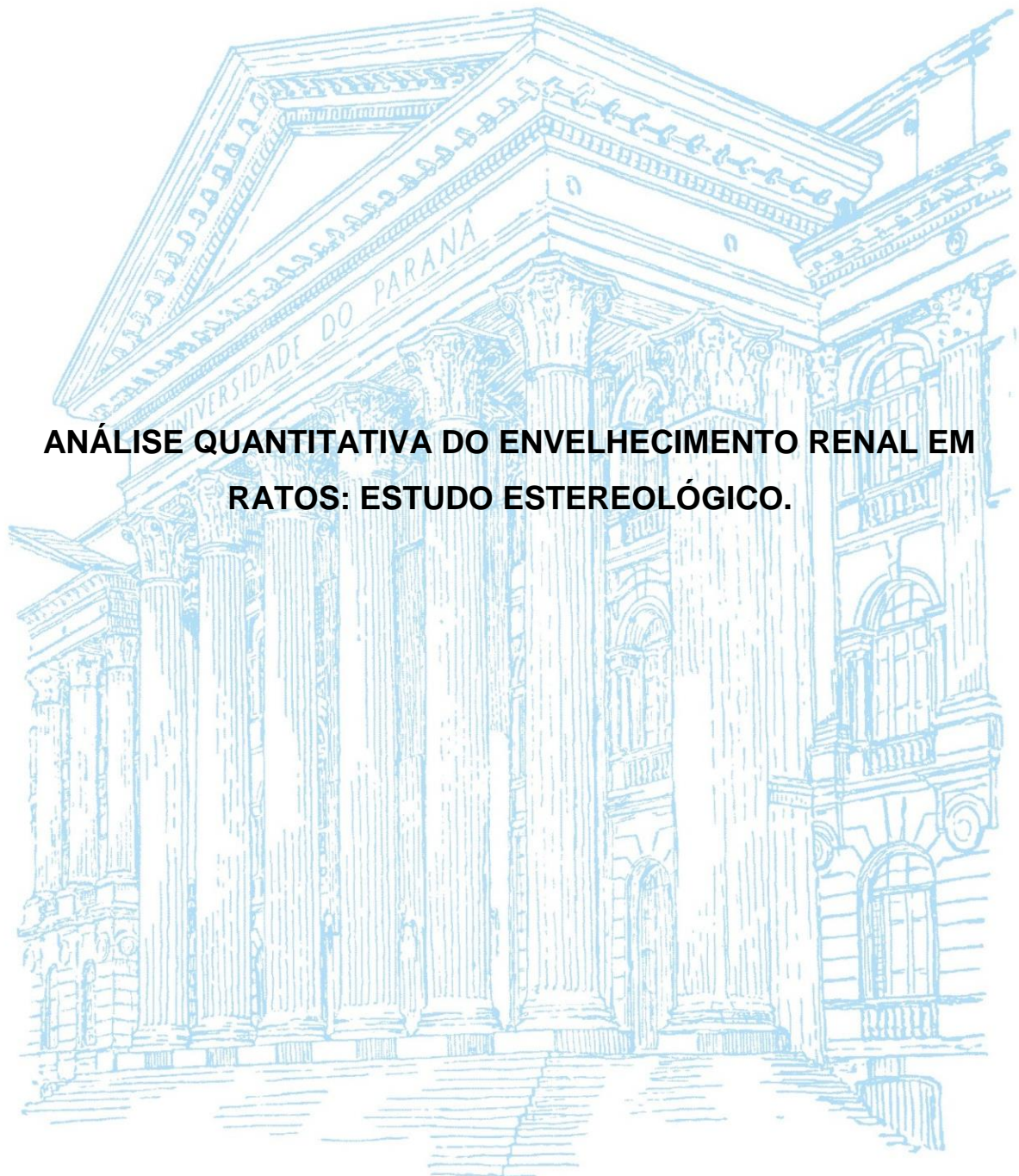


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**EDUARDO FELIPPE MELCHIORETTO**



**ANÁLISE QUANTITATIVA DO ENVELHECIMENTO RENAL EM  
RATOS: ESTUDO ESTEREOLÓGICO.**

**CURITIBA**

**2015**

**EDUARDO FELIPPE MELCHIORETTO**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DO ENVELHECIMENTO RENAL EM  
RATOS: ESTUDO ESTEREOLÓGICO.**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga**

**CURITIBA**

**2015**

Melchiorretto, Eduardo Felipe.

Análise quantitativa do envelhecimento renal em ratos: estudo estereológico / Eduardo Felipe Melchiorretto. – Curitiba, 2015.  
55 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Envelhecimento. 2. Rim. 3. Ratos. 4. Testes de função renal. 5. Histologia. 6. Antropometria. 7. Técnicas histológicas. I. Título. II. Fraga, Rogério de.


NLMC: WO 100



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 415ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Eduardo Felipe Melchiorretto** com o **título** ANÁLISE QUANTITATIVA DO ENVELHECIMENTO RENAL EM RATOS: ESTUDO ESTEROLÓGICO **Linha de Pesquisa** MÉTODOS DE DETECÇÃO PRECOCE E AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS EM AFECÇÕES CIRÚRGICAS **Área de Concentração** Clínica Cirúrgica tendo como orientador Professor Doutor Rogério de Fraga

Às sete horas e trinta minutos do dia oito de maio de dois mil e quinze, no auditório da CAD - sala 701 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes professores doutores Luiz Sergio Santos, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas e Renato Tambara Filho sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor 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 dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação 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 o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa 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 por mim Regina Aparecida Sass Marques secretária desta Pós-Graduação, que será assinada pelos seguintes membros da Banca Examinadora de Avaliação.

  
Luiz Sergio Santos

  
Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

  
Renato Tambara Filho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao amigo e orientador, Prof. Dr. Rogério de Fraga, pelas oportunidades, confiança e incentivo constante que permitiram o desenvolvimento desse projeto. Pela paciência nos momentos difíceis e pelo brilhante espírito motivador que propiciaram acreditar que tudo vai dar certo.

Aos professores da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, pela oportunidade de participar deste programa e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo com que conduz suas atividades no desenvolvimento da pós-graduação na Universidade Federal do Paraná.

Ao professor e amigo, Prof. Dr. Renato Tambara Filho, por acreditar neste projeto, incentivar e auxiliar na conclusão do mesmo. Também pelo compartilhamento de seus inestimáveis conhecimentos e pelo exemplo de professor presente e participativo que motivou ainda mais meu interesse acadêmico.

Agradeço à minha amada esposa Heloisa, pelo amor e carinho imensuráveis, suporte, compreensão e apoio constante. Pelo exemplo de integridade. Meu tesouro e motivo de inspiração para toda vida.

Aos meus pais, Antônio e Dorotéia, pelos exemplos de vida, retidão, carinho e amor. Por terem fornecido toda a base sólida para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Pelo apoio nos momentos difíceis e otimismo inigualável.

A minha irmã Alessandra pela paciência, companheirismo e amor desde o início.

Ao amigo para a vida e colega de profissão, Marcelo Zeni, pelo companheirismo e dedicação conjunta. Pelo parceria constante e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pelo exemplo desde o início de minha formação profissional e incondicional motivação na realização de pesquisas científicas. Pela disponibilização do biotério e apoio irrestrito no cuidados com os animais.

Aos colegas e amigos de residência médica, em especial a Rafael Cavalheiro Cavalli, João Paulo Medeiros Guimarães, Leandro Lages, Paulo Henrique Goulart Fernandes Dias, Bruno Vinicius Duarte Neves, Mateus Cosentino Bellote, Christian Luiz Artner e Eduardo Pereira de Miranda, pelo aprendizado conjunto e momentos de convivência inesquecíveis.

A prof. Dra. Djanira Aparecida da Luz Veronez e ao funcionário Rodrigo Shuch pelo apoio na realização da experimentação animal e pelo auxílio na leitura dos dados estereológicos.

Ao amigo e pesquisador Gustavo Lenci Marques, pelo apoio e parceria fundamentais para a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto e ao doutorando Samuel Liebel pela realização das atividades laboratoriais e orientação sobre os modelos de Estresse oxidativo a serem desenvolvidos em futuras pesquisas.

Aos funcionários, professores e colegas da Disciplina de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo acolhimento e excelente formação técnica e humana recebida durante todos os anos de convivência.

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

Charles Chaplin

## RESUMO

**Introdução:** O envelhecimento é um processo inevitável, complexo e que culmina na redução funcional de quase todos os órgãos e sistemas. Os rins são órgãos responsáveis pela manutenção da homeostase do organismo. Embora identifiquemos os processos fisiológicos envolvidos em seu envelhecimento, os mecanismos pelos quais estes eventos ocorrem permanecem desconhecidos. **Objetivo:** Avaliar a função renal e as alterações histológicas renais por meio da estereologia e morfometria em ratos submetidos ao processo natural de envelhecimento. **Métodos:** Estudo experimental utilizando 72 ratos Wistar, divididos em 6 grupos com 12 animais. Cada grupo foi sacrificado em uma idade diferente: 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. Após a eutanásia, foi realizada nefrectomia direita, análise estereológica e morfométrica do tecido renal (volume e peso renal, densidade de volume ( $Vv_{[glom]}$ ) e densidade numérica ( $Nv_{[glom]}$ ) dos glomérulos renais e volume médio ( $Vol_{[glom]}$ ) glomerular) e também foi avaliada a função renal pela dosagem de creatinina e uréia séricas. **Resultados:** Houve decréscimo da função renal significativa nos ratos mais velhos. O peso renal foi menor nos animais do grupo de 3 meses (média de  $1,28 \pm 0,13g$ ). O volume renal apresentou aumento progressivo durante o desenvolvimento dos ratos com os maiores valores registrados no grupo de animais com 12 meses (média de  $1267,2 \pm 124,0mm^3$ ) e diminuição progressiva significativa nos animais mais velhos. A  $Vv_{[glom]}$  apresentou diminuição progressiva estatisticamente significativa entre os grupos e a  $Nv_{[glom]}$  também diminuiu de forma significativa (média de  $165,77 \pm 3,13$  glomérulos por  $mm^3$  nos ratos com 3 meses de idade *versus* média de  $26,42 \pm 5,07$  glomérulos por  $mm^3$  no grupo de ratos com 24 meses). O volume médio dos glomérulos renais manteve-se estável nos grupos de animais mais jovens (média de  $7,96 \pm 0,20 \mu m^3$ ). Em seguida apresentou redução significativa nos animais de até 12 meses (média de  $6,45 \pm 0,51 \mu m^3$ ), voltando a apresentar aumento no volume médio dos glomérulos nos animais mais idosos (média de  $6,88 \pm 0,001 \mu m^3$ ). **Conclusão:** A função renal, avaliada através da dosagem sérica de creatinina e ureia, mostrou ser inferior em ratos senis quando comparado a ratos jovens. A análise morfométrica e estereológica evidenciou atrofia renal, redução progressiva da densidade de volume e densidade numérica dos glomérulos renais associados ao processo de envelhecimento. Não foi encontrada hipertrofia glomerular compensatória significativa nos ratos senis.

**Palavras-chave:** envelhecimento; ratos; estereologia; morfometria; histologia; rim; função renal; densidade volumétrica glomerular; densidade numérica glomerular; volume médio glomerular



## ABSTRACT

**Introduction:** Aging is an inevitable process, complex and culminates in the functional reduction of almost every organs and systems. The kidneys are organs responsible for maintaining the body's homeostasis. Although identify the physiological processes involved in renal aging, the mechanisms by which these events occur remain unknown.

**Objective:** To evaluate the renal function and the renal histological alterations through the stereology and morphometrics in rats submitted to the natural process of aging.

**Methods:** Experimental study using 72 Wistar rats, divided in 6 groups with 12 animals. Each group was sacrificed in a different age: 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months. After the euthanasia, it was performed right nephrectomy, stereological and morphometric analysis of the renal tissue (renal volume and weight, density of volume ( $V_{V[\text{glom}]}$ ) and numerical density ( $N_{V[\text{glom}]}$ ) of the renal glomeruli and average glomerular volume ( $Vol_{[\text{glom}]}$ )) and also it was evaluated the renal function for the dosage of serum creatinine and urea. **Results:** There was significant decrease of the renal function in the oldest rats. The renal weight was lower in the animals of the group at 3 months of age (average of  $1.28 \pm 0.13\text{g}$ ). The renal volume presented gradual increase during the development of the rats with the biggest values registered in the group of animals at 12 months of age (average of  $1267.2 \pm 124.0\text{mm}^3$ ) and significant progressive decrease in older animals.  $V_{V[\text{glom}]}$  presented statistically significant gradual reduction between the groups and the  $N_{V[\text{glom}]}$  also decreased significantly (average of  $165.77 \pm 3.13$  glomeruli per  $\text{mm}^3$  in 3 months old rats *versus* average of  $26.42 \pm 5.07$  glomeruli per  $\text{mm}^3$  in the group at 24 months of age). The average volume of the renal glomeruli remained steady in the groups of younger animals (average of  $7.96 \pm 0.20 \mu\text{m}^3$ ). After that, it presented significant reduction in the animals of up to 12 months of age (average of  $6.45 \pm 0.51 \mu\text{m}^3$ ), presenting again an increase in the average volume of the glomeruli in the oldest animals (average of  $6.88 \pm 0.001 \mu\text{m}^3$ ). **Conclusion:** The renal function, evaluated through the serum dosage of creatinine and urea, proved to be inferior in senile rats when compared to the young rats. The morphometric and stereological analysis evidenced renal atrophy, gradual reduction of the volume density and numerical density of the renal glomeruli associated to the aging process. It was not found significant compensatory glomerular hypertrophy in the senile rats.

**Key-words:** aging; rats; stereology; morphometry; histology; kidney; renal function; glomerular volume density; glomerular numerical density; mean glomerular volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 OBJETIVOS .....	16
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
2.1 GRUPOS .....	17
2.2 EXPERIMENTAÇÃO .....	18
2.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE .....	19
2.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS .....	20
2.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA .....	22
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	23
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS</b> .....	40
<b>APÊNDICES</b> .....	42
<b>ANEXOS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento da população humana é um fenômeno mundial. Nos países desenvolvidos, esse processo ocorreu lentamente numa situação de evolução econômica de crescimento do nível de bem-estar e redução das desigualdades sociais.<sup>1</sup>

Atualmente, nos países em desenvolvimento, o envelhecimento passou a ganhar maior importância devido ao aumento acelerado da população acima de sessenta anos em relação à população geral. Nos países da América Latina são esperados aumentos de até 300% da população idosa.<sup>2</sup> No Brasil, o número de idosos (> 60 anos de idade) passou de três milhões em 1960 para sete milhões em 1975 e 14 milhões em 2002 (um aumento de 500% em quarenta anos) e estima-se que alcançará 32 milhões em 2020. Este fenômeno leva a importantes repercussões econômicas, sociais e de cuidados com a saúde.<sup>3,4</sup>

O envelhecimento é um processo inevitável e culmina com a piora funcional de múltiplos sistemas, aumento da morbidade e mortalidade.<sup>5</sup>

Os rins são responsáveis pela realização de várias funções essenciais no organismo, tais como: liberação de excretas na urina e manutenção da homeostase eletrolítica, regulação da pressão arterial, secreção de vários hormônios, inclusive a eritropoietina, e a ativação da vitamina D. São divididos em duas regiões: o córtex e a medula. No rim humano, a medular divide-se em 8 a 18 pirâmides renais, cujos ápices se estendem em direção à pelve, formando a papila renal. Em ratos e camundongos o rim possui uma única pirâmide e, conseqüentemente, uma única papila, sendo denominado de rim unipapilar (FIGURA 1).

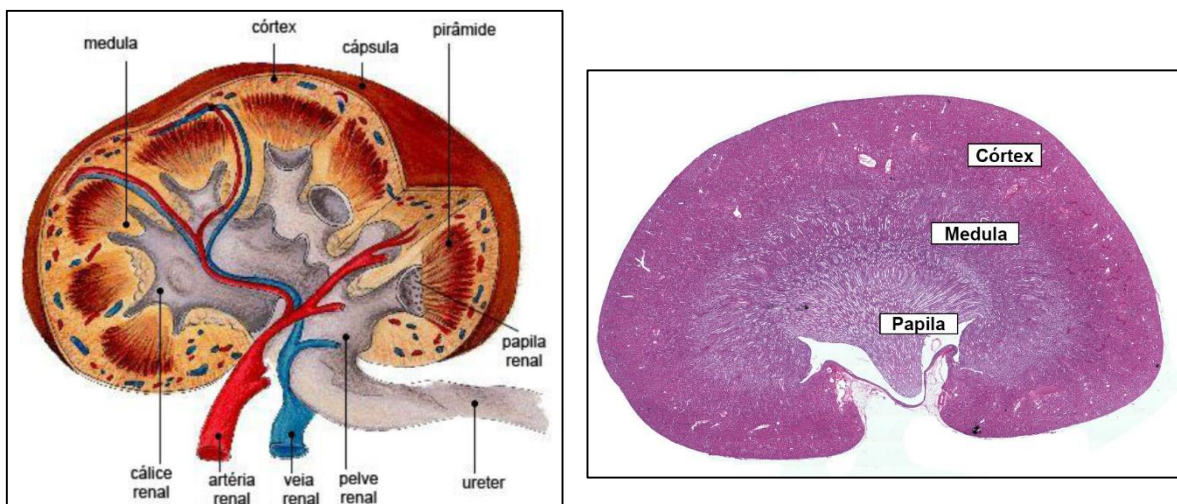


FIGURA 1: Esquema do rim humano (à esquerda) e microscopia do rim de rato (à direita). Observar que o parênquima renal do rato apresenta uma única pirâmide e consequentemente uma única papila.

Fontes: Imagem à esquerda adaptada de <http://www.becomehealthynow.com> e imagem da direita de arquivo do autor (2014).

Os néfrons são as unidades funcionais do rim. São constituídos pelo corpúsculo renal (que contém o glomérulo e a cápsula de Bowman), túbulo contorcido proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal. Estes elementos são originados a partir do blastema metanéfrico. Os ductos coletores principais e seus derivados não são considerados parte do néfron por possuírem origem embrionária a partir do broto ureteral. Cada rim humano possui entre 400.000 a 1.200.000 de néfrons; no rim dos ratos, o número varia de 20.000 a 40.000.

Os efeitos do envelhecimento nos rins têm sido associados a presença de esclerose em progressão associado à diminuição do número de néfrons funcionantes resultando na redução do fluxo sanguíneo renal e redução da filtração glomerular.<sup>6</sup> Este processo acentua-se na presença de comorbidades, culminando com o desenvolvimento de indivíduos com insuficiência renal crônica.<sup>7</sup>

A prevalência de doentes renais crônicos tem aumentado progressivamente, em proporções endêmicas, no Brasil e em todo mundo,<sup>8</sup> motivando uma grande preocupação de entidades governamentais decorrente do elevado custo para manter grande parte destes pacientes em tratamentos renais substitutivos.

A patogênese das mudanças estruturais renais associadas ao envelhecimento ainda não são completamente conhecidas. Fatores genéticos e hemodinâmicos foram

associados com a progressão das alterações morfológicas relacionadas com a idade e estas alterações estruturais do envelhecimento renal são também bastante inespecíficas, podendo ser vistas em muitas condições, incluindo diabetes, hipertensão e arteriosclerose.<sup>9</sup>

A acurácia para determinação de alterações estruturais dos órgãos é ampliada com o uso da estereologia, que é um método que utiliza amostras sistemáticas, uniformes e aleatórias para fornecer um dado quantitativo com mínimo viés.<sup>10</sup>

A estereologia, é uma área do conhecimento, modernamente definida como “a ciência da interpretação espacial de secções”, que utiliza a aplicação da geometria probabilística em amostras randômicas e sistemáticas obtidas através de planos bidimensionais de uma determinada imagem ou corpo sólido para fornecer, após análise, informações capazes de interpretar em três dimensões (comprimento, largura e profundidade) aquela estrutura.<sup>11</sup>

Em 1848, surgem os preceitos da estereologia através das descrições do geólogo francês Achille Ernest Delesse que formulou o princípio de que a densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual a densidade de área destes componentes avaliadas em cortes representativos feitos ao acaso (princípio de Delesse).

A partir da primeira metade do século XX, esta ciência passou a ser mais amplamente utilizada na área médica e, a partir da segunda metade do século XX e do surgimento da Sociedade Internacional de Estereologia, os princípios básicos foram se consolidando e sendo difundidos, principalmente no aperfeiçoamento dos métodos de amostragem.<sup>11,12</sup>

As medidas estereológicas só são válidas se as amostras do tecido forem obtidas randomicamente e de forma representativa (FIGURA 1).

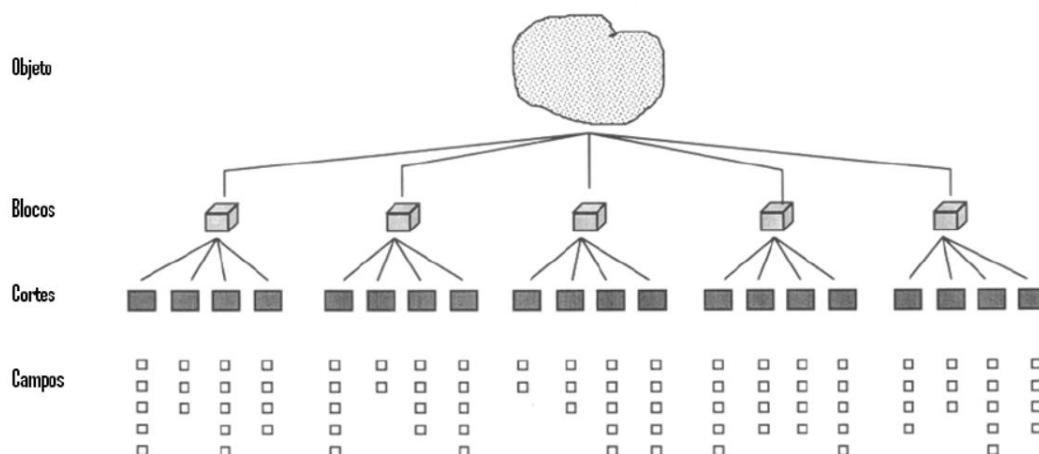


FIGURA 1: Desenho esquemático da amostragem em estereologia.

Além do princípio de Delesse que estima a proporcionalidade de elementos de uma amostra, o método da estereologia fundamenta-se em algumas outras premissas. Para a quantificação do volume absoluto de um objeto, pode-se utilizar a técnica proposta por Cavalieri, no século XVII, que afirma que o volume de qualquer objeto pode ser estimado cortando-se o mesmo em fatias separadas por uma distância conhecida e calculando-se a área de secção transversa de cada fatia; desta forma, o volume do objeto será dado pela soma das áreas de todas as fatias multiplicado pela espessura.<sup>12</sup>

Para a avaliação do número de estruturas, é necessário a utilização de método capaz de impedir a superestimação do número de elementos na secção (efeito Holmes). Classicamente, usa-se o método *Physical Disector* publicado por Sterio (1984), que é um sistema de amostragem tridimensional que avalia objetos proporcionalmente a seu número em um determinado volume conhecido, sem levar em conta seu tamanho ou forma.<sup>12,13</sup>

Toda análise estereológica, a fim de evitar vieses de amostragem, deve objetivar inicialmente obter uma secção ou corte aleatório e uniformemente isotrópico (AUI). Após, o corte deve ser analisado frente a um sistema-teste pré-definido de pontos, retas e intersecções para obtenção das informações da secção. O Sistema  $M_{42}$  é um sistema-teste frequentemente utilizado e é sobreposto às lâminas para contagem das estruturas interessadas.<sup>14</sup>

Vários estudos, na atualidade, têm utilizado a estereologia para a avaliação das alterações das estruturas renais.<sup>15</sup> Pesquisas relacionadas às modificações renais no

desenvolvimento embrionário,<sup>16</sup> estudos sobre os efeitos das doenças crônicas sobre o tecido renal, como diabetes<sup>17</sup> e hipertensão,<sup>18</sup> e também exposição a agentes específicos como dieta<sup>19</sup> e ambiente,<sup>20</sup> hormônios<sup>21</sup> e algumas drogas<sup>22-24</sup> são exemplos da importância crescente da estereologia nas pesquisas médicas.

Há poucos estudos que avaliam as alterações estruturais renais secundárias ao processo de envelhecimento com o auxílio da estereologia. O modelo utilizado no presente experimento permite analisar os efeitos do envelhecimento minimizando a interferência de outras condições, além de permitir a visualização de forma progressiva das alterações e possibilitar a correlação com dados funcionais.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar as alterações histológicas renais por meio da estereologia e morfometria e a função renal, pela dosagem da uréia e creatinina séricas, em ratos submetidos ao processo natural de envelhecimento.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram observados e também as exigências estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Experimental Animals”<sup>25</sup> foram respeitadas.

O experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná na 7ª Reunião Ordinária do CEEA de 2010 (17/08/2010, certificado 463) sob o processo número 23075.032620/2010-10.

### 2.1 GRUPOS

Para o estudo, foram utilizados 72 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), do sexo masculino procedentes do biotério Central do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná. Todos os animais foram mantidos, durante todo o período do estudo, no biotério do Hospital Angelina Caron em gaiolas de polietileno com medidas de 60X50X22cm devidamente identificadas com o título do estudo e a data de nascimento dos animais, distribuídos em 3 por gaiola. Foram submetidos a uma temperatura controlada em 22 graus Celsius, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, com umidade do ar controlada e livre de ruídos externos. Receberam água filtrada e ração específica para a espécie Nuvilab (Nuvital® – Colombo, Paraná, Brasil) de forma *ad libitum* durante todo o período do experimento.<sup>26</sup>

Os animais foram divididos em 6 grupos de 12 animais cada e foram sacrificados em diferentes tempos de vida (TABELA 1).

TABELA 1: Subdivisão dos grupos de animais pelo tempo de vida.

GRUPO	TEMPO DE VIDA
1	3 meses
2	6 meses
3	9 meses
4	12 meses
5	18 meses
6	24 meses

## 2.2 EXPERIMENTAÇÃO

Os animais que seriam submetidos ao procedimento eram alocados em uma sala longe do sítio de experimentação, em um local calmo e sem ruídos externos, e então levados um a um em uma gaiola de transporte para o laboratório.

Na sala de experimentação foi realizada pesagem em balança calibrada ultrassensível e medição da estatura do animal.

Para a realização do procedimento, os animais foram submetidos a anestesia com solução de Cloridrato de Cetamina (57,67mg/ml) associado a 2% de Cloridrato de Xilazina (2g), com aplicação de 1ml/1000 gramas de peso vivo, via intraperitoneal. Após anestesiados, os animais foram fixados em tábua cirúrgica com fita adesiva e submetidos a antissepsia abdominal e torácica. O procedimento consistiu na realização de laparotomia e toracotomia mediana e subsequente punção intracardíaca para coleta de sangue e indução de parada cardio-respiratória por exsanguinação (FIGURA 4).

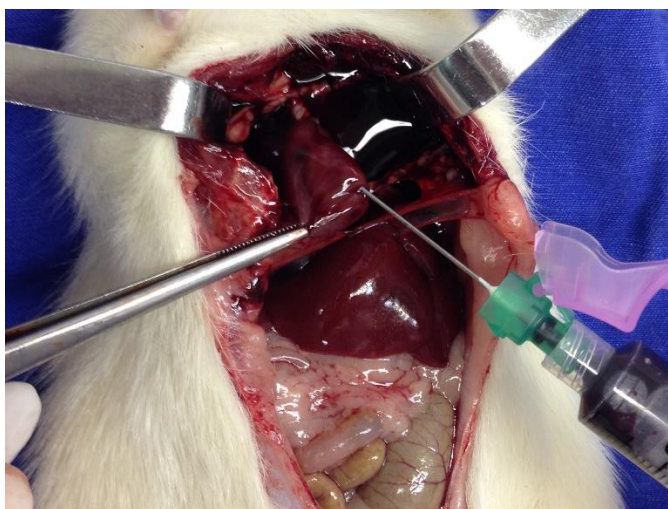


FIGURA 4: Punção cardíaca e coleta de sangue.  
FONTE: O autor (2013).

A seguir, procedeu-se a dissecação dos rins bilateralmente, ligadura dos vasos renais e dos ureteres e realização de nefrectomia bilateral. O rim esquerdo foi imediatamente congelado num freezer de temperatura de - 80°C (para utilização em outro estudo) e o rim direito foi submetido a pesagem em balança eletrônica de alta precisão (Ohaus Precision Standard – modelo TS-2KS, Bradford, Inglaterra) e suas dimensões (comprimento, largura e espessura) foram mensurados com o uso de paquímetro digital, sendo registrados os dados para posterior análise (FIGURA 5).



FIGURA 5: Aferição das medidas do rim direito com paquímetro digital.  
FONTE: O Autor (2013).

Foram também ressecados para realização de outros estudos sobre o processo de envelhecimento os seguintes órgãos: testículos, bexiga, corpos cavernosos e uretra, aorta, coração, fígado e cérebro.

### 2.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE

Foram enviadas ao laboratório de análises bioquímicas as amostras de sangue coletadas dos animais e realizou-se a dosagem sérica de creatinina e uréia pelo método enzimático colorimétrico colorimétrico.<sup>27</sup> O aparelho utilizado foi Vitros versão 5.1 FS, marca Johnson e Johnson, sendo a unidade de medida miligramas/dL.

### 2.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS

O volume renal (V) foi calculado a partir das medidas lineares, utilizando a fórmula para o volume de um elipsóide recomendada por Barr (1990): Volume (V) = Comprimento (C) x Largura (L) x Espessura (E) x 0,523.<sup>28</sup>

Após a aferição das medidas de peso, comprimento, largura e espessura, o rim direito foi bipartido longitudinalmente e foi realizada a fixação em ALFAC (85 partes de álcool etílico 80%, 10 partes de formaldeído 40% e 5 partes de ácido acético glacial, preparado no momento do uso) por 16 horas. O material foi então desidratado em

uma série decrescente de xilol e álcoois, para posterior inclusão em blocos de parafina.

Em seguida, os rins foram submetidos aos cortes sucessivos em micrótomo com 7 $\mu$ m de espessura (American Optical, Spencer AO 820). Pelo fato de o rim ser um órgão anisotrópico (os glomérulos estão localizados predominantemente na região cortical) foi utilizado o método *Orientalor*<sup>29</sup> (FIGURA 6) para obtenção de cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (cortes AUI).

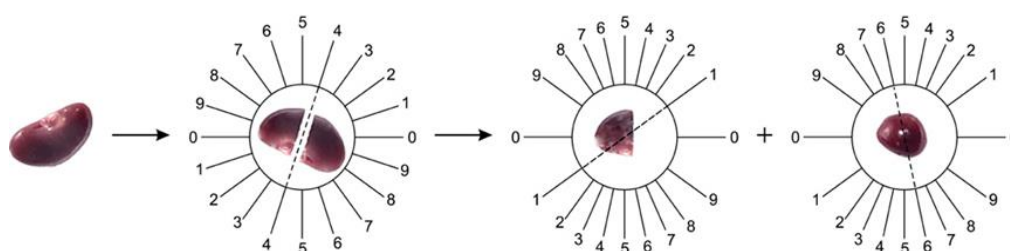


FIGURA 6: Imagem esquemática do método *Orientalor* para a obtenção de cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos. Fonte: Karbalay-Doust *et al* (2012).

Adaptado de <http://www.kjurology.org/Synapse/Data/PDFData/0020KJU/kju-53-360.pdf>.

Utilizou-se o método *Physical Disector*<sup>30</sup> para a realização do cálculo da densidade numérica dos glomérulos ( $Nv_{[glom]}$ ). A amostragem do tecido renal foi realizada com dois cortes consecutivos; selecionados 1 a cada 5 cortes – representando uma espessura de 35 micrômetros entre os planos – para a determinação dos parâmetros quantitativos tridimensionais dos glomérulos renais a partir de cortes bidimensionais.

Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas com 5 cortes de cada unidade renal para a execução da técnica histoquímica Hematoxilina & Eosina (HE).

#### COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA & EOSINA (HE):

Para coloração de HE seguimos o protocolo clássico com algumas adaptações. As lâminas foram colocadas, por um minuto, em solução Hematoxilina Harris. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada duas vezes consecutivas. Em seguida, foram impregnadas com Eosina-Floxina por 45 segundos. Esse material foi imediatamente

lavado com água destilada para em seguida ser desparafinado, desidratado e montado.<sup>31,32</sup>

A análise das lâminas submetidas a coloração de HE foi feita em microscópio biológico trinocular com objetivas planas, marca Bel Photonics, modelo BIO2 Polaris (Bel Photonics do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) com sistema de captura de imagem BIOCAM CMOS SERIES 3.0® e software Home Image I® acoplados. Em seguida, as imagens capturadas foram utilizadas para a análise dos parâmetros estereológicos para obtenção da densidade volumétrica ( $Vv_{[glom]}$ ), densidade numérica ( $Nv_{[glom]}$ ) e volume médio ( $Vol_{[glom]}$ ) dos glomérulos renais.

Para determinar a tridimensão do rim utilizou-se o método estereológico Sistema-teste  $M_{42}$  (FIGURA 7). Esse foi superposto às imagens histológicas para a contagem de pontos e de intersecções-teste conforme descrito por Mandarim de Lacerda<sup>33</sup>.

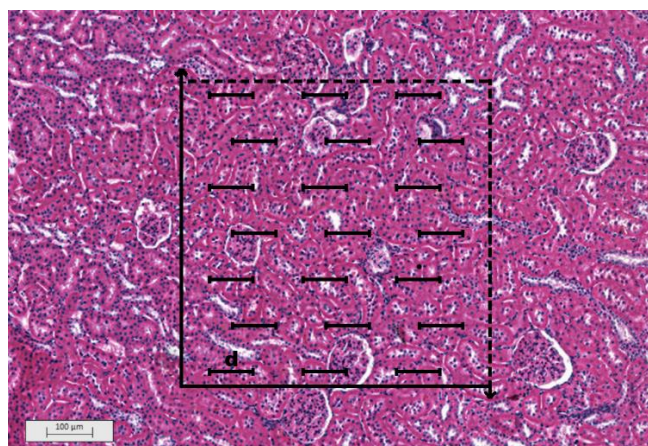


FIGURA 7: Sistema-teste  $M_{42}$  superposto à córtex renal. Pode-se observar que alguns glomérulos são tocados pelos pontos-teste e estes então são incluídos na contagem de glomérulos. Distância “d” = 100 micrômetros. Aumento de 40x.  
FONTE: O Autor (2015).

Para obtenção da densidade de volume dos glomérulos renais ( $Vv_{[glom]}$ ):

$$Vv_{[glom]} = P_{[glom]} / P_T \quad (\mu m^{\circ})$$

onde:

$P_{[glom]}$  = números dos pontos que cruzam os glomérulos renais

$P_T$  = números de pontos-testes

Os valores da densidade volumétrica foram multiplicados por 100 para expressão dos resultados em percentagem.

Para obtenção da densidade numérica dos glomérulos renais ( $Nv_{[glom]}$ ):

$$Vol[disector] = e \cdot At$$

$$Nv_{[glom]} = \Sigma Q^-A_{[glom]} / Vol[disector] \quad (1/mm^3)$$

onde:

$e$  = espessura do micrômetro

$At$  = área-teste do plano superior

$\Sigma Q^-A_{[glom]}$  = somatório do número de glomérulos renais

Para obtenção do volume médio dos glomérulos renais ( $Vol_{[glom]}$ ):

$$Vol_{[glom]} = Vv_{[glom]} / Nv_{[glom]} \quad (\mu m^3)$$

Onde:

$Vv_{[glom]}$  = densidade volumétrica

$Nv_{[glom]}$  = densidade numérica

## 2.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no experimento foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas que atenderam a condição de normalidade foi considerado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. O teste LSD (*least significant difference*) foi usado para as comparações dos grupos dois a dois. Para o volume médio glomerular a comparação dos grupos foi feita usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p \leq 0,05$  indicaram significância estatística. Para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais em todos os grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem média diferente dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, os grupos foram comparados dois a dois. Os dados foram analisados com programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os dados da presente dissertação foram submetidos (FIGURA 8) para análise e publicação no jornal científico oficial da *American Urological Association (AUA)* denominado *The Journal of Urology*<sup>®</sup>, (fator de impacto 3.753 pela *Thompson Reuters Institute for Scientific Information Journal Citation Reports*, em 2014).

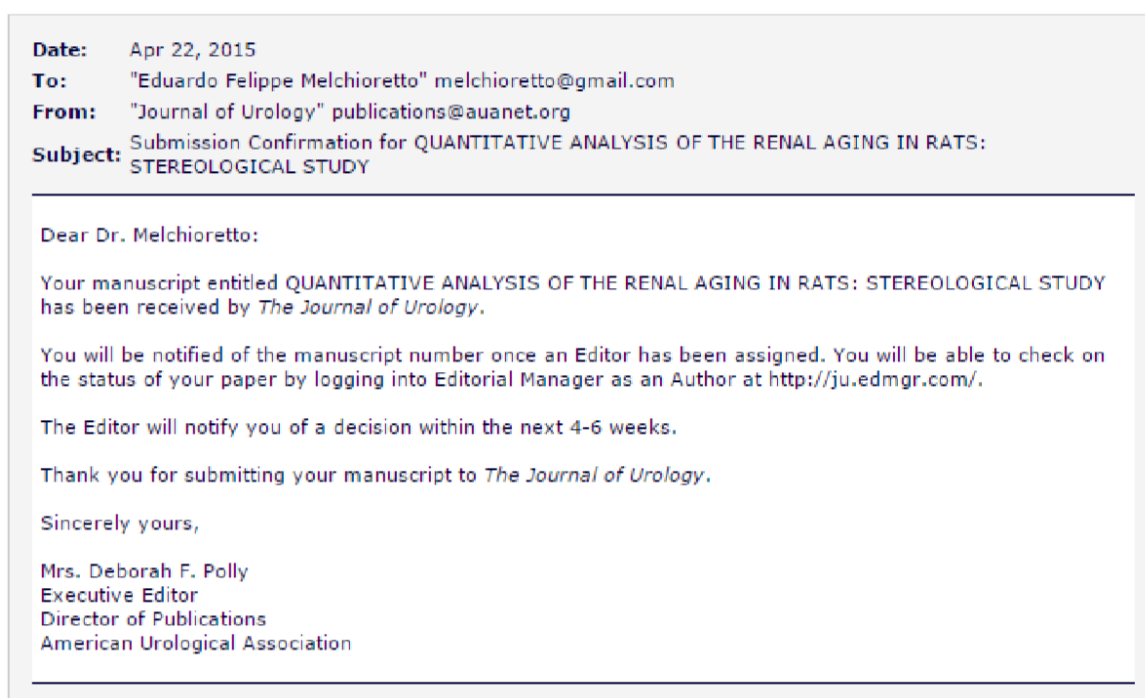


FIGURA 8: Protocolo da confirmação de submissão do artigo intitulado “QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE RENAL AGING IN RATS: STEREOLOGICAL STUDY” no periódico “*The Journal of Urology*”.

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE RENAL AGING IN RATS: STEREOLOGICAL STUDY

### INTRODUCTION

The aging process is inevitable and culminates in the functional worsening of multiple systems, increase of the morbidity and mortality<sup>1</sup>. The effects of the aging in the kidneys are related to the presence of sclerosis in progression, associated to the reduction of the number of functioning nephrons, resulting in the reduction of the renal blood flow and the glomerular filtration.<sup>2</sup>

The pathogenesis of the structural renal changes associated to the aging is not yet completely known. Genetic and hemodynamic factors had been associated with the progression of the morphologic alterations related to age and these structural alterations of the renal aging are also very unspecific, found in many conditions, including diabetes, hypertension and arteriosclerosis.<sup>3</sup>

The accuracy for determination of structural alterations of the agencies is extended with the use of the stereology, which is a method that uses systematic, uniform and random samples to supply quantitative data with minimum bias.<sup>4</sup>

There are few studies using stereology to evaluate the renal structural alterations secondary to the aging process, therefore this work aims to evaluate the renal histological alterations through the stereology and morphometrics; and the renal function, through the examination of the serum urea and creatinine in rats submitted to the natural process of aging.

### MATERIALS AND METHODS

#### Animals and Study Design

All the ethical principles in the animal testing established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) had been observed and also the requirements established in the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals"<sup>5</sup> had been respected, being the experiment approved by the local committee of ethics.

For the study, 72 male albino Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia) had been kept in an environment with controlled temperature in 22 degrees



Celsius, light/dark cycle of 12 hours, controlled humidity of the air and free of external noises. They had all received purified water and *ad libitum* feeding with specific food for the species during the period of the experiment.

The animals were divided in 6 groups of 12 animals each and were sacrificed at different ages: group 1, at 3 months of age; group 2, at 6 months of age; group 3, at 9 months of age; group 4, at 12 months of age; group 5, at 18 months of age; and group 6, at 24 months of age.

In the experimentation room, the weighing in an ultra-sensitive calibrated scale and measurement of the stature of the animal were made.

For the procedure, the animals were submitted to anesthesia with a solution of Ketamine hydrochloride (57.67mg/mL) associated 2% of Xylazine hydrochloride (2g), with application of 1ml/1000 grams of live weight, via intraperitoneal injection under aseptic conditions. The procedure consisted in the performance of laparotomy and median thoracotomy and subsequent intracardiac puncture for blood collection and induction of cardiorespiratory arrest by exsanguination.

Next, the experiment proceeded with the kidneys dissection performed bilaterally, tie of the renal vases and ureters and conduct of bilateral nephrectomy. The left kidney was immediately frozen under the temperature of - 80°C (to be used in another study) and the right kidney was submitted the weighing in electronic scale of high precision and its dimensions (length, width and thickness) were measured with a digital caliper.

Also the following organs were dried up to be used in other studies on the aging process: testicles, bladder, corpus cavernosum and urethra, aorta, heart, liver and brain.

#### Biochemical Analysis

The collected blood samples from the animals were sent to the laboratory of biochemical analyses and a measurement of serum creatinine and urea through the enzymatic colorimetric method was performed, being the measurement unit mg/dL.<sup>6</sup>

## Morphological, Morphometric and Stereological Analysis

The renal volume (V) was calculated from the linear measurement, using the formula for the volume of an ellipsoid recommended by Barr (1990): Volume (V) = Length (C) x Width (L) x Thickness (E) x 0.523.<sup>7</sup>

After the verification of the measures of weight, length, width and thickness, the right kidney was bipartite longitudinally and set in ALFAC (85 parts of ethyl alcohol 80%, 10 parts of formaldehyde 40% and 5 parts of glacial acetic acid, made at the moment of use) for 16 hours. The material then was dehydrated in a decreasing series of xylol and alcohols, for posterior inclusion in paraffin blocks.

After that, the kidneys were submitted to the successive cuts in microtome with 7 $\mu$ m of thickness (American Optical, Spencer AO 820). Since the kidney is an anisotropic organ (the glomeruli are located predominantly in the cortical region) the *Oriantator Method*<sup>8</sup> was used to obtain random and uniformly isotropic cuts (cuts AUI).

The *physical Disector method*<sup>9</sup> was used to calculate the numerical density of the glomeruli ( $N_{V[\text{glom}]}$ ). The sampling of the renal tissue was carried through with two consecutive cuts; chosen 1 every 5 cuts - presenting a thickness of 35 micrometers between the plans - for the determination of the three-dimensional quantitative parameters of the renal glomeruli from bi-dimensional cuts.

Later, the histological blades were mounted with 5 cuts of each renal unit for the execution of the histochemical method Hematoxylin and Eosin stain (HE).

The analysis of the blades submitted to the HE stain was made in biological trinocular microscope with plain objective Bel Photonics lens, model BIO2 Polaris (Bel Photonics do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) with image capture system BIOCAM CMOS SERIES 3.0<sup>®</sup> and software Home Mirage I<sup>®</sup> connected. After that, the captured images were used for the analysis of the stereological parameters for attainment of the volumetric density ( $V_{V[\text{glom}]}$ ), numerical density ( $N_{V[\text{glom}]}$ ) and average volume ( $Vol_{[\text{glom}]}$ ) of the renal glomeruli.

To determine the three-dimension of the kidney the stereological method  $M_{42}$  system-test was used. This was superimposed on the histological images in order to count the of points and intersections test, as described by Mandarim De Lacerda.<sup>10</sup>

For attainment of the density of volume of the renal glomeruli ( $Vv_{[glom]}$ ) the following calculation was carried through:

$$Vv_{[glom]} = P_{[glom]} / P_T \text{ (}\mu\text{m}^{\circ}\text{)}$$

$P_{[glom]}$  being the number of points that cross renal glomeruli and  $P_T$  the number of points-test. The values of the volumetric density were multiplied by 100 for expression of the results in percentage.

The numerical density of the renal glomeruli ( $Nv_{[glom]}$ ) was calculated through the formulas:

$$Vol[disector] = e \cdot A_T$$

$$Nv_{[glom]} = \Sigma Q-A_{[glom]} / Vol[disector] \text{ (1/mm}^3\text{)}$$

Being:

$e$  = thickness of the micrometer

$A_T$  = area-test of the superior plan

$\Sigma Q-A_{[glom]}$  = sum of the number of renal glomeruli

To obtain the average volume of the renal glomeruli ( $Vol_{[glom]}$ ), the division between the volumetric density ( $Vv_{[glom]}$ ) and the numerical density of the renal glomeruli ( $Nv_{[glom]}$ ) was made. The result was expressed in cubic micrometers ( $\mu\text{m}^3$ ).

### Statistical Analysis

The results obtained in the experiment were described by averages, medium, minimum values, maximum values and standards deviations. For the comparison of the groups in relation to the quantitative variables that had taken care of the normality condition, the model of analysis of the variance (ANOVA) with a factor was considered. The LSD test (least significant difference) was used for the comparisons of groups two by two. In the average glomerular volume, the comparison of the groups was made using the non-parametric test Kruskal–Wallis one-way analysis of variance. Values of  $p \leq 0.05$  had indicated statistical significance. For each one of the variables, the null hypothesis of the averages being equal in all the groups, versus the alternative hypothesis of at least one of the groups having a different average from the others was

tested. In case of rejection of the null hypothesis, the groups were compared two by two. The data were analyzed with computer program IBM SPSS Statistics v.20.0.

## RESULTS

No loss occurred during the study, as in the last group all the 12 animals at 24 months of age were alive. The animals with the longer survival showed evident signs of aging, such as thinning hair and hypoactivity. With regards to the length and weight, the animals had had a statistically significant gradual increase until the group at 12 months of life, followed by discrete reduction in the rats of the last groups (Figure 1).

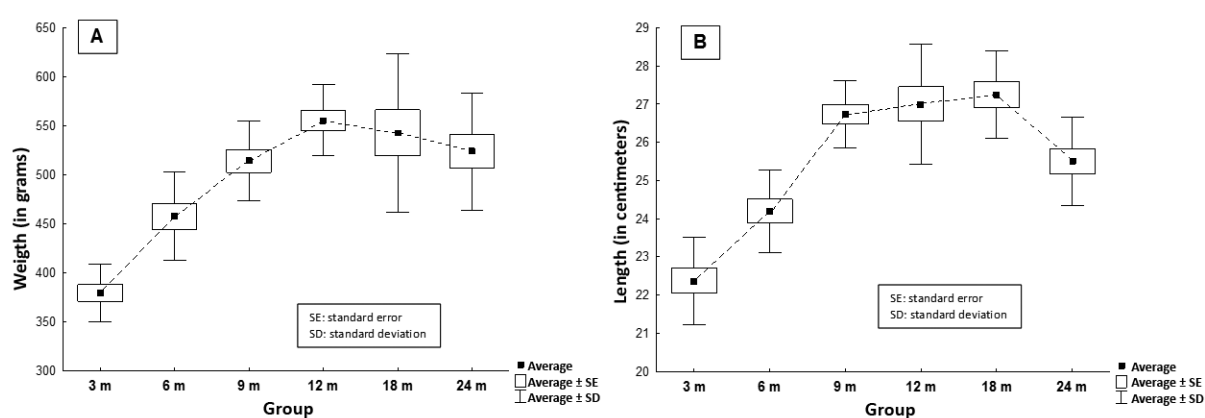


Figure 1: A) Graph of the evolution of the weight (in grams) of the animals in the groups. B) Evolution of the length of the animals (in centimeters) in the different groups.

## Biochemical Analysis

The statistical analysis of the values of the serum creatinine had shown gradual increase over time, presenting significant statistical difference ( $p \leq 0.05$ ) in the comparison of the animals of the groups of young rats (group at 3 and 6 months of age - average creatinine  $0.53 \pm 0.16$  mg/dL and  $0.56 \pm 0.09$  mg/dL, respectively) when compared with the animals of the groups of rats at more advanced age (12, 18 and 24 months of age - average creatinine  $0.74 \pm 0.21$  mg/dL,  $0.77 \pm 0.17$  mg/dL and  $0.90 \pm 0.33$  mg/dL, respectively). In the comparison between the animals of the groups at more than 12 months of age there was no significant difference in the values of the serum creatinine (Figure 2A).

The values of the measurement of the serum urea had not shown statistical difference between the groups ( $p=0.557$ ) (Figure 2B).

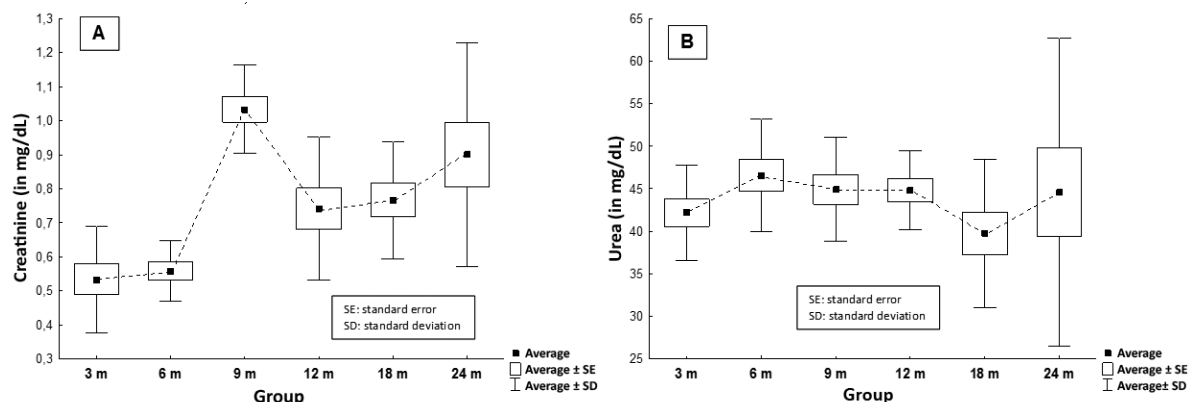


Figure 2: Result of the serum creatinine (A) and urea (B) of the animals in the different groups.

### Renal Morphometric Analysis

The examination of the renal weight presented statistically lower values in the group of animals at 3 months of age (average of  $1.28 \pm 0.13\text{g}$ ) in comparison to the other groups (except group at 9 months of age) (Figure 3A).

The renal volume measured presented statistically significant increase between the group at 3 months of age (average of  $433.8 \pm 74.58\text{mm}^3$ ) and the group at 6 months of age (average of  $1124.6 \pm 82.5\text{mm}^3$ ) ( $p < 0.001$ ). A significant increase of the renal volume was also evidenced between the animals of the group at 6 months of age and the group of animals at 12 months of age (average of  $1267.2 \pm 124.0\text{mm}^3$ ) ( $p = 0.028$ ). After a peak with the group at 12 months of age, a gradual reduction of the renal volume occurred, being that the comparison between the groups at 12 and 18 months of age (average of  $579.1 \pm 137.9\text{mm}^3$ ) was also statistically significant ( $p < 0.001$ ) (Figure 3B).

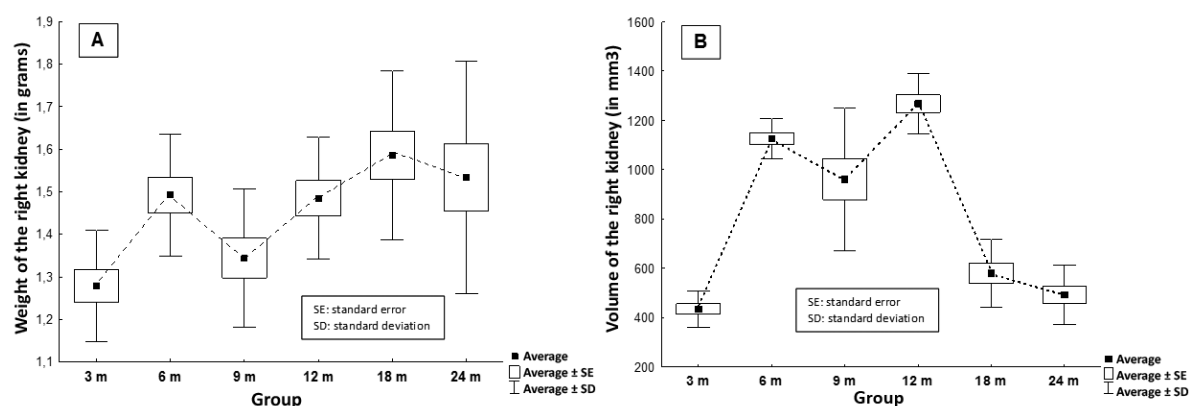


Figure 3: A) Graphic of the evolution of the weight of the right kidney (in grams) in the different groups. B) Graph of the evolution of the volume of the right kidney (in mm<sup>3</sup>) in the different groups.

## Stereological Analysis

The quantitative examination of the glomerular volume density ( $Vv_{[glom]}$ ) showed statistically significant gradual reduction between the groups (Chart 1 and Figure 4).

Chart 1: Values of the glomerular volume density ( $Vv_{[glom]}$ ) in the groups (values in %)

Variable	Group	n	Average	Medium	Minimum	Maximum	Standard deviation	Value of $p^*$
<b>(<math>Vv_{[glom]}</math>) (in %)</b>	3 months	12	13.18	13.26	12.62	13.71	0.37	<0.001
	6 months	12	10.72	10.81	9.38	11.81	0.66	
	9 months	12	9.94	10.24	7.81	11.91	1.15	
	12 months	12	6.90	6.41	5.24	9.38	1.32	
	18 months	12	4.50	4.36	3.10	5.62	0.83	
	24 months	12	1.825	1.67	1.43	2.43	0.35	

\*ANOVA with a factor,  $p \leq 0.05$

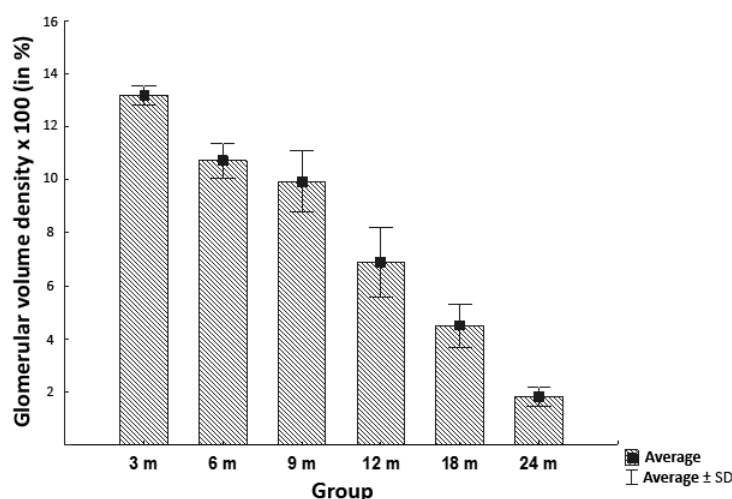


Figure 4: Values of the glomerular volume density ( $Vv_{[glom]}$ ) in the groups

The glomerular numerical density ( $Nv_{[glom]}$ ) surveyed demonstrated statistically significant reduction between the groups of rats at 3 months of age (average of  $165.77 \pm 3.13$  glomeruli per  $mm^3$ ) and 6 months of age (average of  $135.32 \pm 12.89$  glomeruli per  $mm^3$ ) ( $p < 0.001$ ). An increase in the numerical density in the rats at 9 months of age (average of  $148.71 \pm 15.78$  glomeruli per  $mm^3$ ) in relation to the group at 6 months of age was evidenced ( $p = 0.007$ ). The glomerular numerical density in the groups over 9 months of age came back to present gradual reduction until reaching an average of  $26.42 \pm 5.07$  glomeruli per  $mm^3$  in the group of rats at 24 months of age. This gradual reduction presented great statistical relevance ( $p < 0.001$ ) (Chart 2 and Figure 5 and Figure 6).

Chart 2: Values of the glomerular numerical density ( $Nv_{[glom]}$ ) in the groups (values in  $1/mm^3$ )

Variable	Group	n	Average	Medium	Minimum	Maximum	Standard deviation	Value of $p^*$
<b><math>Nv_{[glom]}</math> (in <math>1/mm^3</math>)</b>	3 months	12	165.77	166.21	160.44	171.79	3.13	<0.001
	6 months	12	135.32	135.10	113.85	160.89	12.89	
	9 months	12	148.71	150.82	125.00	177.19	15.78	
	12 months	12	105.95	106.31	79.91	128.32	14.75	
	18 months	12	69.49	65.55	46.10	92.75	12.44	
	24 months	12	26.42	24.23	20.76	35.30	5.07	

\*ANOVA with a factor,  $p \leq 0.05$

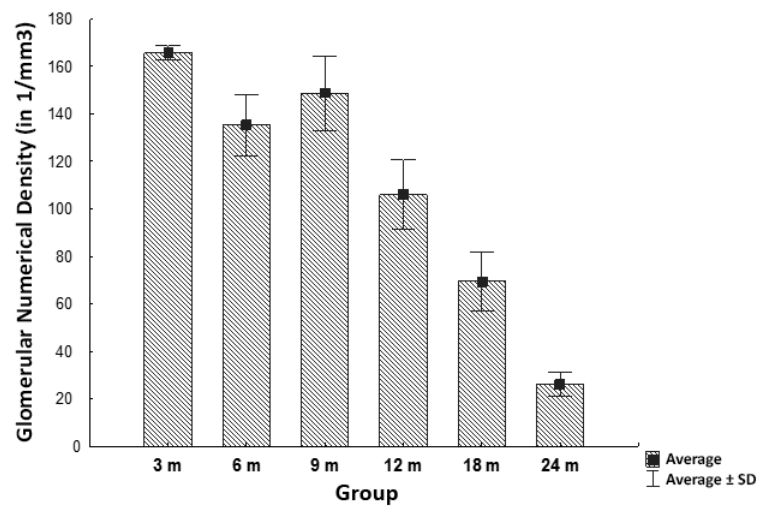


Figure 5: Values of the glomerular numerical density ( $Nv_{[glom]}$ ) in the groups (values in  $1/mm^3$ )

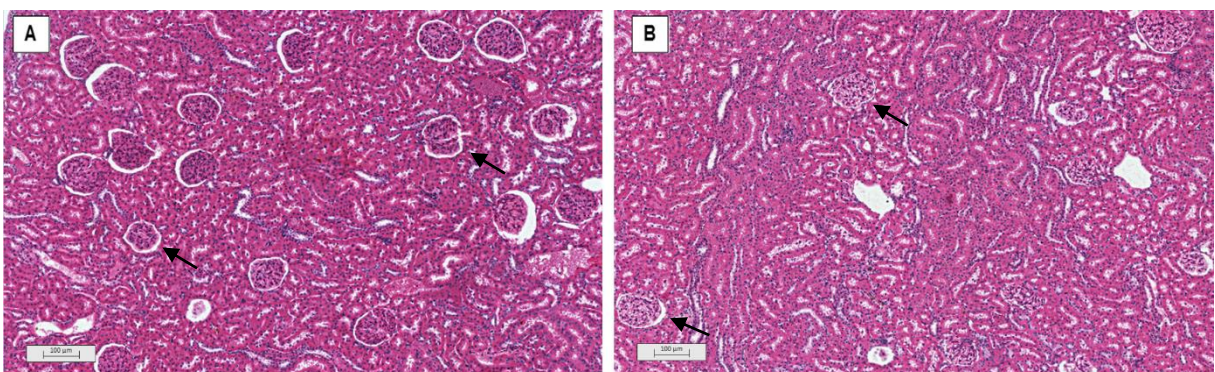


Figure 6: Photomicrograph of the kidney cortex using Hematoxylin-Eosin. Magnification: 40x. Marked difference between the number of identified glomeruli (arrows) in the 3-month group (A) versus 24-months group (B).

The mean glomerular volume did not present statistical difference between the groups of rats with 3 and 6 months of age ( $p=0.792$ ). Between the groups of animals at 6 months of age and the remaining with rats at more advanced age, a statistically significant reduction ( $p<0.001$ ) of the mean glomerular volume occurred. Between the animals older than 9 months, the mean glomerular volume did not present significant alterations (Chart 3 and Figure 7).

Chart 3: Values of the mean glomerular volume ( $Vol_{[glom]}$ ) in the groups (values in  $\mu m^3$ )

Variable	Group	n	Average	Medium	Minimum	Maximum	Standard deviation	Value of p*
$Vol_{[glom]}$ (in $\mu m^3$ )	3 months	12	7.96	7.99	7.67	8.26	0.20	
	6 months	12	8.00	8.03	7.19	8.58	0.40	
	9 months	12	6.68	6.73	6.22	7.08	0.24	
	12 months	12	6.45	6.48	5.83	7.37	0.51	
	18 months	12	6.56	6.66	5.37	7.26	0.54	
	24 months	12	6.88	6.88	6.88	6.88	0.001	<0.001

\*ANOVA with a factor,  $p\leq 0.05$

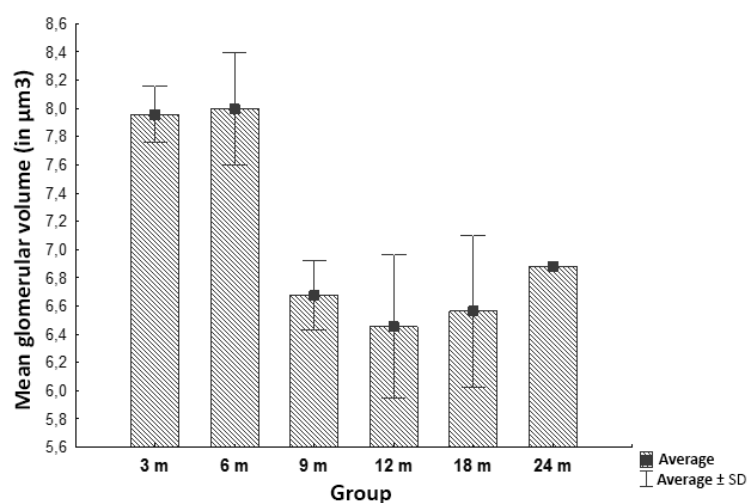


Figure 7: Values of the mean glomerular volume ( $Vol_{[glom]}$ ) in the groups (values in  $\mu m^3$ )

## DISCUSSION

The use of animal models in experimental studies has been widely spread since the beginning of the last century. Even with its reduction in the last two decades due the ethical concerns, it is estimated that about 12 million animals are used per year in researches in the United States.<sup>11</sup>



In aging and longevity research this model becomes fundamental, since it allows to follow the entire cycle of life in a shorter period of time and to control the environment exposition during all the life of the animal.

In the present study, the animals of the last group had reached the end of the follow-up time at 24 months of life, thus, on the basis of its cycle of life, they can be considered elderly rats.<sup>12</sup> The development of the animals based on their weight was considered adequate regarding the standard curves found in literature.<sup>13</sup>

The senescence is associated with a gradual reduction of the glomerular filtration rate.<sup>14</sup> Previous studies on renal aging in rats<sup>15,16</sup> had demonstrated gradual reduction of the clearance of creatinine overtime in rats at up to 18 months of age, corroborating with our finding of significantly inferior values of the serum creatinine in younger animals (group at 3 and 6 months of age) in comparison to the animals of more advanced age (12, 18 and 24 months of age). Another point to be considered is the fact that endogenous creatinine is produced in the organism to be directly proportional to the muscular mass. In Wistar rats, the decline in the muscular mass is very small (approximately 5%), whereas in men these values are around 25% reduction.<sup>17</sup> This reduction of the muscular mass does not necessarily reflects in an expected reduction of the serum levels of creatinine, precisely because of the existence of a reduction of the renal function, as evidenced in the results of our study.

The values of the urea had not presented statistically significant variation between the groups, suggesting that even with the potential reduction of the renal function during the aging process, none of the animals developed accentuated damage capable to install status of advanced renal insufficiency. It is understood however, that the analysis of the concentrations of plasma creatinine and urea is limited and allows only one indirect indication of renal damage, as there are other factors that can be involved in the increase of its serum concentrations.

The histopathological alterations associated to the process of renal aging, such as: atrophy of the organ, reduction of the epithelial cells number of the convoluted tubule, reduction of the number and volumetric reduction of nephrons, arterial alterations, and increase of the number of renal interstice cells and interstitial fibrosis.<sup>14,18</sup> In our study, the morphometrics and stereology were used to better determine the renal alterations secondary to the aging process.<sup>4</sup>

The renal weight of the analyzed animals has presented to be compatible with the findings of preliminary studies and was consistent with the physical development of the animals. The renal volume found in the study suggests the same logic, increasing as the animal develops physically - with apex around 12 months of age - and, after that, evolving with gradual reduction demonstrating evident process of atrophy of the organ.<sup>14,19</sup>

With strong statistical significance, the gradual reduction of the glomerular volume density and the glomerular numerical density found in the stereological analysis of the renal tissue of the rats in the groups of animals gradually older, clearly demonstrates the process of renal aging as already well-established in literature.<sup>19-23</sup>

The variation curve of the mean glomerular volume during the aging process evidenced in our work was similar to the ones found in studies lead in human beings.<sup>21-24</sup> However, in 1992, Cortes et al. evidenced a gradual increase on the mean glomerular volume during the aging of Fischer rats. This compensatory glomerular hypertrophy seen in the senile rats is probably due to the reduction of the number of functioning renal glomeruli.<sup>25</sup>

The results of the study strengthen the well appraised information already in literature and can assist in better understanding of the natural process of the aging in rats and stimulate the development of new research on the subject.

## CONCLUSION

The renal function, evaluated through the serum dosage of creatinine and urea, proved to be inferior in senile rats when compared the young rats. The morphometric and stereological analysis evidenced renal atrophy, gradual reduction of the glomerular volume density and glomerular numerical density associated to the aging process. It was not found significant compensatory glomerular hypertrophy in the senile rats.

## REFERENCES

1. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol*. 1998 Nov;33(7-8):639-53.
2. Jassal SV, Oreopoulos, DG. The aging kidney. *Geriatr Nephrol Urol*. 1998;8(3):141-7.
3. Pannarale G, Carbone R, Del Mastro G, Gallo C, Gattullo V, Natalicchio L, Navarra A, Tedesco A. The aging kidney: structural changes. *J Nephrol*. 2010 Sep-Oct;23 Suppl 15:S37-40.
4. Bertram JF. Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol*. 1995;161:111-72.
5. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. [monograph on the Internet] Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993. [Last accessed January 12, 2015]. Available from [http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental\\_Animals\\_Vol1.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf).
6. Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(5):329-37.
7. Sampaio KMOR, Araújo RB. Ultrasonographic measurement of linear characteristics and renal volumetry in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2002;54(3):248-54.
8. Mattfeldt T, Mobius HJ, Mall G. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects unknown orientation in space. *J Microsc*. 1985;139:279-89.
9. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984;134:127-36.
10. Mandarim-de-Lacerda CA. Fisiologia e fisiopatologia: estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo. *J Bras Nefrol*. 2000;22(2):103-9.
11. Van Zutphen LF. Use of animals in research: a science - society controversy? The European perspective. *ALTEX*. 2002;19(3):140-4.
12. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21:775-7.

13. Cossio-Bolaños M, Gómez Campos R, Vargas Vitoria R, Hochmuller Fogaça RT, de Arruda M. [Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats]. *Nutr Hosp*. 2013 Nov 1;28(6):2151-6.
14. Nussenzveig I. Envelhecimento renal. In: Carvalho Filho ET, Papaléo Netto M. (Ed.). *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 221-225.
15. Gamba CV, Caraviello AZ, Matsushita A, Alves GM, da Silva LN, Gomes GN, Gil FZ. Effects of dietary lipids on renal function of aged rats. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(2): 265-69.
16. Fernandez R, Piechnik J, Fabris R, Malnic G, Fernandes LC. Effect of chronic fish oil supplementation on renal function of normal and cachectic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37:1481-1489.
17. Ballak SB, Degens H, de Haan A, Jaspers RT. Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: A comparison of muscle aging in men and male rodents. *Ageing Res Rev*. 2014 Mar;14:43-55.
18. Tauchi H, Tsuboi K, Okutimi J. Age changes in the human kidney of the different races. *Gerontologia*. 1971;17:87–97.
19. Owen RA, Heywood R. Age-related variations in renal structure and function in Sprague–Dawley rats. *Toxicol Pathol*. 1986;14(2):158–67.
20. Arataki, M. Postnatal growth of kidney with special reference to the number and size of the glomeruli (albino rat). *Am J Anat*. 1926;36:399-436.
21. Newbold KM, Sandison A, Howie AJ. Comparison of size of juxtamedullary and outer cortical glomeruli in normal adult kidney. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992; 420(2): 127–129.
22. Silva FG. The aging kidney: a review – part I. *Int Urol Nephrol*. 2005;37:185-205.
23. Silva FG. The aging kidney: a review – part II. *Int Urol Nephrol*. 2005;37:419-32.
24. Goyal VK. Changes with age in the human kidney. *Exp Gerontol*. 1982; 17(5): 321–31.
25. Cortes P, Zhao X, Dumier F, Tilley BC, Atherton J. Age-Related Changes in Glomerular Volume and Hydroxyproline Content in Rat and Human. *J Am Soc Nephrol*. 1992; 2:1716-1725.

#### **4 CONCLUSÃO**

Este estudo permite concluir que a função renal, avaliada pela dosagem sérica de creatinina e ureia, mostrou ser inferior em ratos senis quando comparado a ratos jovens. A análise morfométrica e estereológica evidenciou atrofia renal, redução progressiva da densidade de volume e densidade numérica dos glomérulos renais associados ao processo de envelhecimento. Não foi encontrada hipertrofia glomerular compensatória nos ratos senis.

## REFERÊNCIAS

1. Moreira MM. O envelhecimento da população brasileira em nível regional: 1940-2050. In: XI Encontro nacional de estudos populacionais da Associação Brasileira de Estudos Populacionais, 1998, Caxambú/Minas Gerais. Anais do XI Encontro nacional de estudos populacionais da Associação Brasileira de Estudos Populacionais. Belo Horizonte/Brasil: ABEP; 1998. p. 3030-3124.
2. Truelsen, Bonita R, Jamrozik K. Surveillance of stroke: a global perspective. *Int J Epidemiol.* 2001;30(1):11-16.
3. Lima-Costa MF, Veras R. Saúde Pública e envelhecimento. *Cadernos de Saúde Pública.* 2003;19:700-701.
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 - Revisão 2008.* Rio de Janeiro: IBGE; 2008. [Last accessed January 12, 2015]. Available from [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao\\_da\\_populacao/2008/projecao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf).
5. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol.* 1998 Nov;33(7-8):639-53.
6. Jassal SV, Oreopoulos, DG. The aging kidney. *Geriatr Nephrol Urol.* 1998;8(3):141-7.
7. Tauchi H, Tsuboi K, Okutimi J. Age changes in the human kidney of the different races. *Gerontologia.* 1971;17:87-97.
8. Sesso R, Gordan P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. *J Bras Nefrol.* 2007;29 Suppl 1:9-12.
9. Pannarale G, Carbone R, Del Mastro G, Gallo C, Gattullo V, Natalicchio L, Navarra A, Tedesco A. The aging kidney: structural changes. *J Nephrol.* 2010 Sep-Oct;23 Suppl 15:S37-40.
10. Bertram JF. Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol.* 1995;161:111-72.
11. Gundersen HJG, Jensen EB. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J Microsc.* 1985;138(2):127-142.
12. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75(4):469-486.

13. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134:127-36.
14. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30(1):23-38.
15. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(5):1100-1123.
16. Catta-Preta M, Oliveira DA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. *Life Sci.* 2006;80:219–229.
17. Medeiros FJ, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Renal cortex remodeling in streptozotocin-induced diabetic spontaneously hypertensive rats treated with olive oil, palm oil and fish oil from Menhaden. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2006;75:357-365.
18. Wintour EM, Moritz KM, Johnson K, Ricardo S, Samuel CS, Dodic M. Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol.* 2003 Jun;549(pt 3):929-935.
19. Aguila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2003;55:187-195.
20. Cassotti G. Effects of season on kidney morphology in house sparrows. *J Exp Biol.* 2001;204(6):1201-1206.
21. Zeier M, Schonherr R, Amann K, Ritz E.: Effects of testosterone on glomerular growth after uninephrectomy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:2234-2240.
22. Dragan V.P., Vaughan J., Jordan V.C., Pitot H.C. Comparison of the effects of tamoxifen and toremifene on liver and kidney tumor promotion in female rats. *Carcinogenesis.* 1995;16:2733-2741.
23. Cibulskyte D, Engberg AS, Kristensen DH, Ellingsen AR, Pedersen M, Hoerlyck A, Flyvbjerg A, Marcussen N, Hansen HE, Madsen M, Mortensen J. Renal effects of long-term ciclosporin A treatment in a large animal model. *Nephron Exp Nephrol.* 2007;105(4):e91-7. Erratum in: *Nephron Exp Nephrol.* 2008;108(4):e79. Ringer Ellingsen, Anne [corrected to Ellingsen, Anne Ringer].
24. Dickinson H, Walker DW, Wintour EM, Moritz KM. Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(1):R453-461.

25. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. [monograph on the Internet] Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993. [Último acesso em 12 de Janeiro de 2015]. Disponível em: [http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental\\_Animals\\_Vol1.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf).
26. Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo, 2013.
27. Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. J Bras Patol Med Lab. 2007;43(5):329-37.
28. Sampaio KMOR, Araújo RB. Ultrasonographic measurement of linear characteristics and renal volumetry in dogs. Arq Bras Med Vet Zootec. 2002;54(3):248-54.
29. Mattfeldt T, Mobius HJ, Mall G. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects unknown orientation in space. J Microsc. 1985;139:279-89.
30. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc. 1984;134:127-36.
31. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Editora Santos; 1983. 123p.
32. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 11<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008. 524p.
33. Mandarim-de-Lacerda CA. Fisiologia e fisiopatologia: estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo. J Bras Nefrol. 2000;22(2):103-9.



## DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 2).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Citações e notas de rodapé**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 3).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e editoração**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 9).

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Faculdade de Ciências Médicas. Normas, Procedimentos e Orientações para publicação de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas. UNICAMP, 2008. Disponível em: <<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/Normas.pdf>>. Último acesso em: 01/02/2015.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Último acesso em: 01/02/2015.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>. Último acesso em: 01/02/2015.

Dicionário Priberam da Língua Portuguesa. Disponível em <<http://www.priberam.pt/DLPO/>>. Último acesso em: 01/02/2015.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1: DADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS

GRUPO 3 MESES	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10	Rato 11	Rato 12
<b>Ureia (mg/dL)</b>	52	49	43	44	40	38	45	37	31	41	41	45
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,4	0,8	0,5	0,5	0,6	0,3	0,6	0,3	0,5	0,5	0,7	0,7

GRUPO 6 MESES	Rato 13	Rato 14	Rato 15	Rato 16	Rato 17	Rato 18	Rato 19	Rato 20	Rato 21	Rato 22	Rato 23	Rato 24
<b>Ureia (mg/dL)</b>	50	41	41	59	47	54	36	49	50	41	50	41
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,4	0,4	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6

GRUPO 9 MESES	Rato 25	Rato 26	Rato 27	Rato 28	Rato 29	Rato 30	Rato 31	Rato 32	Rato 33	Rato 34	Rato 35	Rato 36
<b>Ureia (mg/dL)</b>	42	37	41	39	56	50	51	51	38	48	44	42
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9	1,2	0,9	0,9	0,9	1	0,9	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2

GRUPO 12 MESES	Rato 37	Rato 38	Rato 39	Rato 40	Rato 41	Rato 42	Rato 43	Rato 44	Rato 45	Rato 46	Rato 47	Rato 48
<b>Ureia (mg/dL)</b>	43	55	48	45	49	47	43	39	42	47	40	40
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9	0,9	0,9	0,8	0,5	0,9	0,5	0,7	0,8	1	0,7	0,3

GRUPO 18 MESES	Rato 49	Rato 50	Rato 51	Rato 52	Rato 53	Rato 54	Rato 55	Rato 56	Rato 57	Rato 58	Rato 59	Rato 60
<b>Ureia (mg/dL)</b>	29	43	37	44	39	40	63	33	44	36	37	32
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,7	0,5	0,9	0,6	0,9	0,7	1,1	0,9	0,6	0,7	0,9	0,7

GRUPO 24 MESES	Rato 61	Rato 62	Rato 63	Rato 64	Rato 65	Rato 66	Rato 67	Rato 68	Rato 69	Rato 70	Rato 71	Rato 72
<b>Ureia (mg/dL)</b>	49	34	45	37	45	36	36	100	44	36	36	37
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,5	1,1	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8	1,8	1	0,8	0,6	0,7

## APÊNDICE 2: DADOS DA MORFOMETRIA

GRUPO 3 MESES	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10	Rato 11	Rato 12
Peso do Animal (g)	376	408	383	353	328	343	386	376	396	438	367	395
Estatura do Animal (cm)	21	24	22,5	21,5	21	22	23,5	23,5	22,5	24	22	21
Peso do Rim Direito (g)	0,97	1,44	1,33	1,17	1,32	1,15	1,3	1,28	1,26	1,43	1,31	1,38
Comprimento Rim Direito (cm)	1,4	1,6	1,7	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Largura Rim Direito (cm)	0,9	1,1	1,1	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1
Espessura Rim Direito (cm)	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5
Volume do Rim Direito (mm <sup>3</sup> )	329,49	552,28	586,8	395,38	392,25	439,32	392,25	470,7	392,25	470,7	392,25	392,25

GRUPO 6 MESES	Rato 13	Rato 14	Rato 15	Rato 16	Rato 17	Rato 18	Rato 19	Rato 20	Rato 21	Rato 22	Rato 23	Rato 24
Peso do Animal (g)	499	422	422	406	555	481	453	404	432	494	445	476
Estatura do Animal (cm)	23,5	24	25	23	26,5	25,5	23,7	23,5	23,1	24,2	25	23,4
Peso do Rim Direito (g)	1,41	1,48	1,28	1,34	1,75	1,4	1,52	1,35	1,5	1,65	1,59	1,64
Comprimento Rim Direito (cm)	2,04	2,02	2	1,98	2,09	2	2,03	1,98	1,89	1,92	2,09	2,02
Largura Rim Direito (cm)	1,32	1,37	1,28	1,28	1,42	1,32	1,24	1,24	1,25	1,3	1,28	1,43
Espessura Rim Direito (cm)	0,84	0,84	0,81	8,4	0,78	0,74	0,76	0,82	0,84	0,89	0,85	0,81
Volume do Rim Direito (mm <sup>3</sup> )	1183	1215,77	1084,49	1113,41	1210,68	1021,73	1000,53	1052,93	1037,89	1161,81	1189,26	1223,69

GRUPO 9 MESES	Rato 25	Rato 26	Rato 27	Rato 28	Rato 29	Rato 30	Rato 31	Rato 32	Rato 33	Rato 34	Rato 35	Rato 36
Peso do Animal (g)	481	509	474	543	464	589	471	473	531	551	537	545
Estatura do Animal (cm)	26,8	27	27,5	27,5	25	27	25,5	26	26,5	28	26,5	27,5
Peso do Rim Direito (g)	1,16	1,26	1,29	1,42	1,3	1,67	1,29	1,07	1,34	1,33	1,54	1,46
Comprimento Rim Direito (cm)	1,92	1,98	1,95	2,04	2,02	2,15	2	1,75	2,05	2,05	2,05	1,95
Largura Rim Direito (cm)	1,29	1,23	1,23	1,45	1,28	1,35	1,2	1,2	1,4	1,2	1,35	1,3
Espessura Rim Direito (cm)	0,75	0,78	0,79	0,77	0,82	0,85	0,7	0,75	0,75	0,75	0,85	0,85
Volume do Rim Direito (mm <sup>3</sup> )	971,52	993,49	990,98	1191,21	1108,86	129,3	878,64	823,72	1125,75	964,93	1230,29	1126,93

GRUPO 12 MESES	Rato 37	Rato 38	Rato 39	Rato 40	Rato 41	Rato 42	Rato 43	Rato 44	Rato 45	Rato 46	Rato 47	Rato 48
Peso do Animal (g)	592	564	510	575	610	573	562	540	549	586	520	485
Estatura do Animal (cm)	30	27,5	29	26,5	28	27	27,5	24	26,5	26	26	26
Peso do Rim Direito (g)	1,72	1,7	1,33	1,4	1,48	1,54	1,32	1,35	1,36	1,64	1,55	1,43
Comprimento Rim Direito (cm)	2,1	2,1	1,9	2,1	2	2	2	1,9	2	2,1	2,1	2
Largura Rim Direito (cm)	1,35	1,4	1,25	1,3	1,4	1,4	1,3	1,35	1,3	1,4	1,3	1,4
Espessura Rim Direito (cm)	0,9	0,9	0,85	0,9	0,85	1	0,9	0,85	0,8	0,9	0,9	0,9
Volume do Rim Direito (mm <sup>3</sup> )	1334,43	1383,85	1055,8	1285,01	1244,74	1464,4	1223,82	1140,27	1087,84	1383,85	1285,01	1317,96

GRUPO 18 MESES	Rato 49	Rato 50	Rato 51	Rato 52	Rato 53	Rato 54	Rato 55	Rato 56	Rato 57	Rato 58	Rato 59	Rato 60
Peso do Animal (g)	592	470	441	573	520	673	412	478	570	618	531	634
Estatura do Animal (cm)	29	26	26	27	27	28	27	28	29	26	26	28
Peso do Rim Direito (g)	1,52	1,64	1,23	1,54	1,59	1,72	2,07	1,58	1,6	1,65	1,44	1,45
Comprimento Rim Direito (cm)	1,7	1,8	1,5	1,7	1,9	1,7	1,9	1,7	1,8	1,8	1,7	1,6
Largura Rim Direito (cm)	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1	1	1,1	1	1	1
Espessura Rim Direito (cm)	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7	0,9	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5
Volume do Rim Direito (mm <sup>3</sup> )	533,46	621,32	431,47	586,8	655,84	746,84	894,33	533,46	517,77	564,84	444,55	418,4

GRUPO 24 MESES	Rato 61	Rato 62	Rato 63	Rato 64	Rato 65	Rato 66	Rato 67	Rato 68	Rato 69	Rato 70	Rato 71	Rato 72
Peso do Animal (g)	532	580	539	616	456	561	527	469	469	612	464	460
Estatura do Animal (cm)	26	26	24	28	26	26	25	26	24	26	25	24
Peso do Rim Direito (g)	1,66	1,27	1,92	1,34	1,45	1,6	1,34	2,18	1,5	1,44	1,37	1,33
Comprimento Rim Direito (cm)	1,6	1,6	1,9	1,7	1,5	1,7	1,6	2	1,8	1,1	1,5	1,6
Largura Rim Direito (cm)	1	0,9	1,1	0,9	1	1,1	1	1,2	0,9	1	1	1
Espessura Rim Direito (cm)	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5
Volume do Rim Direito (mm <sup>3</sup> )	502,08	376,56	655,84	480,11	470,7	586,8	418,4	753,12	508,35	345,18	392,25	418,4

## APÊNDICE 3: DADOS DA ESTEREOLOGIA

GRUPO 3 MESES				
LÂMINAS	P	Vv[glom](%)	Nv[glom] (1/mm3)	Vol[glom] (µm3)
r1 1	54	12,857	156,42	8,22
r1 2	52	12,381	156,42	7,92
r1 3	50	11,905	166,11	7,17
r1 4	52	12,381	166,11	7,45
r1 5	59	14,048	157,12	8,94
r2 1	58	13,810	170,96	8,08
r2 2	52	12,381	156,42	7,92
r2 3	62	14,762	186,19	7,93
r2 4	57	13,571	164,04	8,27
r2 5	59	14,048	157,12	8,94
r3 1	49	11,667	161,27	7,23
r3 2	58	13,810	160,89	8,58
r3 3	54	12,857	170,96	7,52
r3 4	59	14,048	157,12	8,94
r3 5	57	13,571	164,04	8,27
r4 1	62	14,762	186,19	7,93
r4 2	49	11,667	161,27	7,23
r4 3	59	14,048	157,12	8,94
r4 4	58	13,810	160,89	8,58
r4 5	54	12,857	170,96	7,52
r5 1	57	13,571	164,04	8,27
r5 2	59	14,048	157,12	8,94
r5 3	49	11,667	161,27	7,23
r5 4	57	13,571	164,04	8,27
r5 5	58	13,810	160,89	8,58
r6 1	54	12,857	170,96	7,52
r6 2	52	12,381	160,89	7,70
r6 3	59	14,048	157,12	8,94
r6 4	62	14,762	186,19	7,93
r6 5	57	13,571	164,04	8,27
r7 1	50	11,905	166,11	7,17
r7 2	52	12,381	156,42	7,92
r7 3	54	12,857	170,96	7,52
r7 4	57	13,571	164,04	8,27
r7 5	52	12,381	166,11	7,45
r8 1	50	11,905	166,11	7,17
r8 2	49	11,667	161,27	7,23
r8 3	58	13,810	170,96	8,08
r8 4	57	13,571	164,04	8,27
r8 5	53	12,619	164,04	7,69
r9 1	62	14,762	186,19	7,93
r9 2	54	12,857	170,96	7,52
r9 3	50	11,905	166,11	7,17
r9 4	52	12,381	160,89	7,70
r9 5	59	14,048	157,12	8,94
r10 1	62	14,762	186,19	7,93
r10 2	52	12,381	156,42	7,92
r10 3	57	13,571	164,04	8,27
r10 4	62	14,762	186,19	7,93
r10 5	50	11,905	166,11	7,17
r11 1	53	12,619	164,04	7,69
r11 2	54	12,857	170,96	7,52
r11 3	57	13,571	164,04	8,27
r11 4	52	12,381	160,89	7,70
r11 5	54	12,857	170,96	7,52
r12 1	50	11,905	166,11	7,17
r12 2	62	14,762	186,19	7,93
r12 3	59	14,048	157,12	8,94
r12 4	52	12,381	160,89	7,70
r12 5	58	13,810	160,89	8,58

GRUPO 6 MESES				
LÂMINAS	P	Vv[glom](%)	Nv[glom] (1/mm3)	Vol[glom] (µm3)
r13 1	44	10,476	113,85	9,20
r13 2	41	9,762	141,20	6,91
r13 3	53	12,619	164,04	7,69
r13 4	42	10,000	113,85	8,78
r13 5	44	10,476	113,85	9,20
r14 1	52	12,381	155,04	7,99
r14 2	44	10,476	113,85	9,20
r14 3	47	11,190	155,04	7,22
r14 4	44	10,476	113,85	9,20
r14 5	43	10,238	134,97	7,59
r15 1	53	12,619	164,04	7,69
r15 2	41	9,762	141,20	6,91
r15 3	44	10,476	113,85	9,20
r15 4	57	13,571	164,04	8,27
r15 5	53	12,619	164,04	7,69
r16 1	44	10,476	113,85	9,20
r16 2	52	12,381	155,04	7,99
r16 3	41	9,762	134,97	7,23
r16 4	43	10,238	134,97	7,59
r16 5	40	9,524	134,97	7,06
r17 1	44	10,476	139,12	7,53
r17 2	53	12,619	164,04	7,69
r17 3	41	9,762	139,12	7,02
r17 4	45	10,714	133,58	8,02
r17 5	42	10,000	139,12	7,19
r18 1	45	10,714	133,58	8,02
r18 2	44	10,476	113,85	9,20
r18 3	53	12,619	164,04	7,69
r18 4	42	10,000	113,85	8,78
r18 5	44	10,476	113,85	9,20
r19 1	44	10,476	113,85	9,20
r19 2	38	9,048	119,05	7,60
r19 3	44	10,476	113,85	9,20
r19 4	38	9,048	119,05	7,60
r19 5	41	9,762	119,05	8,20
r20 1	44	10,476	113,85	9,20
r20 2	39	9,286	113,85	8,16
r20 3	28	6,667	113,85	5,86
r20 4	42	10,000	113,85	8,78
r20 5	44	10,476	113,85	9,20
r21 1	41	9,762	141,20	6,91
r21 2	46	10,952	141,20	7,76
r21 3	45	10,714	1335,83	8,02
r21 4	44	10,476	113,85	9,20
r21 5	52	12,381	160,89	7,70
r22 1	58	13,810	160,89	8,58
r22 2	42	10,000	113,85	8,78
r22 3	44	10,476	113,85	9,20
r22 4	45	10,714	133,58	8,02
r22 5	39	9,286	155,04	5,99
r23 1	58	13,810	160,89	8,58
r23 2	42	10,000	113,85	8,78
r23 3	46	10,952	141,20	7,76
r23 4	39	9,286	141,20	6,58
r23 5	41	9,762	141,20	6,91
r24 1	40	9,524	160,89	5,92
r24 2	44	10,476	160,89	6,51
r24 3	49	11,667	160,89	7,25
r24 4	52	12,381	160,89	7,70
r24 5	58	13,810	160,89	8,58

continua

GRUPO 9 MESES				
LÁMINAS	P	Vv[glom](%)	Nv[glom] (1/mm3)	Vol[glom] (µm3)
r25 1	49	11,667	161,27	7,23
r25 2	45	10,714	161,27	6,64
r25 3	42	10,000	161,27	6,20
r25 4	48	11,429	161,27	7,09
r25 5	49	11,667	161,27	7,23
r26 1	52	12,381	155,04	7,99
r26 2	44	10,476	155,04	6,76
r26 3	47	11,190	155,04	7,22
r26 4	42	10,000	155,04	6,45
r26 5	30	7,143	133,58	5,35
r27 1	37	8,810	133,58	6,60
r27 2	39	9,286	133,58	6,95
r27 3	42	10,000	133,58	7,49
r27 4	32	7,619	119,05	6,40
r27 5	30	7,143	119,05	6,00
r28 1	44	10,476	155,04	6,76
r28 2	47	11,190	155,04	7,22
r28 3	42	10,000	155,04	6,45
r28 4	39	9,286	155,04	5,99
r28 5	53	12,619	164,04	7,69
r29 1	44	10,476	164,04	6,39
r29 2	41	9,762	164,04	5,95
r29 3	57	13,571	164,04	8,27
r29 4	42	10,000	164,04	6,10
r29 5	32	7,619	134,97	5,65
r30 1	39	9,286	134,97	6,88
r30 2	35	8,333	139,12	5,99
r30 3	44	10,476	157,12	6,67
r30 4	46	10,952	157,12	6,94
r30 5	38	9,048	157,12	5,76
r31 1	40	9,524	157,12	6,06
r31 2	46	10,952	170,96	6,41
r31 3	37	8,810	170,96	5,15
r31 4	54	12,857	170,96	7,52
r31 5	38	9,048	130,12	6,95
r32 1	36	8,571	130,12	6,59
r32 2	33	7,857	130,12	6,04
r32 3	39	9,286	130,12	7,14
r32 4	42	10,000	130,12	7,69
r32 5	44	10,476	166,11	6,31
r33 1	38	9,048	156,42	5,78
r33 2	52	12,381	170,96	7,24
r33 3	59	14,048	186,19	7,55
r33 4	52	12,381	186,19	6,65
r33 5	49	11,667	186,19	6,27
r34 1	38	9,048	130,12	6,95
r34 2	34	8,095	130,12	6,22
r34 3	39	9,286	130,12	7,14
r34 4	37	8,810	130,12	6,77
r34 5	40	9,524	130,12	7,32
r35 1	48	11,429	156,42	7,31
r35 2	39	9,286	121,12	7,67
r35 3	44	10,476	145,35	7,21
r35 4	44	10,476	145,35	7,21
r35 5	47	11,190	186,19	6,01
r36 1	37	0,881	141,20	6,24
r36 2	41	9,762	141,20	6,91
r36 3	31	7,381	114,20	6,46
r36 4	29	6,905	114,20	6,05
r36 5	26	6,190	114,20	5,42

GRUPO 12 MESES				
LÁMINAS	P	Vv[glom](%)	Nv[glom] (1/mm3)	Vol[glom] (µm3)
r37 1	41	9,762	114,20	8,55
r37 2	38	9,048	114,20	7,92
r37 3	34	8,095	122,51	6,61
r37 4	38	9,048	145,35	6,23
r37 5	46	10,952	145,35	7,53
r38 1	32	7,619	122,51	6,22
r38 2	38	9,048	145,35	6,23
r38 3	36	8,571	114,20	7,51
r38 4	32	7,619	114,20	6,67
r38 5	36	8,571	114,20	7,51
r39 1	29	6,905	114,20	6,05
r39 2	32	7,619	114,20	6,67
r39 3	34	8,095	122,51	6,61
r39 4	29	6,905	122,51	5,64
r39 5	32	7,619	122,51	6,22
r40 1	43	10,238	122,51	8,36
r40 2	39	9,286	122,51	7,58
r40 3	26	6,190	112,13	5,52
r40 4	28	6,667	112,13	5,95
r40 5	36	8,571	112,13	7,64
r41 1	33	7,857	112,13	7,00
r41 2	28	6,667	112,13	5,95
r41 3	26	6,190	79,80	7,76
r41 4	17	4,048	79,80	5,07
r41 5	24	5,714	79,80	7,16
r42 1	34	8,095	122,51	6,61
r42 2	19	4,524	79,80	5,67
r42 3	20	4,762	65,75	7,24
r42 4	16	3,810	65,75	5,79
r42 5	21	5,000	65,75	7,60
r43 1	14	3,334	65,75	5,07
r43 2	28	6,667	112,13	5,95
r43 3	28	6,667	114,20	5,83
r43 4	30	7,143	114,20	6,25
r43 5	34	8,095	122,51	6,61
r44 1	36	8,571	114,20	7,51
r44 2	29	6,905	114,20	6,05
r44 3	22	5,238	73,37	7,14
r44 4	28	6,667	112,13	5,95
r44 5	16	3,810	73,37	5,19
r45 1	14	3,334	73,37	4,54
r45 2	34	8,095	122,51	6,61
r45 3	22	5,238	73,37	7,14
r45 4	28	6,667	112,13	5,95
r45 5	16	3,810	73,37	5,19
r46 1	14	3,334	73,37	4,54
r46 2	34	8,095	122,51	6,61
r46 3	28	6,667	112,13	5,95
r46 4	28	6,667	112,13	5,95
r46 5	31	7,381	114,20	6,46
r47 1	29	6,905	114,20	6,05
r47 2	26	6,190	114,20	5,42
r47 3	41	9,762	114,20	8,55
r47 4	38	9,048	114,20	7,92
r47 5	34	8,095	122,51	6,61
r48 1	38	9,048	145,35	6,23
r48 2	16	3,810	73,37	5,19
r48 3	14	3,334	73,37	4,54
r48 4	29	6,905	114,20	6,05
r48 5	22	5,238	73,37	7,14

continua

GRUPO 18 MESES				
LÁMINAS	P	Vv[glom](%)	Nv[glom] (1/mm3)	Vol[glom] (µm3)
r49 1	19	4,524	54,68	8,27
r49 2	17	4,048	74,06	5,47
r49 3	21	5,000	74,06	6,75
r49 4	24	5,714	74,06	7,72
r49 5	21	5,000	74,06	6,75
r50 1	19	4,524	77,52	5,84
r50 2	18	4,286	59,52	7,20
r50 3	16	3,810	59,52	6,40
r50 4	19	4,524	59,52	7,60
r50 5	16	3,810	59,52	6,40
r51 1	17	4,048	59,52	6,80
r51 2	22	5,238	92,75	5,65
r51 3	21	5,000	74,06	6,75
r51 4	26	6,190	92,75	6,67
r51 5	28	6,667	92,75	7,19
r52 1	24	5,714	92,75	6,16
r52 2	16	3,810	60,22	6,33
r52 3	12	2,857	60,22	4,74
r52 4	16	3,810	60,22	6,33
r52 5	19	4,524	60,22	7,51
r53 1	24	5,714	60,22	9,49
r53 2	22	5,238	113,51	4,61
r53 3	34	8,095	113,51	7,13
r53 4	23	5,476	95,52	5,73
r53 5	15	3,571	80,98	4,41
r54 1	19	4,524	80,98	5,59
r54 2	16	3,810	60,22	6,33
r54 3	22	5,238	80,98	6,47
r54 4	26	6,190	92,75	6,67
r54 5	22	5,238	100,36	5,22
r55 1	19	4,524	100,36	4,51
r55 2	11	2,619	53,30	4,91
r55 3	12	2,857	53,30	5,36
r55 4	11	2,619	53,30	4,91
r55 5	16	3,810	53,30	7,15
r56 1	14	3,334	61,60	5,41
r56 2	14	3,334	42,22	7,90
r56 3	12	2,857	42,22	6,77
r56 4	16	3,810	42,22	9,02
r56 5	9	2,143	42,22	5,08
r57 1	10	2,381	42,22	5,64
r57 2	17	4,048	64,37	6,29
r57 3	16	3,810	42,22	9,02
r57 4	26	6,190	106,59	5,81
r57 5	19	4,524	66,45	6,81
r58 1	11	2,619	53,30	4,91
r58 2	16	3,810	66,45	5,73
r58 3	19	4,524	66,45	6,81
r58 4	22	5,238	66,45	7,88
r58 5	19	4,524	66,45	6,81
r59 1	20	4,762	66,45	7,17
r59 2	19	4,524	61,60	7,34
r59 3	21	5,000	61,60	8,12
r59 4	18	4,286	61,60	6,96
r59 5	17	4,048	61,60	6,57
r60 1	14	3,334	61,60	5,41
r60 2	16	3,810	42,22	9,02
r60 3	22	5,238	75,44	6,94
r60 4	19	4,524	66,45	6,81
r60 5	16	3,810	66,45	5,73

GRUPO 24 MESES				
LÁMINAS	P	Vv[glom](%)	Nv[glom] (1/mm3)	Vol[glom] (µm3)
r61 1	9	2,143	31,84	6,73
r61 2	11	2,619	31,84	8,23
r61 3	9	2,143	31,84	6,73
r61 4	9	2,143	31,84	6,73
r61 5	8	1,905	31,84	5,98
r62 1	12	2,857	35,30	8,09
r62 2	11	2,619	35,30	7,42
r62 3	10	2,381	35,30	6,75
r62 4	8	1,905	35,30	5,40
r62 5	10	2,381	35,30	6,75
r63 1	10	2,381	31,15	7,64
r63 2	11	2,619	31,15	8,41
r63 3	9	2,143	31,15	6,88
r63 4	8	1,905	31,15	6,12
r63 5	7	1,667	31,15	5,35
r64 1	10	2,381	31,15	7,64
r64 2	11	2,619	31,15	8,41
r64 3	9	2,143	31,15	6,88
r64 4	8	1,905	31,15	6,12
r64 5	7	1,667	31,15	5,35
r65 1	8	1,905	20,76	9,17
r65 2	6	1,429	20,76	6,88
r65 3	4	0,952	20,76	4,58
r65 4	5	1,190	20,76	5,73
r65 5	7	1,667	20,76	8,03
r66 1	8	1,905	22,15	8,60
r66 2	6	1,429	22,15	6,45
r66 3	4	0,952	22,15	4,30
r66 4	6	1,429	22,15	6,45
r66 5	8	1,905	22,15	8,60
r67 1	9	2,143	29,76	7,20
r67 2	6	1,429	29,76	4,80
r67 3	8	1,905	29,76	6,40
r67 4	11	2,619	29,76	8,80
r67 5	9	2,143	29,76	7,20
r68 1	8	1,905	23,53	8,10
r68 2	6	1,429	23,53	6,07
r68 3	4	0,952	23,53	4,05
r68 4	6	1,429	23,53	6,07
r68 5	10	2,381	23,53	10,12
r69 1	8	1,905	24,23	7,86
r69 2	7	1,667	24,23	6,88
r69 3	8	1,905	24,23	7,86
r69 4	5	1,190	24,23	4,91
r69 5	7	1,667	24,23	6,88
r70 1	8	1,905	24,23	7,86
r70 2	7	1,667	24,23	6,88
r70 3	8	1,905	24,23	7,86
r70 4	5	1,190	24,23	4,91
r70 5	7	1,667	24,23	6,88
r71 1	8	1,905	20,76	9,17
r71 2	6	1,429	20,76	6,88
r71 3	4	0,952	20,76	4,58
r71 4	5	1,190	20,76	5,73
r71 5	7	1,667	20,76	8,03
r72 1	8	1,905	22,15	8,60
r72 2	6	1,429	22,15	6,45
r72 3	4	0,952	22,15	4,30
r72 4	6	1,429	22,15	6,45
r72 5	8	1,905	22,15	8,60

#### APÊNDICE 4: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – PESO DOS ANIMAIS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Peso do Animal (g)</b>	3 meses	12	379,1	379,5	328	438	29,6	
	6 meses	12	457,4	449,0	404	555	45,0	
	9 meses	12	514,0	520,0	464	589	40,9	
	12 meses	12	555,5	563,0	485	610	36,5	
	18 meses	12	542,7	550,5	412	673	81,3	
	24 meses	12	523,8	529,5	456	616	59,8	<0,001

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Grupos comparados (peso dos animais)	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	0,009
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	0,003
9 x 12	0,054
9 x 18	0,180
9 x 24	0,646
12 x 18	0,546
12 x 24	0,138
18 x 24	0,374

## APÊNDICE 5: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – ESTATURA DOS ANIMAIS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Estatuta do Animal (cm)</b>	3 meses	12	22,4	22,3	21	24	1,15	
	6 meses	12	24,2	23,9	23	26,5	1,08	
	9 meses	12	26,7	26,9	25	28	0,89	
	12 meses	12	27,0	26,8	24	30	1,57	
	18 meses	12	27,3	27,0	26	29	1,14	
	24 meses	12	25,5	26,0	24	28	1,17	<0,001

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Grupos comparados (estatura dos animais)	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	<0,001
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	0,009
9 x 12	0,583
9 x 18	0,288
9 x 24	0,013
12 x 18	0,606
12 x 24	0,003
18 x 24	0,001



## APÊNDICE 6: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – PESO DO RIM DIREITO DOS ANIMAIS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Peso do Rim Direito (g)</b>	3 meses	12	1,28	1,31	0,97	1,44	0,13	
	6 meses	12	1,49	1,49	1,28	1,75	0,14	
	9 meses	12	1,34	1,32	1,07	1,67	0,16	
	12 meses	12	1,49	1,46	1,32	1,72	0,14	
	18 meses	12	1,59	1,59	1,23	2,07	0,20	
	24 meses	12	1,53	1,45	1,27	2,18	0,27	0,001

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Grupos comparados (peso rim direito)	Valor de p
3 x 6	0,005
3 x 9	0,378
3 x 12	0,007
3 x 18	<0,001
3 x 24	0,001
6 x 9	0,050
6 x 12	0,920
6 x 18	0,213
6 x 24	0,584
9 x 12	0,062
9 x 18	0,002
9 x 24	0,013
12 x 18	0,179
12 x 24	0,517
18 x 24	0,482

## APÊNDICE 7: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – VOLUME DO RIM DIREITO DOS ANIMAIS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Volume do Rim Direito (mm<sup>3</sup>)</b>	3 meses	12	433,8	393,8	329,5	586,8	74,58	
	6 meses	12	1124,6	1137,6	1000,5	1223,7	82,5	
	9 meses	12	961,3	992,2	129,3	1230,3	289,4	
	12 meses	12	1267,2	1285,0	1055,8	1464,4	124,0	
	18 meses	12	579,1	549,2	418,4	894,3	137,9	
	24 meses	12	492,3	475,4	345,2	753,1	120,8	<0,001

\*ANOVA com um fator, p<0,05

Grupos comparados (volume rim direito)	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	0,025
3 x 24	0,360
6 x 9	0,012
6 x 12	0,028
6 x 18	<0,001
6 x 24	<0,001
9 x 12	<0,001
9 x 18	<0,001
9 x 24	<0,001
12 x 18	<0,001
12 x 24	<0,001
18 x 24	0,176

## APÊNDICE 8: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – URÉIA E CREATININA

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Ureia (mg/dL)</b>	3 meses	12	42,2	42	31	52	5,6	
	6 meses	12	46,6	48	36	59	6,7	
	9 meses	12	44,9	43	37	56	6,1	
	12 meses	12	44,8	44	39	55	4,6	
	18 meses	12	39,8	38	29	63	8,7	
	24 meses	12	44,6	37	34	100	18,1	0,557

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	3 meses	12	0,53	0,50	0,3	0,8	0,16	
	6 meses	12	0,56	0,60	0,4	0,7	0,09	
	9 meses	12	1,03	1,05	0,9	1,2	0,13	
	12 meses	12	0,74	0,80	0,3	1	0,21	
	18 meses	12	0,77	0,70	0,5	1,1	0,17	
	24 meses	12	0,90	0,85	0,5	1,8	0,33	<0,001

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Grupos comparados (Creatinina sérica)	Valor de p
3 x 6	0,756
3 x 9	<0,001
3 x 12	0,011
3 x 18	0,005
3 x 24	<0,001
6 x 9	<0,001
6 x 12	0,025
6 x 18	0,011
6 x 24	<0,001
9 x 12	0,001
9 x 18	0,001
9 x 24	0,101
12 x 18	0,756
12 x 24	0,052
18 x 24	0,101

## APÊNDICE 9: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – DENSIDADE DE VOLUME DOS GLOMÉRULOS RENAIIS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Vv[glom] (%)</b>	3 meses	12	13,18	13,26	12,62	13,71	0,37	
	6 meses	12	10,72	10,81	9,38	11,81	0,66	
	9 meses	12	9,94	10,24	7,81	11,91	1,15	
	12 meses	12	6,90	6,41	5,24	9,38	1,32	
	18 meses	12	4,50	4,36	3,10	5,62	0,83	
	24 meses	12	1,82	1,67	1,43	2,43	0,35	<0,001

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Grupos comparados (Vv[glom])	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	0,029
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	<0,001
9 x 12	<0,001
9 x 18	<0,001
9 x 24	<0,001
12 x 18	<0,001
12 x 24	<0,001
18 x 24	<0,001

## APÊNDICE 10: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – DENSIDADE NUMÉRICA DOS GLOMÉRULOS RENAIIS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Nv[glom] (1/mm<sup>3</sup>)</b>	3 meses	12	165,77	166,21	160,44	171,79	3,13	
	6 meses	12	135,32	135,10	113,85	160,89	12,89	
	9 meses	12	148,71	150,82	125,00	177,19	15,78	
	12 meses	12	105,95	106,31	79,91	128,32	14,75	
	18 meses	12	69,49	65,55	46,10	92,75	12,44	
	24 meses	12	26,42	24,23	20,76	35,30	5,07	<0,001

\*ANOVA com um fator, p<0,05

Grupos comparados (Nv[glom])	Valor de p
3 x 6	<0,001
3 x 9	0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	0,007
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	<0,001
9 x 12	<0,001
9 x 18	<0,001
9 x 24	<0,001
12 x 18	<0,001
12 x 24	<0,001
18 x 24	<0,001

## APÊNDICE 11: COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS – VOLUME MÉDIO GLOMERULAR

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
<b>Vol[glom] (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	3 meses	12	7,96	7,99	7,67	8,26	0,20	
	6 meses	12	8,00	8,03	7,19	8,58	0,40	
	9 meses	12	6,68	6,73	6,22	7,08	0,24	
	12 meses	12	6,45	6,48	5,83	7,37	0,51	
	18 meses	12	6,56	6,66	5,37	7,26	0,54	
	24 meses	12	6,88	6,88	6,88	6,88	0,001	<0,001

\*ANOVA com um fator,  $p < 0,05$

Grupos comparados (Vol[glom])	Valor de p
3 x 6	0,792
3 x 9	<0,001
3 x 12	<0,001
3 x 18	<0,001
3 x 24	<0,001
6 x 9	<0,001
6 x 12	<0,001
6 x 18	<0,001
6 x 24	<0,001
9 x 12	0,144
9 x 18	0,457
9 x 24	0,178
12 x 18	0,467
12 x 24	0,006
18 x 24	0,039

## ANEXOS

## ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFPR.



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 463

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.032620/2010-10

APROVADO: 17/08/2010 – R.O. 07/2010

TÍTULO: Avaliação anátomo-fisiológica do envelhecimento urogenital masculino

AUTORES: Rogério de Fraga, Édison Luiz P. Farias, Djanira Veronez, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Marta Margarete Cestari, Helena Cristina Silva de Assis, Francisco Filipak Neto, Alanna Silva Huk, Larissa Remonti Bessani

DEPARTAMENTO: Anatomia

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador do CEEA