

La torsión del cordón espermático en ratas prepuberales y sus efectos seminales en el testículo contralateral

Dres. V. Ortiz, E.J. Araujo

Disciplina de Técnica Operatoria y Cirugía Experimental de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP-EPM), Laboratorio de Técnica Operatoria y Cirugía Experimental de la Universidad de Santa Catarina y Servicio de Cirugía del Hospital Infantil Joana de Gusmão. Florianópolis, SC, Brasil.

Resumen

Es muy discutido el efecto que produce la torsión del cordón espermático en el testículo contralateral y la influencia del testículo isquémico. Sus efectos fueron estudiados en animales adultos. En los seres humanos su frecuencia es mayor en la infancia y adolescencia.

Se realizó un estudio del testículo contralateral en ratas prepuberales sometidas a la torsión del cordón espermático, conservando o no el testículo torcido. Fueron utilizadas 120 ratas Wistar de 35 días, divididas en 3 grupos: Anestesia, Simulado y Torsión. La evaluación fue hecha a los 70 y 105 días de vida, investigándose el peso testicular, la motilidad y concentración de los espermatozoides. El semen de la rata fue obtenido por la microaspiración del tubulo seminifero en la cola del epididimo, modificación hecha por los autores de la técnica de micropunción del conducto. Se observó que la motilidad de los espermatozoides disminuyó en las ratas mayores cuando se mantuvo el testículo torcido. La concentración fue siempre superior en los animales con edad de 105 días, sin cambios significativos cuando el testículo torcido fue extirpado. El peso testicular no demostró diferencia relacionada a los diferentes procedimientos o edades. La evaluación de estos animales jóvenes de 70 días no es recomendable pues no alcanza la madurez sexual completa. La obtención del esperma del túbulo seminífero a través de la microaspiración permitió evaluar el potencial reproductivo de la rata, de acuerdo con los parámetros seminales estudiados.*

Palabras clave: Torsión del cordón espermático - Testículo - Semen

Summary

There has been much controversy regarding the effect of spermatic cord torsion and its effects on the contralateral testis. This effects have been studied in adult animals. In humans its frequency is greater during infancy and adolescence. We studied the changes in the

contralateral testis after spermatic cord torsion in prepubertal rats while keeping the ischemic testis. On-hundred and twenty Wistar rats, 35 days old, were divided in three groups: anesthesia, sham and torsion. Evaluation of the contralateral testis occurred between day 70 and 105 of life, measuring testicular weight, motility and concentration of spermatozoids. Rat semen was obtained by micro-aspiration of the seminiferous tubules at the end of the epididymis, a modification created by the authors. The motility of the spermatozoids decreased in mature rats when the ischemic testis was not resected. Spermatozoid concentration was always higher in rats above 105 days without significant changes after removal of the ischemic testis. Testicular weight showed no change related to the different procedures or age of the rat. Evaluation of young animals around 70 days old is not justified as they have not achieved complete sexual maturity. Our techniques of sperm micro-aspiration permits evaluate the reproductive potential of the rat.

Index words: spermatic cord torsion - testes - semen

*N del T: esta palabra no está usada en el sentido habitual y familiar del término. A lo largo del texto debe entenderse como el resultado de una torsión

Resumo

A torção do cordão espermático é muito discutida principalmente quanto ao seu efeito contralateral e à influência do testículo isquêmico. Tem sido bastante estudada em animais adultos embora, no homem, incida mais na infância e adolescência. Por isso foi estudado o testículo contralateral de ratos pré-puberis submetidos à torção do cordão espermático, mantendo-se ou não o testículo torcido. Foram utilizados 120 ratos Wistar, com idade de 35 dias, divididos em 3 grupos: Anestesia, Simulado e Torção. A avaliação foi feita aos 70 ou 105 dias de vida, estudando-se o peso testicular, a motilidade e a concentração dos espermatozoides. O sêmen do rato foi obtido pela microaspiração do túbulo seminífero na cauda do epidídimo, uma modificação, pelos autores, da técnica de micropunção do ducto. A motilidade dos espermatozoides diminuiu nos animais maduros quando o testículo torcido foi mantido. A concentração de espermatozoides foi sempre superior nos animais com idade de 105 dias, embora não tenha sido significativa quando o testículo torcido foi retirado. O peso do testículo não mostrou diferença em relação ao procedimento ou às diferentes idades. A avaliação desses animais em idades jovens, de aproximadamente 70 dias, não é recomendável pois não representa a sua maturidade sexual completa. A obtenção de esperma do túbulo seminífero através da microaspiração permitiu avaliar o potencial reprodutivo do rato, de acordo com os parâmetros seminais estudados.

Palavras chave: Torção do cordão espermático - Testículos - Sêmen.

Introducción

La torsión del cordón espermático (TCE) fue descrita inicialmente por Delasiauve¹, en 1840. Desde entonces el trabajo de mayor impacto sobre el tema fue el de Krarup², que estudió a 19 hombres que habían sufrido TCE unilateral, con espermogramas que demostraron anomalías en 18, quienes como consecuencia presentaron infertilidad. Tres hipótesis tratan de explicar el daño de la función testicular luego de una torsión unilateral: a) lesiones isquémicas en ambos testículos por torsión previa³, b) ambos testículos tendrían defectos previos que condicionarían la torsión², y c) la torsión unilateral podría afectar al testículo contralateral⁴.

Harrison y Oettlé⁵ fueron quienes primero demostraron en ratas el efecto de la isquemia transitoria del testículo sobre las células espermátogénicas. La mayoría de los trabajos se realizaron en ratas adultas, pero en seres humanos la TCE es más frecuente en la infancia y adolescencia^{6,7}. El primer trabajo en ratas prepúberes fue realizado por Cosentino y col.⁸. Hay divergencias en las investigaciones sobre TCE en ratas prepúberes y la repercusión en el testículo contralateral.

Diversos autores^{8,9,10,11,12} observaron repercusión contralateral, al contrario de otros que también estudiaron ratas prepúberes sin observar daño contralateral^{13,14,15,16,17}. El mecanismo de la lesión es desconocido y tampoco está claro si está relacionado con la presencia del testículo torcido. Los trabajos experimentales que demostraron daño del testículo contralateral, sugieren que habría una relación directa con la presencia del testículo isquémico^{9,10,11,12}, pero quienes no demostraron lesión contralateral consideraron innecesaria la orquidectomía, principalmente en jóvenes.

Un hecho relevante de estas investigaciones fue la edad del animal al momento de ser evaluado. Trabajos con animales jóvenes que presentaron daño contralateral, evaluaron ratas en edades más precoces^{8,9,10,12}, en tanto aquellas que no demostraron daño, evaluaron las ratas tardíamente^{14,15,16}. Este estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el testículo contralateral de ratas prepúberes, sometidas a una TCE en 2 edades diferentes y mediante parámetros seminales (motilidad y concentración de espermatozoides) y peso testicular, comparado con la presencia o no del testículo torcido.

Material y método

Se utilizaron 120 ratas albinas machos, de linaje Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mamalia) de 35 días, obtenidas del Bioterio Central de la Universidad Federal de Santa Catarina, divididos en 3 grupos de 40 ratas: Anestesia, Simulado y Torsión.

Fueron mantenidas sólo con agua las 12 horas previas al experimento; las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de 0,002 mg de atropina. Transcurridos 10 minutos se aplicó una inyección intraperitoneal de 0.1 ml de una solución de Ketamina y Xilazina, en proporción de 2:1.

En el grupo Anestesia, los animales fueron sometidos sólo al procedimiento anestésico. En el grupo Simulado, los animales fueron sometidos solo a una vía de acceso al escroto izquierdo. En el grupo Torsión, los animales fueron sometidos a una torsión del cordón espermático izquierdo de 720°, durante 6 horas. Transcurridas 6 horas, la mitad de cada grupo de los animales fue sometida a orquidectomía izquierda (20 de cada grupo). En la mitad del grupo Torsión el testículo izquierdo fue extirpado (n=20) y en la otra mitad, fue destorsionado (n=20).

A la edad de 70 o 105 días los animales fueron sometidos a igual procedimiento anestésico. Inicialmente el hemiescroto izquierdo fue reexplorado para verificar el aspecto macroscópico del testículo. A continuación se accedió al hemiescroto derecho, con exteriorización del testículo, se tomó una muestra de semen para análisis y se pesó el testículo.

La técnica de microaspiración del epidídimo de la rata consistió en utilizar un microscopio quirúrgico De Vasconcelos con aumento de 16X y se realizó una sección transversal completa del túbulo, con aparición de semen. Con el auxilio de una micropipeta con capacidad de 5 microlitros se aspiró el esperma colocándose en 100 microlitros de NaCl al 0,9% mantenido en una temperatura de 37° C.

La motilidad de los espermatozoides fue evaluada entre lámina y lamínula utilizando un microscopio de luz para uso clínico. Los campos fueron rastreados hasta el conteo de cien espermatozoides sucesivos, clasificados en móviles e inmóviles.

La concentración de los espermatozoides fue evaluada en cámara de Makler. Fueron realizados 3 conteos: el primero en 10 cuadrados y multiplicados por

1.000.000; el segundo en 50 cuadrados y multiplicado por 500.000; al tercero en 100 cuadrados y multiplicado por 100.000. Los tres resultados fueron sumados y divididos por 3 obteniéndose una media simple que fue multiplicada por 20, como factor de corrección por la dilución hecha en la micropipeta del túbulo. El peso testicular fue evaluado en relación al peso corporal (peso testicular/peso corporal X 100).

Los animales fueron sacrificados por exanguinación. Los resultados fueron sometidos a los tests estadísticos de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney. Se fijó en 5% el nivel de rechazo de la hipótesis de nulidad ($p < 0,05$).

Resultados

En el grupo de animales en que fue realizada la torsión del cordón espermático (n=40), al segundo procedimiento (6 horas después) el testículo torcido estaba isquémico en 37 (92,5%) y cianótico en 3 (7,5%), no obstante la torsión y fijación. En el momento de la evaluación, entre los 70 y 105 días, la exploración del hemiescroto izquierdo reveló que entre los animales cuyo testículo torcido fue mantenido (n=20), el mismo se encontraba atrófico en 16 ratas (80%) y de aspecto macroscópicamente normal en 4 (20%). Los testículos de aspecto normal en el segundo procedimiento no eran los mismos de apariencia normal al momento de la evaluación. La microscopia reveló que en 3 animales los testículos torcidos estaban apenas congestivos en ocasión del segundo procedimiento y en otros 4 animales sucedió lo contrario: estaban bastante comprometidos cuando se destorsionaron y al evaluarse había una leve hipotrofia. De las 120 ratas, 2 fallecieron y en un tercero la muestra fue dañada.

En lo que se refiere al parámetro seminal motilidad, comparando los grupos de animales torsión con los controles (Fig.1): en los animales de 105 días (adulto maduro) en que el testículo torcido se mantuvo (Tm), la motilidad fue significativamente menor (media de 38% contra 45% y 58%, respectivamente). Al comparar los animales de 70 y 105 días, no hubo diferencias significativas en cuanto a la motilidad de los espermatozoides del testículo contralateral.

Comparando los animales en cuanto a presencia o no de testículo torcido (Fig.2), quedó demostrada una disminución significativa de la motilidad de los espermatozoides del testículo contralateral en las ra-

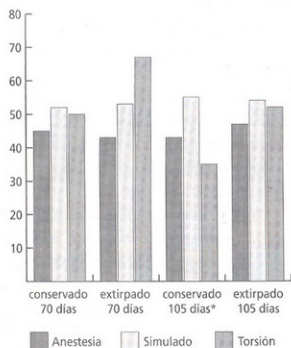


Fig. 1: comparación de la motilidad entre el grupo Torsión y los controles: Anestesia y Simulado. (*) Simulado > torsión.

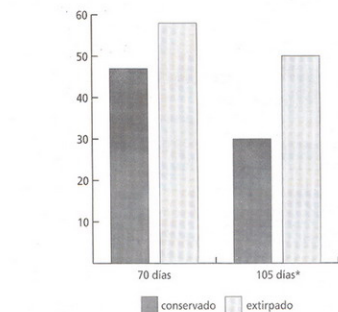
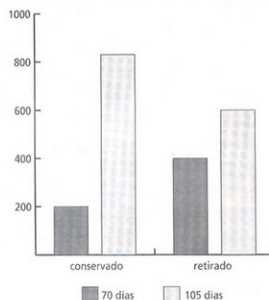
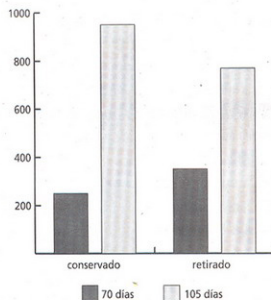
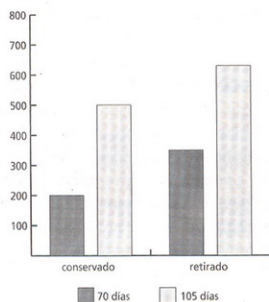


Fig. 2: comparación de la motilidad entre los animales con testículo conservado y extirpado. (*) Conservado < extirpado.

tas de 105 días cuyo testículo torcido fue mantenido en relación a aquellas en que fue extirpado.

En cuanto al parámetro seminal concentración, comparando los animales del grupo torsión con los controles (anestesia y simulación) no hubo diferencia. Comparando los animales de 70 a 105 días en cuanto a la concentración de los espermatozoides del testículo contralateral (Fig.3): todos los animales en

Fig. 3: comparación de la concentración entre los animales con 70 y 105 días. (*) 70 < 105 días.

edad sexualmente madura (105 días) tuvieron concentración superior respecto a los más jóvenes. Este dato aislado no fue significativamente diferente en las ratas de 105 días cuyo testículo torcido fue extirpado. Comparando los animales en cuanto a la presencia o no del testículo torcido, la concentración de espermatozoides no demostró diferencia.

Con referencia al parámetro peso testicular / peso corporal, la comparación entre el grupo torsión y sus controles, en diferentes edades y con o sin permanencia del testículo torcido, no demostraron diferencias significativas.

Discusión

En los estudios experimentales en ratas varía mucho la forma de evaluación del testículo: histología^{8,9,10,14,17}, test de fertilidad^{8,9,10,14,15}, peso testicular¹⁰, dosaje de anticuerpos, dosaje de DNA en las células testiculares como índice de espermatogénesis¹², dosajes hormonales¹⁶, medida de producción diaria de esperma¹⁶ y estudios bioquímicos¹⁷.

Cada tipo de evaluación ofrece ventajas y desventajas. Los métodos histológicos son formas indirectas de evaluar la función testicular, bastante utilizados y también criticados porque siempre quedan dudas en cuanto a si las lesiones celulares observadas son predictivas para la calidad de la producción espermática y la fertilidad del animal, en virtud de la heterogeneidad del tejido testicular. Es imposible saber si estos aspectos, muchos de ellos subjetivos, reflejan realmente la realidad, a diferencia de los métodos cuantitativos^{7,12,21}.

Heindel y col.¹⁰ muestran discrepancia entre un tipo muy común de evaluación histológica (la medida del diámetro de los túbulos seminíferos) y la fertilidad. Kamada y col.¹² no consideran confiables los métodos histológicos como el número de túbulos y la medición del diámetro de los túbulos seminíferos. Ryan y col.²² manifestaron que las evaluaciones histológicas reflejarían en parte la maduración espermática y no una medida de la producción de esperma.

El número de fetos o crías como método de evaluación de la fertilidad del animal y su capacidad reproductora, es cuantitativo y bastante reconocido. También es una forma indirecta de evaluación de la función testicular, que además depende de la in-

fluencia de las hembras. Se utilizan más animales y el estudio requiere más tiempo.

Del mismo modo que se deben uniformar los animales por su edad para estandarizar el experimento y evaluar el tipo de torsión y su duración, también debe elegirse y establecerse una forma de evaluación, que de preferencia sea equivalente para cualquier laboratorio de análisis y que puedan relacionarse con los estudios clínicos.

Ryan y col.²² manifestaron que siendo el testículo una glándula también exócrina, sería mejor evaluarlo midiendo la cantidad y calidad del semen producido, metodología lógica y científica, o recolectando los espermatozoides de la rata lavando el conducto deferente.

Como el parámetro más común de evaluación de la fertilidad del hombre es el espermograma, hay que adecuar los estudios experimentales para establecer la correlación. Con esta idea y partiendo de técnicas originales de micropunción glandular posteriormente desarrolladas para estudiar el contenido de los túbulos seminíferos^{23,24,25,26}, se realizó una microaspiración del esperma de la cola del epidídimo de la rata.

Este estudio se diferencia de los anteriores por haber estudiado la rata en la fase prepuberal, comparando dos edades diferentes en relación a la madurez sexual y en cuanto a la presencia o no de torsión del testículo. La otra diferencia fue el método de evaluación y obtención del material: la función testicular fue evaluada por la motilidad y concentración de los espermatozoides y el semen fue obtenido por microaspiración en la cola del epidídimo.

Es casi unánime la utilización de ratas como modelo experimental de torsión inducida, pero la mayoría de los experimentos son en animales adultos, a pesar que la TCE en humanos predomina debajo de los 16 años^{6,7,18}. Entonces, si la torsión es más frecuente en la infancia y la adolescencia, los experimentos deberían ser realizados en animales jóvenes^{9,12,16}. Antes de 45 días no existen espermatozoides en los túbulos seminíferos de la rata¹⁹ o sea que hasta los 35 días éstas podrían ser comparadas a la etapa prepuber y a la adolescencia humana^{8,9,11,12,16}.

Robb y col.²⁰ evaluaron el testículo y el epidídimo de ratas entre 20 y 125 días de vida, observando que: el crecimiento testicular continúa hasta 100 y 125 días. Las reservas espermáticas en la cola del epidídi-

mo aumentan hasta los 100 días y para ser estudiados en fase sexualmente madura, deben tener más de 100 días para ser considerados adultos.

Según los hallazgos, el aspecto aparentemente normal de un testículo destorsionado no permite asegurar su viabilidad.

El potencial fértil del animal en los casos con repercusión testicular, no se puede establecer sólo con la concentración de espermatozoides; en el subgrupo motilidad se demostró un conteo elevado con disminución de la motilidad.

Turner en 1985, evaluando ratas adultas, utilizó los mismos parámetros y verificó disminución de la motilidad de los espermatozoides sólo en el testículo torcido y no en el contralateral. Merimsky y col.⁶ verificaron disminución no significativa de la motilidad de los espermatozoides, en el testículo contralateral de animales adultos sometidos a ligadura del cordón.

La concentración de espermatozoides superior aunque no significativa solamente en los animales cuyo testículo torcido fue extirpado, da margen a otra duda: ausente el testículo isquémico y siendo la motilidad normal; ¿no es necesario el aumento compensatorio de la concentración de espermatozoides?

Esta mayor concentración de espermatozoides en los animales de 105 días en relación a los de 70 días en prácticamente todos los grupos del experimento, corrobora los hallazgos de Robb y col.²⁰ y evidencia una discordancia con los trabajos que estudian la TCE en ratas prepuberales, evaluándolas al inicio de la madurez sexual. Probablemente muchos daños histológicos en perjuicio de la fertilidad se deben más a la edad del animal que a la torsión del testículo. Queda así demostrado que en las ratas de Wistar una evaluación de la función exócrina testicular no debe ser realizada antes de los 100 días de vida.

Partiendo de este método usado para la obtención de esperma, la función exócrina de uno o de ambos testículos puede ser evaluada, juntas o por separado y el material recogido puede utilizarse para cualquier tipo de test clínico. Es de conocimiento que los parámetros seminales no reflejan fielmente el potencial reproductor del animal, ya que éste depende principalmente de la capacidad fértil del espermatozoides, evaluada con métodos técnicamente más exactos.

Un hallazgo curioso es que los animales adultos

jóvenes presentaron motilidad de los espermatozoides, prácticamente igual a los adultos maduros. La diferencia entre ellos fue más evidente en lo que se refiere a la concentración de los espermatozoides, mayor en las ratas adultas maduras. Impresiona que para la madurez reproductora, la motilidad es más importante que la concentración.

La torsión del cordón espermático, en ratas prepuberales, observados hasta la edad de 70 y 105 días, permitió concluir que no se altera la concentración de espermatozoides del testículo contralateral y disminuye el porcentaje de espermatozoides móviles del testículo contralateral a los 105 días, cuando se conserva el testículo torcido.

Bibliografía

1. Delasiauve LJ-F: Descente tardive du testicule gauche, prise pour une hernie étranglée. Ver Méd Fr Étrangl 1:363-375, 1840.
2. Krarup T: The testes after torsion. Br J Urol 50:43-46, 1978.
3. Anterson JB, Williamson RCN: Fertility after torsion of the spermatic cord. Br J Urol 65: 225-230, 1990.
4. Clermont Y, Perey B: Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am J Anat 100:241-260, 1957.
5. Harrison RG, Oettl AG: Pathologic changes in the rat testis following ischaemia. Proc Soc Study Fertil 2:6-11, 1950.
6. Merimsky E, Rock M, Katz S: Assessment of fertility after testicular torsion: an experimental study. Urol Res 10:51-54, 1982.
7. Turner TT: Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. J Androl 6:65-72, 1985.
8. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR et al: The effect of prepubertal spermatic cord tension on subsequent fertility in rats. J Androl 5:93-98, 1984.
9. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R et al: Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. J Urol 133:906-911, 1985.
10. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN et al: The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. J Urol 144:366-369, 1990.
11. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M et al: Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. J Androl 11:401-408, 1990.
12. Kamada K, Takihara H, Shirataki S et al: Flow cytometric DNA analysis demonstrates contralateral testicular deterioration in experimental unilateral testicular torsion of prepubertal rats. Androl 25:239-244, 1993.

13. Nagler HM, Deitch AD, White R: Testicular torsion: temporal considerations. *Fertil Steril* 42:257-262, 1984.
14. Henderson IV JA, Smey P, Cohen MS et al: The effect of unilateral testicular torsion on the contralateral testicle in prepubertal chinese hamsters. *J Pediatr Surg* 20:592-597, 1985.
15. Hatch D, Alexander N: Immunologic and fertility consequences of spermatic cord torsion. An experimental investigation and review of the literature. *J Urol* 135:190A, 1986.
16. Becker EJ, Turner TT: Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl* 16:342-351, 1995.
17. Saba M, Morales CR, De Lamirande E: Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol* 157:1149-1154, 1997.
18. Robb GW, Amann RP, Killian GJ: Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert* 54:103-107, 1978.
19. Ryan PC, Whelan CA, Fitzpatrick JM: The vas deferens count: a new accurate method for experimental measurement of testicular exocrine function. *Eur Urol* 14:156-159, 1988.
20. Choi H, Choo MS, Kim KM et al: The alterations of cellular metabolism in the contralateral testis following spermatic cord torsion in rats. *J Urol* 150:577-580, 1993.
21. Sakai AT, Srougi M, Cedenho AP et al: Efeitos tardios da torção unilateral do cordão espermático sobre o testículo contralateral: estudo experimental em ratos. *J Bras Urol* 17:174-176, 1991.
22. Tuck RR, Setchell BP, Waites GMH et al: The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflüg Arch* 318:225-243, 1970.
23. Turner TT: On the epididymis and its function. *Invest Urol* 16:311-319, 1979.
24. Wallace DMA, Gunter PA, Landon GV et al: Sympathetic orchipathia - an experimental and clinical study. *Br J Urol* 54:765-768, 1982.
25. Howards SS, Johnson A, Jesse S: Micropuncture and micro-analytic studies of the rat testis and epididymis. *Fert Steril* 26:13-19, 1975.
26. Turner TT, Howards SS: Factors involved in the initiation of sperm motility. *Biol Reprod* 18:571-578, 1978.

Trabajo presentado en el 3° Congreso del CIPESUR, Viña del Mar, Chile, 1998.

Dr. V. Ortiz