal inequívoco de viabilidade testicular em longo prazo.

Os métodos mais sensíveis para se avaliar a lesão isquêmica testicular são os indicadores de apoptose específica das células germinativas, que utilizam técnicas enzimáticas, imunohistoquímicas e citometria de fluxo para avaliação quantitativa e qualitativa do DNA (ANDIRAN *et al.*, 2000), seguidos dos indicadores bioquímicos e indicadores morfológicos.

#### 5.1.4 Tempo de avaliação das lesões testiculares

As lesões testiculares resultantes da torção do funículo espermático só podem ser consideradas definitivas se forem avaliadas após um ciclo espermatogênico completo. Todos os trabalhos que avaliaram lesões testiculares em período de tempo inferior a duração de um ciclo espermatogênico completo, que varia nas diferentes espécies animais, observaram apenas as lesões agudas e potencialmente reversíveis com o início de um novo ciclo (FERREIRA *et al.*, 2000).

Considerando-se que o tempo de duração de um ciclo espermatogênico em ratos da linhagem *Wistar* é de 56 dias (ALMEIDA *et al.*, 2000), o período de tempo utilizado no presente estudo permite afirmar que as lesões testiculares encontradas 60 dias após a reperfusão (Grupo B) refletem com segurança o resultado tardio da torção de 1080 graus do funículo espermático.

#### 5.1.5 Limitações do estudo

##### 5.1.5.1 Sensibilidade do método de avaliação da lesão testicular

Necrose e atrofia testiculares são o resultado final e irreversível da isquemia tecidual. No entanto, são indicadores tardios e pouco sensíveis da lesão isquêmica

testicular. A presença de necrose e atrofia testiculares em todos os subgrupos submetidos a 60 dias de reperfusão (B-T1, B-T2 e B-T4) sugere a presença de lesões isquêmicas potencialmente irreversíveis com a torção de 1080 graus do funículo espermático, mesmo no subgrupo de ratos com uma hora de isquemia (B-T1). Novas pesquisas com indicadores mais sensíveis de lesão testicular são necessárias, no entanto, para determinar o momento preciso além do qual as alterações testiculares tornam-se irreversíveis.

#### 5.1.5.2 Tamanho da amostra

Embora o subgrupo de ratos operados após quatro horas de torção (B-T4) apresentou tendência à maior incidência de necrose e atrofia testiculares, não houve diferença significativa entre os diferentes subgrupos de ratos (B-T1, B-T2 e B-T4) e o grupo controle. Uma amostra maior de animais poderia resultar em achados estatisticamente significativos.

## 5.2 PERSPECTIVAS

Baseadas no modelo experimental proposto pelo presente trabalho, novas investigações podem ser realizadas.

Pode-se quantificar o grau de comprometimento do fluxo sanguíneo testicular com a torção de 1080 graus do funículo espermático através de arteriografia, Doppler fluxometria ou outros métodos. A torção de 1080 graus do funículo pode também ser comparada à torção de 720 graus ou ao clampeamento/ligadura do funículo espermático.

Novos estudos podem ser realizados para avaliar os efeitos da isquemia/reperfusão testicular através de vários indicadores de lesão testicular, bioquímicos, morfológicos ou imunohistoquímicos. Pode-se estabelecer o ponto de falha de reperfusão, isto é, o tempo de isquemia após o qual o dano tecidual é tão grave que a reperfusão não vai mais ser efetiva.

Agentes farmacológicos utilizados com objetivo de reduzir os efeitos do estresse oxidativo em outros modelos conhecidos de isquemia/reperfusão, tais como cerebral, espinhal, esquelético, hepático, mesentérico, miocárdico, pulmonar e renal,

podem ser utilizados com este modelo de torção do funículo espermático para avaliar seus mecanismos e efeitos sobre o tecido testicular.

Pode-se ainda realizar estudos para avaliar os efeitos da torção sobre o testículo contralateral, com ênfase sobre a fisiopatologia e prevenção de possíveis lesões contralaterais.

## 6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos com a amostra utilizada no presente estudo, pode-se concluir que:

1) A isquemia testicular resultante da torção de 1080 graus do funículo espermático causa necrose testicular em apenas 5,5% dos testículos avaliados imediatamente após uma a quatro horas de torção.

2) Não há diferença na taxa de necrose testicular independentemente do período de isquemia – uma, duas ou quatro horas – a que os ratos são submetidos.

3) A isquemia/reperfusão testicular resultante da operação de destorção do funículo espermático produz necrose e atrofia testiculares em 33,3% dos testículos.

4) A taxa de necrose e atrofia testiculares após a operação de destorção (isquemia/reperfusão testicular) é semelhante independentemente do período de isquemia a que os ratos são submetidos – uma, duas ou quatro horas. No entanto, há uma tendência à maior incidência de necrose e atrofia testiculares após a operação de destorção com quatro horas de torção do funículo espermático.

5) A isquemia/reperfusão testicular resultante da operação de destorção do funículo espermático produz maior taxa de necrose testicular do que a isquemia testicular causada pela torção de 1080 graus do funículo espermático.

## REFERÊNCIAS

- AL-SALEM, A. H. Intratesticular testicular torsion: a surgical emergency. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 42, n. 11, p. 1887-1891, 2007.
- ALMEIDA, L. M. *et al.* Histological quantification of spermatogenesis in dimethyl sulfoxide treated *Wistar* rats. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 5, p. 129-135, 2000.
- ALTAY, B. *et al.* Histopathological examination of both ipsilateral and contralateral testes with different obstructive models in prepubertal and adult rats. **British Journal of Urology International**, London, v. 88, n. 1, p. 84-89, 2001.
- ANDERSON, J. B.; WILLIAMSON, R. C. The fate of the human testes following unilateral torsion of the spermatic cord. **British Journal of Urology**, London, v. 58, n. 6, p. 698-704, 1986.
- ANDIRAN, F. *et al.* Do experimentally induced ipsilateral testicular torsion, vas deferens obstruction, intra-abdominal testis or venous obstruction damage the contralateral testis through a common mechanism? **British Journal of Urology International**, London, v. 85, n. 3, p. 330-335, 2000.
- BARTSCH, G. *et al.* Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 124, n. 3, p. 375-378, 1980.
- BECKER, E. J.; PRILLAMAN, H. M.; TURNER, T. T. Microvascular blood flow is altered after repair of testicular torsion in the rat. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 157, n. 4, p. 1493-1498, 1997.
- BEHESHTIAN, A. *et al.* Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. **World Journal of Urology**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 197-202, 2008.
- BOZLU, M. *et al.* Inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase decreases long-term histologic damage in testicular ischemia-reperfusion injury. **Urology**, New York, v. 63, n. 4, p. 791-795, 2004.
- CAN, C. *et al.* Protective effect of vasoactive intestinal peptide on testicular torsion-detorsion injury: association with heparin-containing mast cells. **Urology**, New York, v. 63, n. 1, p. 195-200, 2004.
- ÇAY, A. *et al.* The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 131, n. 2, p. 199-203, 2006.
- CHAKRABORTY, J.; SINHA HIKIM, A. P.; JHUNJHUNWALA, J. Effect of experimental torsion of the spermatic cord on sustentacular in the guinea-pig testis. **Acta Anatomica**, Basel, v. 124, n. 3-4, p. 234-240, 1985.

CHARLES, J. C. The fate of the retractile testis. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 171, n. 3, p. 1237, 2004.

CHILVERS, C. E.; PIKE, M. C.; PECKHAM, M. J. Torsion of the testis: a new risk factor for testicular cancer. **British Journal of Cancer**, London, v. 55, n. 1, p. 105-106, 1987.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Rio de Janeiro, 1999.

CONSENTINO, M. J. *et al.* Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 7, n. 1, p. 23-31, 1986.

DAMBER, J. E.; BERGH, A.; WIDMARK, A. Age related differences in testicular microcirculation. **International Journal of Andrology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 197-206, 1990.

ERGUR, B. U. *et al.* Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 43, n. 4, p. 722-728, 2008.

FERREIRA, U. *et al.* Comparative study of the fertility potential of men with only one testis. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, Stockholm, v. 25, n. 4, p. 255-259, 1991.

FERREIRA, A. L. *et al.* Ischemic lesions of the dog's testicle caused by garroting the spermatic cord. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 841-845, 2000.

GEZICI, A. *et al.* Effects of gabexate mesilate on ischemia-reperfusion-induced testicular injury in rats. **Pediatric Surgery International**, Berlin, v. 22, n. 5, p. 435-441, 2006.

GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. In vivo acute changes in ATP and glucose concentrations in the testicles of prepubertal rats following unilateral torsion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 110-115, 2002.

GUIMARÃES, S. B. *et al.* Protective effect of alpha-lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. **Nutrition**, New York, v. 23, n. 1, p. 76-80, 2007.

JESUS, L. E. Acute scrotum. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 271-278, 2000.

KEHINDE, E. O. *et al.* Significance of determining the point of reperfusion failure in experimental torsion of testis. **International Journal of Urology**, Tokio, v. 12, n. 1, p. 81-89, 2005.

KOC, A. *et al.* The protective role of erdosteine on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Netherlands, v. 280, n. 1-2, p. 193-199, 2005.

KRARUP, T. The testes after torsion. **British Journal of Urology**, London, v. 50, n. 1, p. 43-46, 1978.

MAATZ, R. Anatomic changes following temporary circulatory strangulation of the testis. **Centralbl F Allg Path U Path Anat**, Jena, v. 59, p. 243-249, 1934.

MANSBACH, J. M.; FORBES, P.; PETERS, C. Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, Chicago, v. 159, n. 12, p. 1167-1171, 2005.

MATTESON, J. R. *et al.* Medicolegal aspects of testicular torsion. **Urology**, New York, v. 57, n. 4, p. 783-786, 2001.

MERNAGH, J. R.; CACO, C.; DE MARIA, J. Testicular torsion revisited. **Current Problems in Diagnostic Radiology**, New York, v. 33, n. 2, p. 60-73, 2004.

MOGILNER, J. G. *et al.* Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. **Pediatric Surgery International**, Berlin, v. 22, n. 1, p. 99-105, 2006.

NGUYEN, L. *et al.* Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 34, n. 5, p. 680-683, 1999.

Nomina Anatomica Veterinaria, Barcelona, 1975.

NÖSKE, H. *et al.* Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 159, n. 1, p. 13-16, 1998.

OETTLÉ, A. G.; HARRISON, R. G. The histological changes produced in the rat testis by temporary and permanent occlusion of the testicular artery. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Chichester, v. 64, n. 2, p. 273-297, 1952.

OZKURKCUGIL, C. *et al.* Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. **British Journal of Urology International**, London, v. 93, n. 7, p. 1094-1097, 2004.

PALMER, J. S.; PLZAK, L. F.; CROMIE, W. J. Comparison of blood flow and histological changes in rat models of testicular ischemia. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 158, n. 3, pt. 2, p. 1138-1140, 1997.

PALMER, J. S. *et al.* A platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 158, n. 3, pt. 2, p. 1186-1190, 1997.

PAYABVASH, S. *et al.* Ethyl pyruvate reduces germ cell-specific apoptosis and oxidative stress in rat model of testicular torsion/detorsion. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v. 43, n. 4, p. 705-712.

PEROTTI, M. *et al.* Medical malpractice in urology, 1985 to 2004: 469 consecutive cases closed with indemnity payment. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 176, n. 5, p. 2154-2157, 2006.

PRILLAMAN, H. M.; TURNER, T. T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 157, n. 1, p. 340-345, 1997.

PROPHET, E.B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Washington, D.C. American Registry of Pathology, 1994.

RINGDAHL, E.; TEAGUE, L. Testicular torsion. **American Family Physician**, Leewood, v. 74, n. 10, p. 1739-1743, 2006.

SABA, M. *et al.* Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 157, n. 3, p. 1149-1154, 1997.

SALMASI, A. H. *et al.* Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: experimental study in testicular torsion rat model. **Urology**, New York, v. 66, n. 6, p. 1338-1342, 2005.

SESSIONS, A. E. *et al.* Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 169, n. 2, p. 663-665, 2003.

SILVA, A. C. *et al.* Effect of allopurinol on rat testicles morphology, submitted to ischaemia for spermatic cord torsion followed by reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 468-472, 2005.

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. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 104, n. 4, p. 604-607, 1970.

STEINBERGER, E.; TJIOE, D. Y. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. **Fertility and Sterility**, Los Angeles, v. 20, n. 4, p. 639-649, 1969.

TURNER, T. T. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 6, n. 1, p. 65-72, 1985.

TURNER, T. T.; BROWN, K. J. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. **Biology of Reproduction**, Cambridge, v. 49, n. 2, p. 401-407, 1993.

TURNER, T. T.; BANG, H. J.; LYSIAK, J. J. Experimental testicular torsion: reperfusion blood flow and subsequent testicular venous plasma testosterone concentrations. **Urology**, New York, v. 65, n. 2, p. 390-394, 2005.

UNLÜER, S. E.; ERCAN, M. T.; AKDAS, A. Testicular blood flow in experimental torsion and epididymo-orchitis measured by <sup>133</sup>Xe clearance technique in rabbits. **Urological Research**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 183-186, 1984.

VISSER, A. J.; HEYNS, C. F. Testicular function after torsion of the spermatic cord. **British Journal of Urology International**, London, v. 92, n. 3, p. 200-203, 2003.

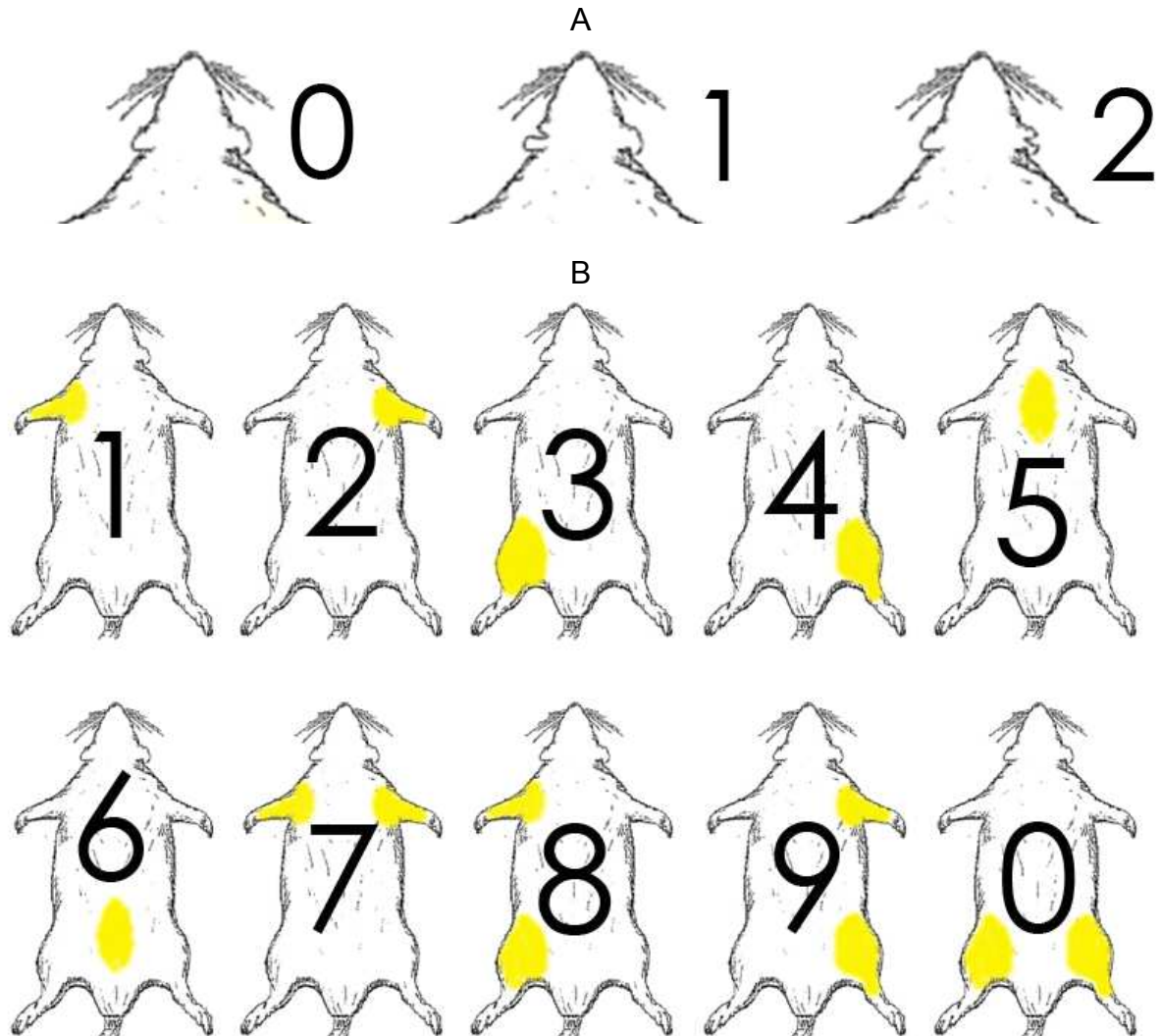
WAYNFORTH, H.B.; FLECKNELL, P.A. **Experimental and surgical technique in the rat**. 2. Ed. San Diego: Academic Press, 1992.

WILLIAMSON, R. C. Torsion of the testis and allied conditions. **British Journal of Surgery**, London, v. 63, n. 6, p. 465-476, 1976.



## APÊNDICE

## APÊNDICE 1 – IDENTIFICAÇÃO DOS RATOS



**ANEXOS**

ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

*Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade  
Evangélica Beneficente de Curitiba*

*Rua Padre Anchieta, 2770  
80730-000 Curitiba – PR  
Fone: 41 240-5612  
Fax: 41 240-5517*

---

Curitiba, 31 de março de 2006.

Frederico Ramalho Romero

Prezados Colegas,

Comunicamos a V. Sa. que, em reunião ordinária do dia 30 de março de 2006, o projeto de pesquisa intitulado “**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HOMOLATERAIS E CONTRALATERAIS APÓS TORÇÃO TESTICULAR EM RATOS**”, protocolado neste comitê sob número 1300/06 em 15 de março de 2006, recebeu o seguinte parecer consubstanciado: **APROVADO**.

Prevê a legislação que toda a documentação do projeto poderá, a qualquer momento, ser solicitada para inspeção por parte dos órgãos federais; desta forma, manterá o Comitê arquivo detalhado de cada projeto, arquivando em pasta individual o projeto inicial e relatórios de acompanhamento.

Para o projeto de V. Sa., solicitamos que dê ciência aos seus colaboradores da obrigação de, a cada seis meses a partir da data de hoje, encaminhar a este comitê relatório detalhado do andamento do projeto.

**Relatórios previstos para: 20/09/2006.**

Atenciosamente,

**Carmen Paredes Marcondes Ribas**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

CEP/CARMO/30-03-2008

## ANEXOS

### ANEXO 2 – COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)

#### Técnica:

- 1) Lavar em água corrente;
- 2) Corar em solução de hematoxilina de Harris por 50 segundos;
- 3) Lavar em água corrente;
- 4) Água amoniacal;
- 5) Corar em solução de eosina;
- 6) Lavar, desidratar, diafanizar e montar.

#### Soluções:

##### Hematoxilina de Harris:

- Hematoxilina - 5g;
- Álcool etílico - 50ml;
- Alúmen de potássio - 100g;
- Água destilada - 950ml;
- Óxido de mercúrio - 2,5g;
- Ácido acético glacial - 40ml.

Dissolver a hematoxilina no álcool levemente aquecido (56°C) em banho-maria, dissolver o alúmen de potássio em água destilada aquecida em chama, acrescentar a solução alcoólica de hematoxilina e deixar ferver. Adicionar o óxido de mercúrio e então o ácido acético. Filtrar.