

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO PEREIRA DE MIRANDA

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DOS EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA
ESPERMATOGÊNESE EM TESTÍCULO DE RATOS**

CURITIBA

2017

EDUARDO PEREIRA DE MIRANDA

**ANÁLISE ESTEREOOLÓGICA DOS EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA
ESPERMATOGÊNESE EM TESTÍCULO DE RATOS**

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

Coorientador: Dr. Fernando Lorenzini

CURITIBA

2017

M672 Miranda, Eduardo Pereira de
Análise estereológica dos efeitos do envelhecimento na
espermatoogênese em testículo de ratos / Eduardo Pereira de Miranda. –
Curitiba, 2017.
58 f. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rogerio de Fraga
Coorientador: Fernando Lorenzini
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica
Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do
Paraná.

1. Envelhecimento.
 2. Espermatoogênese.
 3. Infertilidade.
 4. Testículos.
 5. Ratos.
 6. Espermátides.
- I. Fraga, Rogério de.
II. Lorenzini, Fernando. III. Programa de Pós-Graduação em Clínica
Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.



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 437ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Eduardo Peréira de Miranda** com o trabalho intitulado: "ANÁLISE ESTEREOOLÓGICA DOS EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA ESPERMATOGÉNESE EM TESTÍCULO DE RATOS". Área de Concentração: Clínica Cirúrgica, Linha de Pesquisa: Diagnóstico e Avaliação das repercussões da resposta inflamatória clínica e experimental em cirúrgica, tendo como orientador o Professor Doutor **Rogerio de Fraga**.

As sete horas e trinta minutos do dia dezessete de julho de dois mil e dezessete, no auditório da CTCV - sala 702 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes doutores: Alexandre Cavalheiro Cavalli, Luiz Sérgio Santos, Renato Tambara Filho, sendo este último presidente da banca. Aberta a sessão, foi apresentada 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, que será assinada pelos seguintes membros.

Alexandre Cavalheiro Cavalli

Luiz Sérgio Santos

Renato Tambara Filho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas a oportunidades que tive e que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais, Leila e José Cláudio, pelo exemplo, educação e por sempre acreditarem em mim.

À minha esposa e filha, Christine e Sophia, companheiras e ao mesmo tempo críticas, pelo apoio, amor e cumplicidade.

Ao Professor Doutor Rogério de Fraga por me permitir fazer parte deste projeto e me orientar na realização de mais essa etapa de minha formação.

Ao Doutor Fernando Lorenzini por dividir seu conhecimento e, como co-orientador, ajudar a desenvolver este trabalho.

À Professora Doutora Djanira Veronez, pelo auxilio no experimento e leitura das lâminas.

Aos amigos e companheiros na realização do experimento Eduardo F. Mechiorretto, Marcelo Zeni, Bruno V. D. Neves, Thiago Hota e Gustavo L. Marques.

Aos colegas de residência e amigos pra vida toda, Christian Artner, Rafael C. Cavalli, Mateus Belote, Roberto Kinchescki, Bruno Toninello e Gino Pigatto por todo companheirismo e ajuda durante a formação em urologia.

Ao Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós- graduação em Clínica Cirúrgica

Agradeço à CAPES, que por meio da bolsa de pesquisa contribuiu com os custos do projeto.

Aos professores, funcionários e colegas da Disciplina de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela ótima formação e pelos bons anos de aprendizado dentro do hospital.

“O maior inimigo do conhecimento
não é a ignorância; é a ilusão do
conhecimento”

(Stephen Hawking)

RESUMO

Introdução: O envelhecimento é um processo degenerativo inevitável. O testículo, assim como todos os órgãos, passa por esse processo e o conhecimento de suas consequências é importante também para o estudo da fertilidade no homem idoso. **Objetivos:** Analisar quantitativamente, por meio da estereologia e morfometria, a espermatogênese em ratos submetidos ao processo natural de envelhecimento. **Métodos:** Estudo experimental utilizando 72 ratos Wistar, divididos em 6 grupos de acordo com a idade no momento da eutanásia: 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses, submetidos à orquiectomia e à coleta de fragmentos do parênquima testicular, para análise histológica estereológica e morfométrica. Por meio do estudo estereológico foi obtida a densidade numérica de espermátides e pelo estudo morfométrico foi obtida a altura do epitélio germinativo e a área do túbulo seminífero. **Resultados:** Houve uma redução estatisticamente significativa da densidade numérica de espermátides somente nos grupos 18 e 24 meses de vida. A altura do epitélio germinativo não apresentou diferença significativa entre os grupos. A área dos túbulos seminíferos apresentou uma pequena redução, com significância estatística, entre os grupos de ratos jovens e idosos. **Conclusão:** O processo natural de envelhecimento dos ratos apresentou redução significativa da densidade numérica de espermátides e área dos túbulos seminíferos, mais acentuadamente nos ratos com 18 e 24 meses de vida, ou seja, no terço final de suas vidas.

Palavras-chave: envelhecimento; espermatogênese; infertilidade; testículo; ratos; estereologia; morfometria; densidade numérica; espermátides.

ABSTRACT

Introduction: Aging is an inevitable degenerative process, and the testes, like all organs, undergo this process. The knowledge of the consequences of aging on the functions of the testes is important for the study of fertility in elderly men. **Objectives:** This study was aimed at quantifying, through stereological and morphometric analysis, spermatogenesis in rats undergoing the natural aging process. **Methods:** Seventy-two male Wistar rats were divided into 6 equal groups according to age at the time of killing: 3, 6, 9, 12, 18, and 24 months. All the rats were subjected orchectomy and collection of testicular parenchymal fragments for histological and morphometric analysis. The numerical density of spermatids was calculated using a stereological study, and morphometric analysis was conducted to measure the height of the germinal epithelium and the area of the seminiferous tubules. **Results:** We found that the 18 and 24 months groups showed a significant reduction in the number of spermatids. However, the height of the germinal epithelium was not significantly different between the groups. The area of seminiferous tubules was also significantly reduced in the elderly rats compared to that in the young ones. **Conclusion:** Aging of rats showed a significant reduction in the number of spermatids and the area of the seminiferous tubules, more pronounced in the rats at 18 and 24 months of life, that is, in the final third of their lives.

Keywords: aging; spermatogenesis; infertility; testis; rats; stereology; morphometry; numerical density; spermatids

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 GRUPOS.....	14
2.2 EXPERIMENTAÇÃO.....	14
2.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA.....	15
2.3.1 Coloração de Hematoxilina & Eosina (HE).....	16
2.3.2 Captura de Imagens e Análise das Lâminas.....	17
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3 ARTIGO CIENTÍFICO	19
4 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
DOCUMENTOS CONSULTADOS	37
APÊNDICES.....	38
ANEXOS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo contínuo e inevitável que ocorre em todas as espécies, que leva à piora funcional de múltiplos sistemas desencadeando um aumento da morbidade e, finalmente, à morte¹. No nível biológico, esse processo é associado ao acúmulo de uma grande variedade de danos moleculares e celulares. Com o tempo, esse dano leva a uma perda gradual nas reservas fisiológicas, um aumento do risco de contrair diversas doenças e um declínio geral na capacidade intrínseca do indivíduo. Porém, essas mudanças não são lineares ou consistentes e são apenas vagamente associadas à idade de uma pessoa em anos².

Nas últimas décadas houve uma profunda mudança no perfil demográfico mundial, com diminuição das taxas de mortalidade e natalidade, associada a um aumento da expectativa vida, levando a um envelhecimento populacional. Segundo a relatório da nações unidas de 2007, a expectativa de vida mundial foi de 47 anos na década de 1950 para 65 anos nos anos 2000 e podendo chegar a 75 em 2045-2050³. No Brasil, segundo o censo demográfico de 2010 do IBGE, há aproximadamente 20 milhões de idosos e estima-se que em 2020 haverá uma população com cerca de 32 milhões de indivíduos idosos⁴. O envelhecimento da população trouxe à luz uma necessidade de inclusão dessas pessoas na sociedade e na economia, além de aumentar a importância de conhecer as alterações biológicas ocorridas no envelhecimento³.

Em conjunto com a mudança do perfil populacional e queda das taxas de natalidade, houve também uma alteração no comportamento dos casais, que devido a aspectos culturais e preocupações profissionais, assim como melhora dos métodos anticoncepcionais, postergam a paternidade para idades cada vez mais tardias. Isso, associado à utilização de técnicas de reprodução assistida, torna as consequências do envelhecimento gonadal mais evidentes e conhecer suas alterações se torna importante para uma melhor assistência aos indivíduos⁵.

A gônada masculina é o testículo, estruturas pares localizadas dentro do escroto e que são responsáveis por funções reprodutivas e endócrinas. O parênquima testicular é envolto por uma cápsula dura, a túnica albugínea, composta por músculo liso e colágeno. Internamente, os testículos possuem túbulos contorcidos denominados túbulos seminífero; cada túculo tem aproximadamente 1m

de comprimento, os túbulos seminíferos contêm células germinativas (espermatoxênas, espermatócitos e espermátides) e células de suporte (células de Sertoli). Entre os túbulos existe um tecido intersticial composto de células de Leydig (produtoras de testosterona), mastócitos, macrófagos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. O tecido germinativo corresponde a aproximadamente 80% do volume testicular^{6,7}

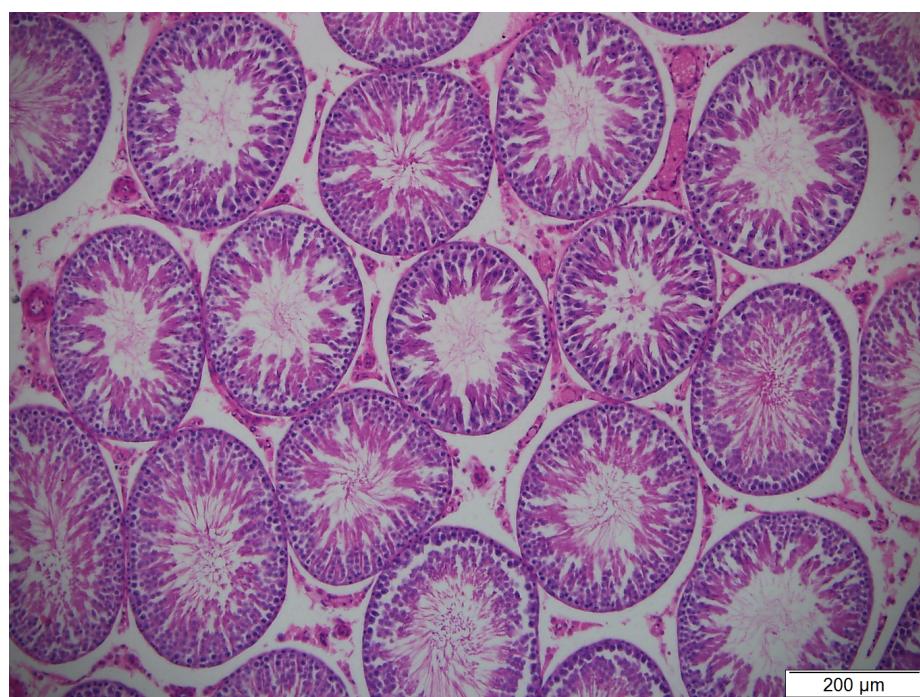
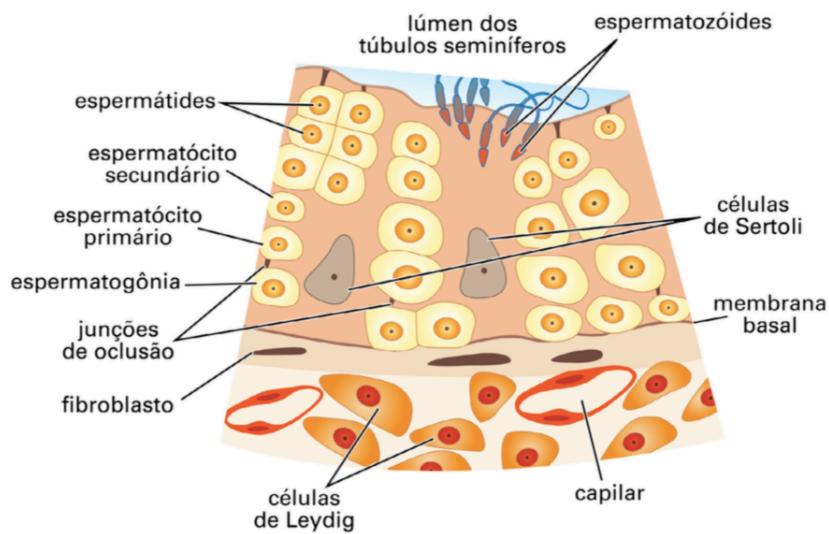


FIGURA 1: Ilustração da histologia do túbulo seminífero dos testículos (acima) e microscopia do testículo de rato (abaixo). Fontes: Imagem à esquerda adaptada de Curi, 2009 e imagem da direita de arquivo do autor (2014)

A regulação das funções testiculares é feita pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que a partir da produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) estimula a hipófise a produzir as gonadotrofinas (FSH e LH) que, por sua vez, estimulam a espermatogênese (FSH) e a produção de testosterona (LH) pelos testículos. O eixo reprodutor masculino de hormônios e órgãos é um sistema biológico eficiente, bem orquestrado e administrado com precisão. É responsável pela formação e desenvolvimento do aparelho reprodutor, pelo potencial de fertilidade na puberdade e pela manutenção de características masculinas na idade adulta^{7,8}.

Nos mamíferos o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases distintas: a primeira é a fase proliferativa ou espermatogonal, em que as espermatogônias proliferam e dão origem aos espermatócitos primários e, ao mesmo tempo, renovam a população espermatogonal necessária para a manutenção do processo; a segunda fase é a fase meiótica, que envolve divisões reducionais dos espermatócitos, que resultam na formação de células haplóides, as espermátidess; a terceira fase, é a espermiogênese e se caracteriza por uma complexa série de transformações citológicas das espermátidess, que se convertem em células altamente especializadas, os espermatozoides⁹¹⁰. Este processo dura, em média, 64 dias (42-76 dias) em homens¹¹, e em ratos o ciclo leva, em média, 55 dias (52- 59 dias)¹⁰.

Embora a espermatogênese continue por toda a vida, a quantidade e a qualidade do processo no homem idoso está diminuída em relação ao homem jovem^{12,13,14}, porém é difícil precisar em qual momento da vida do homem essa queda se torna mais acentuada, já que, diferentemente das mulheres que apresentam um sinal clínico da falência ovariana, os homens não apresentam um sinal preciso de falência testicular¹². Com o envelhecimento o desempenho das funções testiculares é afetado¹⁵ e a gônada masculina envelhecida apresenta alterações estruturais e morfológicas¹⁴, alterações estas que estão associadas com a piora na qualidade do esperma e fertilidade¹⁶. A queda da qualidade seminal em homens idosos pode estar relacionada, além da infertilidade, a um aumento da

ocorrência de complicações durante a gestação e algumas patologias como: autismo, esquizofrenia, bipolaridade e acondroplasia¹⁷.

As características morfológicas e funções das células espermatogênicas são, em grande parte, baseadas na integração da estrutura histológica do testículo. O envelhecimento pode diminuir o tamanho testicular e o número de células germinativas, células de Sertoli, células de Leydig e células peritubulares no testículo durante o processo de envelhecimento^{15,18,19,20}. E a espermatogênese está intimamente associada às alterações morfológicas do testículo¹⁰. Análises estruturais dos testículos humanos envelhecidos revelaram que a maturação da espermatogênese foi interrompida nos níveis de espermatócito^{14,21}.

As análises quantitativas vêm sendo amplamente utilizadas em estudos relacionados aos testículos com o intuito de determinar alterações sofridas pelo órgão. Enquanto em técnicas morfométricas a medida das estruturas é realizada em cortes bidimensionais de maneira direta, a estereologia baseia-se em princípios geométricos e estatísticos, para descrever/estimar a estrutura tridimensional e a disposição espacial de espécimes biológicos a partir de finos cortes bidimensionais^{22,23}. Essa técnica foi usada em estudos anteriores para avaliar parâmetros do túbulo seminífero e células germinativas^{20,23,24}.

O modelo utilizado no presente experimento permite analisar os efeitos do envelhecimento, minimizando a interferência de outras condições e foi conduzido com o intuito de estabelecer com maior precisão o momento em que ocorre a maior queda dos elementos morfológicos, celulares e estruturais da espermatogênese.

1.1 OBJETIVO

O presente estudo experimental, utilizando ratos submetidos ao processo natural de envelhecimento, analisando elementos da espermatogênese em diferentes idades, tem por objetivos:

- 1) Descrever e quantificar as modificações histológicas relacionadas à densidade numérica de espermátides, altura do epitélio germinativo e área do túbulo seminífero no processo natural de envelhecimento do testículo.
- 2) Estabelecer o momento do processo de envelhecimento em que ocorrem modificações significativas no epitélio germinativo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram observados todos os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Experimental Animals”²⁵. 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 7^a Reunião Ordinária do CEEA de 2010 (17/08/2010, certificado 463) sob o processo número 23075.032620/2010-10.

2.1 GRUPOS

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 em gaiolas de polietileno com medidas de 60x50x22cm devidamente identificadas com o título do estudo e a data de nascimento dos animais, distribuídos em três por gaiola (FIGURA 2). Foram submetidos a uma temperatura controlada em 22 °C, 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 experimento²⁶.

Os animais foram divididos em 6 grupos, com 12 animais cada, sacrificados em diferentes idades: grupo 1 com 3 meses, grupo 2 com 6 meses, grupo 3 com 9 meses, grupo 4 com 12 meses, grupo 5 com 18 meses e grupo 6 com 24 meses.

2.2 EXPERIMENTAÇÃO

Os animais que seriam submetidos ao procedimento foram 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 o procedimento, os animais foram submetidos à anestesia com solução de cloridrato de quetamina (57,67mg / ml) associada à 2% de cloridrato de xilazina

(2g), com aplicação de 1ml/1000 gramas de peso vivo, via injeção intraperitoneal em condições assépticas. O procedimento consistiu na realização de laparotomia e toracotomia mediana e subsequente incisão cardíaca com indução de parada cardiorrespiratória por exsanguinação.

Em seguida, o experimento prosseguiu com a orquiectomia bilateral por meio da dissecção dos testículos, ligadura e secção do funículo espermático. O testículo esquerdo foi imediatamente congelado sob a temperatura de -80°C (para ser usado em outro estudo) e o testículo direito foi submetido à pesagem e mensuração de suas dimensões (comprimento, largura e espessura) para posterior para análise morfológica, morfométrica e estereológica (FIGURA 2).



FIGURA 2: Aferição das medidas do testículo com paquímetro digital.
FONTE: O Autor (2013)

2.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA

Os testículos direitos foram pesados em balança de precisão semianalítica (Shimadzu, BL220S) e suas dimensões foram obtidas utilizando-se paquímetro digital (Digimess®).

Os testículos direitos foram submetidos a uma incisão única de 2mm, em extensão e profundidade, no terço superior, médio e inferior para melhor penetração do fixador, em seguida foram submersos em ALFAC (álcool 80%, formaldeído e ácido acético) por 16 horas. Após esta fixação, os testículos permaneceram em álcool 70%, seguido da desidratação em uma série decrescente de concentrações de xanol e álcoois, foram seccionados transversalmente no terço médio e divididos em duas porções iguais (superior e inferior). Estas duas porções foram novamente seccionadas ao meio no sentido transversal para posterior inclusão em bloco de parafina.

Em seguida, os testículos foram submetidos a cortes sucessivos em micrótomo com 5 μ m de espessura (American Optical, Spencer AO 820). Para obtenção de cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos utilizou-se o método do *Orientatior*²⁷, desta forma, após a obtenção deste segmento intermediário do testículo separado por dois cortes paralelos, foi possível a aquisição de duas faces de corte que se comportaram como planos iniciais de análise. Apoiado sobre o primeiro plano de corte procede-se um segundo corte, perpendicular ao primeiro, mas com direção aleatória. Posteriormente, apoiou-se a parte restante do segmento do órgão sobre a segunda face de corte e procedeu-se o terceiro corte, perpendicular ao segundo, mas com direção também aleatória. Desta forma, o parênquima testicular, inicialmente anisotrópico, passou a apresentar uma organização uniformemente isotrópica. Para a realização do cálculo da densidade numérica de espermátides utilizou-se o método *Physical Disector*²⁸ e a amostragem do tecido testicular foi realizada com dois cortes consecutivos excluindo, entre eles, três cortes com 5 μ m, representando uma espessura de 25 μ m entre os planos para a determinação dos parâmetros quantitativos tridimensionais das espermátides a partir de cortes bidimensionais.

Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas com três cortes de cada amostragem para a execução das técnicas histoquímicas com coloração pela hematoxilina & eosina (HE).

2.3.1 Coloração de Hematoxilina & Eosina

Foi seguido 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^{29,30}.

2.3.2 Captura de Imagens e Análise das Lâminas

Todas as lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Axiophoto (Zeiss, D-7082). Posteriormente, as imagens capturadas foram utilizadas para a análise dos parâmetros morfométricos para obtenção da altura do epitélio do túbulo seminífero e diâmetro do túbulo seminífero, bem como parâmetros estereológicos para obtenção da densidade numérica de espermátides.

Para determinar a tridimensão do testículo nas diferentes faixas etárias pré-determinadas foi utilizado o método estereológico Sistema-teste M₄₂. Esse foi superposto às imagens histológicas para a contagem de pontos e de intersercções-teste (FIGURA 3).

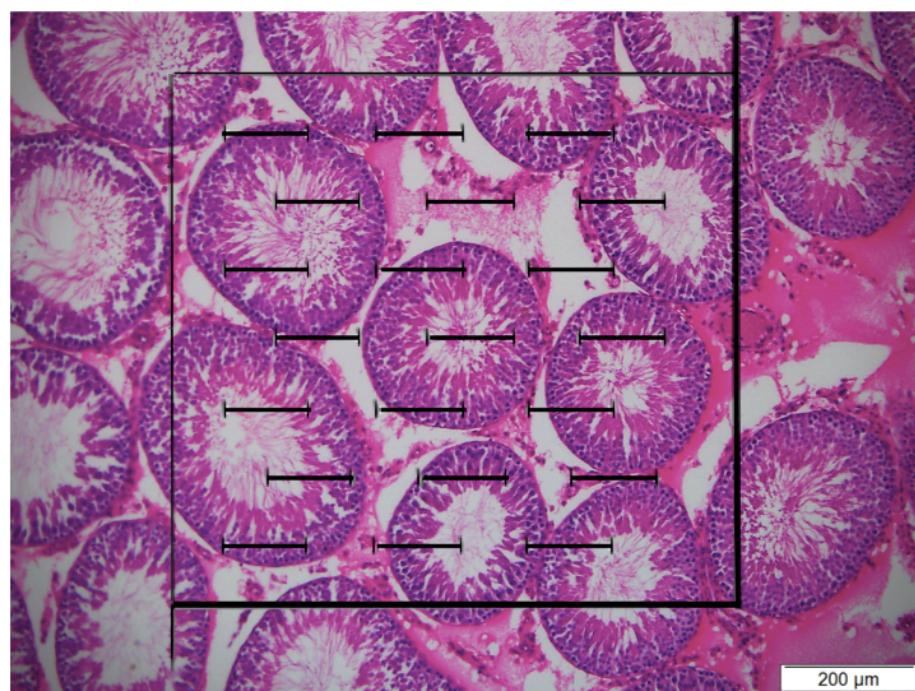


FIGURA 3: Sistema-teste M42 superposto ao parênquima testicular. Distância “d” = 100 micrômetros. Aumento de 40x. FONTE: O Autor (2016).

Foi utilizado um microscópio biológico trinocular plano 0,1 (Polaris – B.photonics) conectado a um computador (B-Xtreme) dotado de um processador

intel G2030 Dual Core com sistema de captura de imagem (Home Mirage I). Para fotodocumentação foi utilizada câmera digital (modelo CMOS) acoplada ao microscópio.

A obtenção da altura do epitélio germinativo e o cálculo da área do túbulo seminífero foram realizados com auxílio de um software apropriado (TsVieW).

Foram selecionados 10 campos microscópicos em cada corte histológico para realização das análises, o que proporcionou um total de 360 campos microscópicos em cada grupo de ratos.

Para obtenção da densidade numérica das espermátides ($Nv[\text{espermátide}]$) foi utilizada a fórmula:

$$Nv[\text{espermátide}] = \sum Q_{A[\text{espermátide}]} / Vol[\text{disector}] \quad (\mu\text{m}^3)$$

Sendo:

$\sum Q_{A[\text{espermátide}]}$ = número de espermátides

Vol[disector] = e. At

e = espessura do micrômetro

At = área-teste do plano superior

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros deste estudo foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e do teste post Hoc de Tukey HSD. Esses parâmetros, de cada grupo, foram comparados entre si, adotando-se o nível de significância estatística menor que 5% ($p<0,05$). Para a correlação entre as variáveis numéricas, foram utilizados os índices de correlação de Pearson (paramétrico) e Spearman (não paramétrico).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os dados da presente dissertação – resultados e discussão – foram submetidos para análise e publicação no jornal científico oficial da *American Society of Andrology* (ASA) denominado *Andrology*.

Stereological and morphological analysis of the effects of aging on spermatogenesis in rat testis

Introduction

The human population has experienced a sustained increase in life span, especially in recent decades; this increase occurred first in developed countries and, subsequently, in developing countries. Professional and cultural factors and the use of modern contraceptive methods have also led to an increase in the age of paternity. Moreover, the use of assisted reproduction techniques has increased, and changes due to aging have become more evident and important as one of the factors for determining the fertility of couples in such cases(Kovac et al. 2013).

Aging is a natural ongoing process characterized by morphological and structural degeneration, and like other organs, the gonads also deteriorate due to this process; however, unlike women, who present clinical signs of ovarian failure, men do not show accurate visibly signs of testicular failure(Eskanazi et al. 2003). Although spermatogenesis continues throughout life, the quantity and quality of this process in elderly men is lower than that in young men(Eskanazi et al. 2003; Plas et al. 2000; Jiang et al. 2014); however, it is difficult to determine the exact moment when this decline becomes more pronounced.

Besides spermatogenesis, another important role played by the testes is in the production of the male hormone, testosterone. Since all testicular functions are related to each other, infertile men have an increased risk of hypogonadism(O'Brien et al. 2005). Aging affects both these testicular functions(Beattie et al. 2015). The aged male gonad presents structural and morphological changes such as decreased volume and reduced number of germ cells(Jiang et al. 2014), which are associated with a decrease in the quality of sperm and fertility(Hellstrom 2006). The decrease in semen quality in elderly men may result, in addition to infertility, in an increase in the possibility of complications during pregnancy and certain diseases such as autism, schizophrenia, bipolarity, and achondroplasia(Lawson & Fletcher 2014).

Stereology is the quantitative assessment of the three-dimensional structure and spatial arrangement of thin two-dimensional sections of biological specimens(Liu et al. 2009). This technique has been used in previous studies to evaluate parameters of the seminiferous tubule and germ cells(Liu et al. 2009; Bechara et al. 2015; Xia et al. 2012). In the present study, we conducted stereological analysis to precisely determine the stage of life when a

greater deterioration in the morphological, cellular, and structural elements of spermatogenesis occurs with aging in rats.

Materials and Methods

Animals and study design

All animal experiments were conducted in accordance with the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the requirements laid down in the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals"(CCAC 1993). The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA) of the Department of Biological Sciences at the Federal University of Paraná.

Seventy-two 3-months-old male albino Wistar rats (*Rattus novergicus albinus*, Rodentia, Mammalia) were used in this study. The rats were housed under a controlled temperature of 22°C with a light/dark cycle of 12 h and with controlled air moisture in an environment free from external noises. Filtered water and species-specific rations were supplied *ad libitum* throughout the experiment.

The animals were divided into six groups ($n = 12$ in each group) and killed at different ages: 3 months, 6 months, 9 months, 12 months, 18 months, and 24 months.

The animals were anesthetized with 1 mL/kg live weight of a solution of ketamine (57.67 mg/mL) supplemented with 2% xylazine hydrochloride (2 g) via intraperitoneal injection under aseptic conditions. The procedures consisted of laparotomy and median thoracotomy for removal of organs (for use in other studies), cardiac incision with induction of cardiac arrest by exsanguination, and bilateral orchectomy by a median scrotal incision, isolation, ligature, and sectioning of the spermatic cord, and resection of both testes. The left testes were immediately frozen at -80°C (for use in another study), and the right testes of all the animals were weighed and measured (length, width, and thickness) and used in the present study.

Morphometric and stereological analysis

A single 2-mm (breadth and depth) incision was made in the upper, middle, and lower thirds of the right testes for better penetration of the fixative, and the testes were then submerged in ALFAC (alcohol 80%, formaldehyde, and acetic acid) for 16 h. The testes were then transferred into 70% alcohol, followed by dehydration in a

series of decreasing concentrations of xylene and alcohol for subsequent embedding in paraffin blocks.

The testes were then cut into 5- μm -thick sections using a microtome (American Optical, Spencer AO 820). To obtain random and uniformly isotropic sections, the *Orientatior* (Mattfeldt et al. 1985) method was used, and the *Physical Disector* (Sterio 1984) method was used to calculate the numerical density of the spermatids. The sampling of testicular tissue was performed with two consecutive sections excluding, among them, three 5- μm sections, representing a thickness of 25 μm between the planes for the determination of tri-dimensional quantitative parameters of spermatids from two-dimensional sections.

Subsequently, the histological slides were mounted with 3 sections of each sampling for histochemical analysis with hematoxylin & eosin (HE) staining.

The assessment of the height of the germinal epithelium and calculation of the area of the seminiferous tubule was performed with the aid of an appropriate software (TsView).

Ten microscopic fields were chosen in each of the three histological sections to perform the analysis, which yielded a total of 360 fields in each group of rats.

The numerical density of the spermatids ($Nv[\text{spermatids}]$), expressed as number of spermatids per μm^3 of testicular parenchyma, was calculated using the following formula:

$$Nv[\text{spermatid}] = \sum Q_{A[\text{spermatid}]} / Vol[\text{disector}] \quad (\mu\text{m}^3)$$

In which:

$\sum Q_{A[\text{spermatid}]}$ = number of spermatids

Vol[disector] = e. At

e = thickness of the micrometer

At = test area of the upper plane

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) and by using post-hoc Tukey's honest significant difference (HSD). Parameters for each group were compared using a statistical significance threshold of less than 5% ($P < 0.05$). Pearson (parametric) and Spearman (nonparametric) correlations were used to correlate numerical variables.

Results

None of the animals in the study died before they were killed, and the animals in older-age groups presented characteristics of aging, such as thinning of hair and hypoactivity.

Stereological analysis

The numerical density of spermatids was slightly lower in the 6 months group than in the 3 months group. The 9 and 12 months groups showed slightly higher numerical density of spermatids than the 3 and 6 months groups. In the 18 and 24 months groups, the numerical density of spermatids was significantly reduced ($P < 0.0001$; Figure 2 and Tables 1 and 2).

Means of the numerical densities of spermatids (number of spermatids/ μm^3)

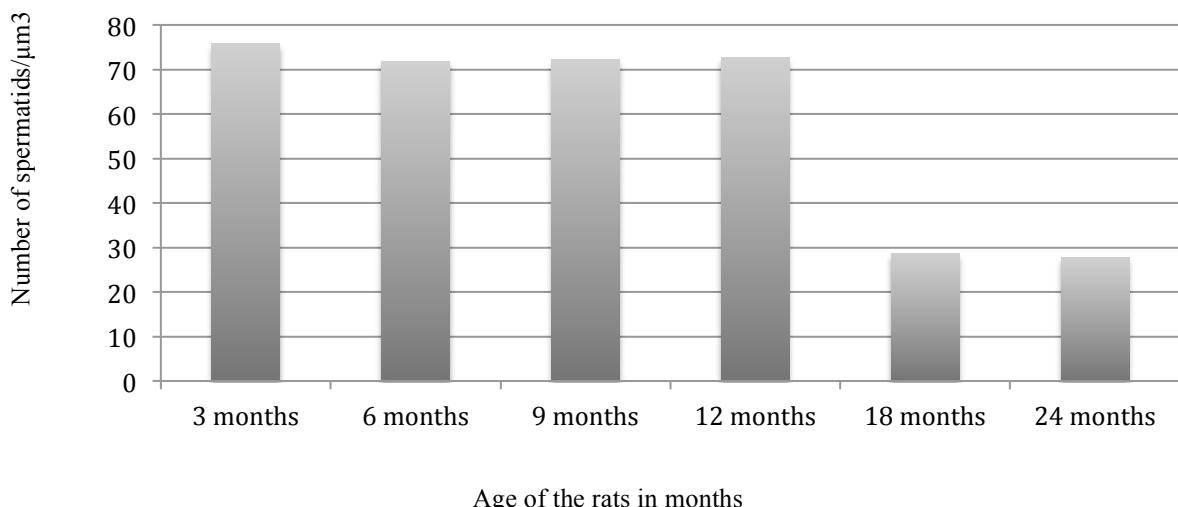


Figure 1. Mean numerical densities of spermatids per μm^3 in the different groups of rats based on age.

Table 1. Average of the numerical densities of spermatids in the different groups

Groups	N	Mean	SD	95% CI
3 months	360	75.74	15.96	74.08–77.39
6 months	360	71.75	17.77	69.91–73.59
9 months	360	72.13	17.63	70.30–73.95
12 months	360	72.60	17.37	70.79–74.39
18 months	360	28.64*	1.67	28.46–28.81
24 months	360	27.89*	6.17	27.24–28.52

* $P < 0.001$ (ANOVA)

Note: n = number of microscopic fields analyzed; Mean = mean of the numerical densities of spermatids (number of spermatids; SD = standard deviation; CI = confidence interval)

Figure 1 shows a sample of the photodocumentation of the testicular parenchyma.

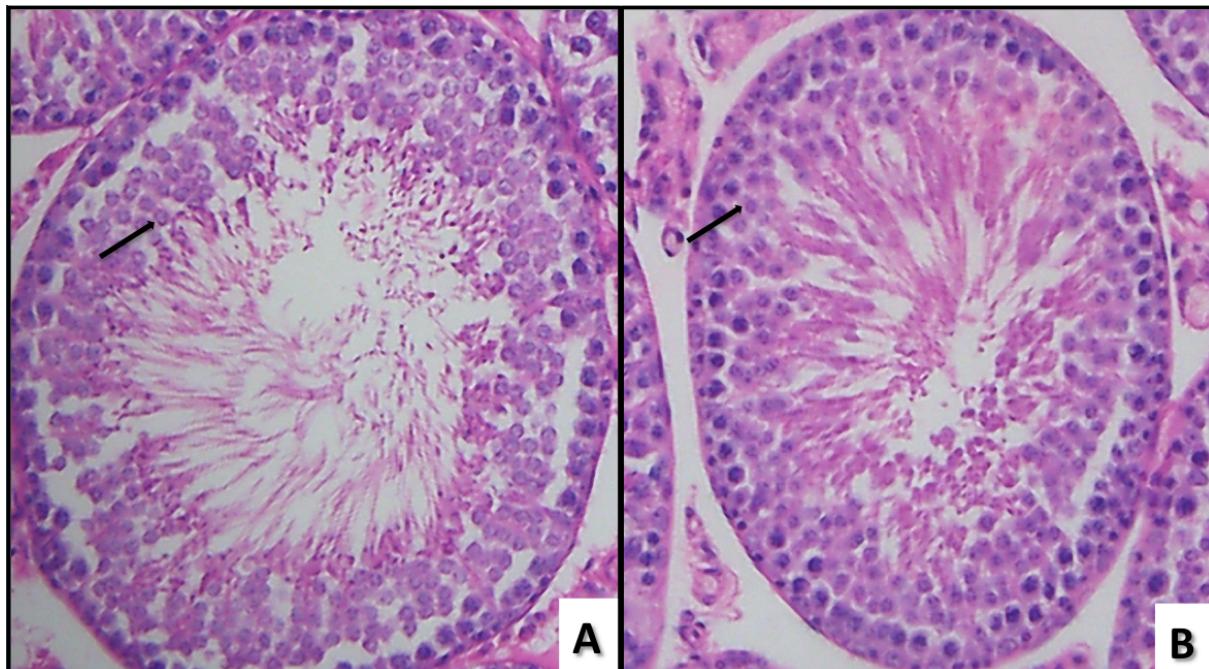


Figure 2. Microscopic sample of testicular parenchyma of a rat from the (A) 6-months-old group, (B) 24-months-old group. Showing a decrease in the number of spermatids (Black arrows: espermatis) Sources: the author's archive (2014).

Table 2. Comparison between the mean numerical densities of spermatids of rats in different groups

Comparison		Difference between mean numerical densities of spermatids	P value	95% CI
Group	Groups			
3 months	6 months	3.98	0.003*	0.94–7.01
	9 months	3.60	0.009*	0.57–6.64
	12 months	3.13	0.038*	0.10–6.17
	18 months	47.09	0.000*	44.05–50.13
	24 months	47.88	0.000*	44.81–50.88
6 months	9 months	- 0.37	0.999	-3.40–2.66
	12 months	- 0.84	0.964	-3.87–2.19
	18 months	43.11	0.000*	40.07–46.15
	24 months	43.86	0.000*	40.83–46.90
9 months	12 months	-0.46	0.998	-3.50–2.56
	18 months	43.48	0.000*	40.45–46.52
	24 months	44.24	0.000*	41.20–47.27
12 months	18 months	43.95	0.000*	40.92–46.99
	24 months	44.70	0.000*	41.67–47.74
18 months	24 months	0.75	0.981	-2.28–3.78

*P < 0.05 (ANOVA - Tukey post hoc)

Note: the difference between the mean = difference between the mean numerical densities of spermatids (number of spermatids/ μm^3) in different groups of rats; CI = confidence interval

Morphometric analysis

The results of the macroscopic morphometric analysis (weight, dimensions, and volume) were not significantly different between the groups.

The height of the germinal epithelium, as assessed by microscopic analysis, was significantly reduced in the 18 months group (mean = 100.06 µm) compared to that in the other groups. However, the 24 months group showed a significant increase (mean = 108.21 µm) compared to the 18 months group, with a similar value to that observed in the groups with younger rats (Figure 3 and Tables 3 and 4).

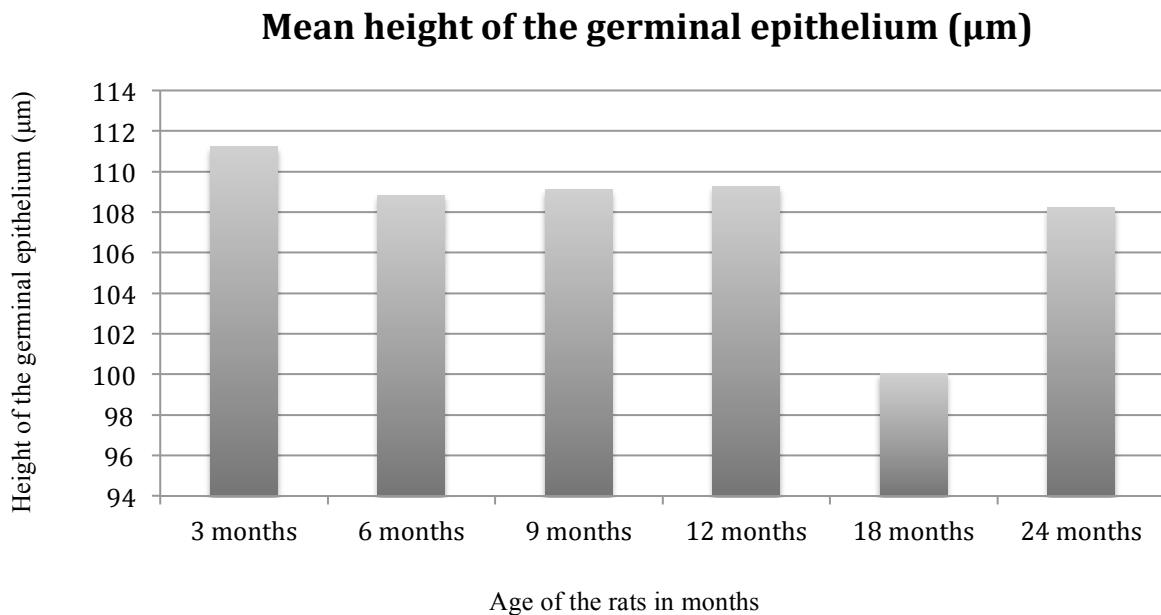


Figure 3. Average heights of the germinal epithelium of rats in the different groups of rats based on age.

Table 3. Mean height of the germinal epithelium of rats in the different groups

Groups	n	Mean height of the germinal epithelium (µm)	SD	95% CI
3 months	360	111.23	20.66	109.09–113.37
6 months	360	108.82	20.99	106.64–110.99
9 months	360	109.12	20.79	106.96–111.27
12 months	360	109.26	22.13	106.97–111.56
18 months	360	100.06*	16.03	98.27–101.86
24 months	360	108.21	12.92	106.87–109.55

*P < 0.005 (ANOVA)

Note: n = number of microscopic fields analyzed; Mean = mean height of the germinal epithelium; SD = standard deviation; CI = confidence interval

Table 4. Comparison between the mean heights of the germinal epithelium between the different groups

Comparison		Difference between the mean heights of the germinal epithelium (μm)	P value	95% CI
Group	Groups			
3 months	6 months	2.41	0.545	-1.68–6.51
	9 months	2.11	0.682	-1.98–6.21
	12 months	1.97	0.744	-2.12–6.07
	18 months	11.16	0.000*	6.90–15.43
	24 months	3.02	0.285	-1.07–7.12
6 months	9 months	-0.29	1.000	-4.39–3.80
	12 months	-0.44	1.000	-4.54–3.65
	18 months	8.75	0.000*	4.48–13.01
	24 months	0.60	0.998	-3.48–4.70
9 months	12 months	-0.14	1.000	-4.24–3.95
	18 months	9.05	0.000*	4.78–13.31
	24 months	0.90	0.998	-3.19–5.00
12 months	18 months	9.19	0.000*	4.93–13.46
	24 months	1.05	0.978	-3.04–5.15
	18 months	-8.14	0.000*	-12.40–3.87

*P < 0.05 (ANOVA - Tukey post hoc)

Note: Difference between the means = difference between the mean heights of the germinal epithelium in the different groups of rats; CI = confidence interval

With regard to the tubular area, the results were similar to those found in the stereological analysis of the numerical density of spermatids. The 18 and 24 months groups showed a significant decrease in tubular area ($6726.21 \mu\text{m}^2$ and $7395.75 \mu\text{m}^2$, respectively) compared to the other groups. However, unlike in the spermatids, the variation in the tubular area between the young and old rats was very slight (Figure 4 and in Tables 5 and 6).

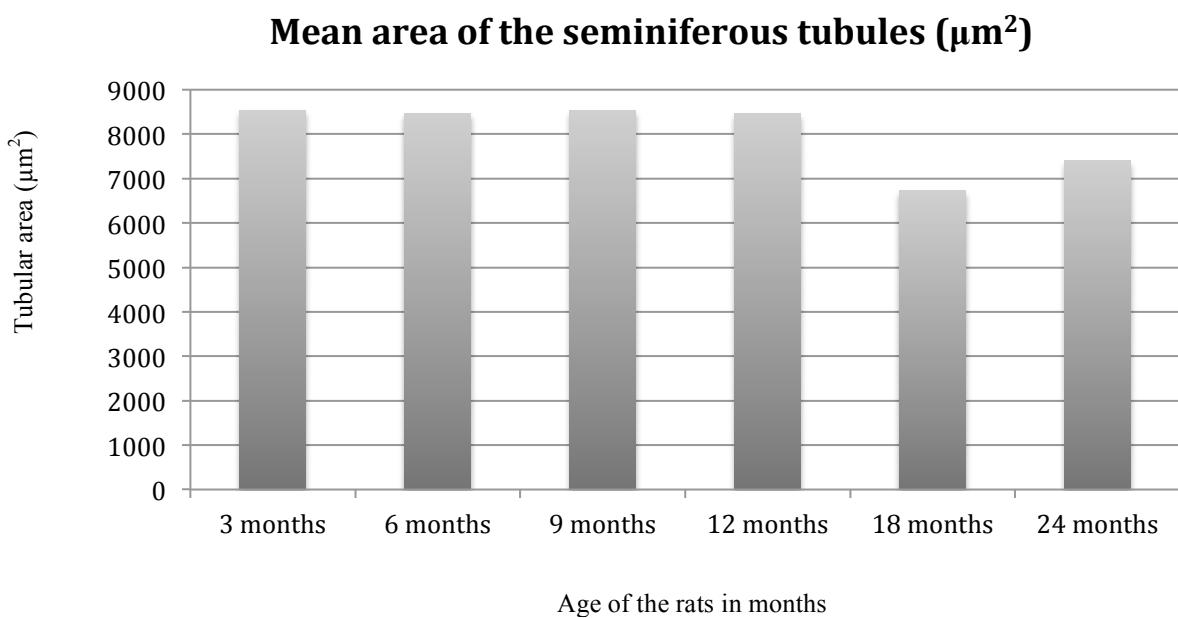


Figure 4. Values of the mean tubular area in the different groups of rats based on age.

Table 5. Mean tubular area in the different groups

Groups	n	Mean (μm^2)	SD	95% CI
3 months	360	8540.59	723.42	8465.60–8615.57
6 months	360	8475.71	711.42	8401.97–8549.45
9 months	360	8533.54	688.97	8462.13–8604.95
12 months	360	8457.50	731.20	8381.71–8533.29
18 months	360	6726.21*	825.90	6640.61–6811.82
24 months	360	7395.75*	707.39	7322.43–7469.07

* $P < 0.005$

Note: n = number of microscopic fields analyzed; Mean = mean tubular area in the different groups of rats; SD = standard deviation; CI = a confidence interval

Table 6. Comparison of the mean tubular areas between the different groups of rats (ANOVA - Tukey post hoc)

Comparison		Difference between mean tubular areas (μm^2)	P value	95% CI
Group	Groups			
3 months	6 months	64.87	0.843	-90.89–220.65
	9 months	7.04	1.000	-148.72–162.82
	12 months	83.08	0.650	-72.68–238.86
	18 months	1814.37	0.000*	1658.59–1970.14
	24 months	1144.83	0.000*	989.06–1300.61
6 months	9 months	-57.82	0.898	-213.60–97.94
	12 months	18.20	0.999	-137.56–173.98
	18 months	1749.49	0.000*	1593.72–1905.27
	24 months	1079.96	0.000*	924.18–1235.73
9 months	12 months	76.03	0.732	-79.73–231.81
	18 months	1807.32	0.000*	1651.54–1963.09
	24 months	1137.78	0.000*	982.01–1293.56
12 months	18 months	1731.28	0.000*	1575.51–1887.06
	24 months	1061.75	0.000*	905.97–1217.52
18 months	24 months	-669.53	0.000*	-825.30–513.75

*P < 0.05 (ANOVA - Tukey post hoc)

Note: Difference between the mean = difference in the mean tubular areas between different groups of rats; CI = confidence interval

Discussion

To better understanding the aging process and its characteristics, it is necessary to conduct studies with long follow-up times and using subjects at different stages of life, which requires experimental animal. Since rats have a short biological cycle, their entire life cycle can be controlled and the changes in spermatogenesis with the passage of time can be compared. The design of the groups in the present study allowed us to examine the animals at critical moments such as post-puberty (3 months of age) and at old age (24 months of age)(Quinn 2005).

With an increase in the average life span and with couples tending to postpone conception, knowledge of the events occurring during spermatogenesis in aged populations and the consequences of aging on spermatogenesis has become important for both treatment and counseling. In a review article, Kovac *et al.* previously showed that, in addition to low seminal quality and histological changes, paternal aging also leads to an increased risk of miscarriages, genetic abnormalities, cancer, autism, and other psychiatric disorders in the offspring(Kovac *et al.* 2013). Serre *et al.* also found similar results in an animal study, which indicated an increase

in the pre-implantation loss of the embryo, decrease in fetal weight, and increase in neonatal death in offspring generated by elderly animals(Serre & Robaire 1998).

Spermatogenesis and male fertility have been extensively studied, and the factors that alter them, such as varicocele, torsion of the testis, and cryptorchidism, have already been the targets of numerous studies(Al Bakri et al. 2012; Lorenzini et al. 2012; Penson et al. 1997). As a variable that affects all beings, aging has been the focus of various studies, which have indicated testicular changes and change in seminal quality with increasing age(Jiang et al. 2014; Xia et al. 2012; Well et al. 2007). However, most of these studies have only analyzed what occurs in older men or compared it to observations in young men without establishing a time point for when these changes occur. In the present study, we identified stability of the analyzed variables in the first four groups and a significant decrease in the same variables in the last two groups, which indicated that deterioration in spermatogenesis does not occur uniformly.

The results of the present study are also consistent with those of previous studies, which also revealed a regression in the quality of spermatogenesis and decrease in the number of germinal cells with age(Jiang et al. 2014; Levy et al. 1999). Our study showed that the histology with regard to spermatogenesis remains unchanged in the period between puberty and the initial two-thirds of life and that there is a marked decline in the last one-third stage of life, which indicates that fertility in a 3-months-old rat and a 12-months-old rat is probably the same. In men, it can be inferred that this decline occurs between the fourth and sixth decade of life(Quinn 2005).

Cellular apoptosis is a component of normal spermatogenesis, and it maintains an appropriate number of germ cells and eliminates defective cells. An increase in apoptosis associated with a decrease in cell proliferation in aged testes leads to an imbalance and a consequent decrease in the number of germ cells(Pastor et al. 2011). The results of the present study show a reduction in the number of spermatids in aged testes, which is in agreement with previous literature that showed a decrease in the number of spermatids while the number of spermatogonia and spermatocytes remained stable when compared to that in young testes(Jiang et al. 2014; Kimura et al. 2003). Furthermore, previously, Tomomasa *et al.* analyzed the spermatogenesis of cryptorchid rats and found an increase in spermatocyte apoptosis as a cause of germinal cell reduction(Tomomasa et al. 2002). Thus, the increase in spermatocyte apoptosis probably explains the results obtained in the present study.

Spermatogenesis is a self-renewing productive system that is maintained by stem cells (spermatogonial stem cells), which continually renew and produce other germ cells and, *a priori*, maintain their quality and quantity throughout life(Brinster 2002). In this study, we showed that a decrease in the number of spermatids occurs with aging. In a study involving the transplantation of stem cells from elderly rats into young mouse testes, Ryu *et al.* found that cells from the elderly rats in a young environment maintained spermatogenesis for another 3 years and concluded that the deterioration of spermatogenesis in elderly men is related to a deterioration of the testicular microenvironment(Ryu et al. 2006).

Our results also indicate that, unlike spermatid counts, when the tubular area and height of the germinal epithelium were analyzed, there was either no difference or only a slight difference between the elderly rats and the young ones. In a previous study, Xia *et al.* analyzed the histopathology of the testes of men with advanced prostate cancer subjected to orchietomy and compared them with the histopathologies of testicular biopsies of young men and found similar results; they therefore hypothesized connective tissue hyperplasia and interstitial laxity as an explanation for this finding(Xia et al. 2012).

One limitation of the present study is that we did not conduct seminal analysis. Nevertheless, we established, with follow-up time and stereological (three-dimensional) analysis, that the decrease in the number of spermatids and, consequently, the deterioration of spermatogenesis occurs in rats at 18 months of age. Further studies with more specific analyses aimed at determining the causes and consequences of this deterioration need to be conducted in the future.

Conclusion

In this study, we found that aging led to a deterioration of the histological parameters of spermatogenesis, which was accompanied by a significant decrease in the number of spermatids and a decrease in the area of the seminiferous tubules. Although this deterioration did not present as an obvious clinical sign, our results showed that it occurs mainly at 18 months of age in rats, which corresponds to the last one-third of their average life span.

References

- Al Bakri, A. et al., 2012. Time for improvement in semen parameters after varicocelectomy. *Journal of Urology*, 187(1), pp.227–231.
- Beattie, M.C. et al., 2015. Leydig cell aging and hypogonadism. *Experimental Gerontology*, 68, pp.87–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2015.02.014>.
- Bechara, G.R. et al., 2015. Testicular Morphology and Spermatozoid Parameters in Spontaneously Hypertensive Rats Treated with Enalapril. *Journal of Urology*, 194(5), pp.1498–1503.
- Brinster, R.L., 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5576), pp.2174–2176.
- CCAC, 1993. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*,
- Eskenazi, B. et al., 2003. The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2), pp.447–454.
- Hellstrom, W.J.G., 2006. Semen and Sperm Reference Ranges for Men 45 Years of Age and Older. *Journal of Andrology*, 27(3), pp.421–428. Available at: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.05156>.
- Jiang, H. et al., 2014. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis. *International Urology and Nephrology*, 46(5), pp.879–885.
- Kimura, M. et al., 2003. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *Journal of andrology*, 24(2), pp.185–191.
- Kovac, J.R. et al., 2013. The effects of advanced paternal age on fertility. *Asian Journal of Andrology*, 15(6), pp.723–728. Available at: <http://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2013.92%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/aja.2013.92>.
- Lawson, G. & Fletcher, R., 2014. Delayed fatherhood. *The journal of family planning and reproductive health care / Faculty of Family Planning & Reproductive Health Care, Royal College of Obstetricians & Gynaecologists*, 40(4), pp.283–288.
- Levy, S. et al., 1999. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *Journal of andrology*, 20(3), pp.356–365.
- Liu, Z. et al., 2009. Stereological measurement of rat's seminiferous tubule. *Chinese Medical Journal*, 122(21), pp.2643–2646.
- Lorenzini, F. et al., 2012. Long-term effects of the testicular torsion on the spermatogenesis of the contralateral testis and the preventive value of the twisted testis orchiepididymectomy. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 27(6), pp.388–395.
- Mattfeldt, T., Mobius, H.J. & Mall, G., 1985. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *Journal of Microscopy*, 139(3), pp.279–289.
- O'Brien, J.H. et al., 2005. Erectile Dysfunction and Andropause Symptoms in Infertile Men. *The Journal of Urology*, 174(5), pp.1932–1934. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534701688426>.
- Pastor, L.M. et al., 2011. Proliferation and Apoptosis in Aged and Photoregressed Mammalian Seminiferous Epithelium, with Particular Attention to Rodents and Humans. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), pp.155–164.
- Penson, D.F. et al., 1997. Effect of cryptorchidism on testicular histology in a naturally cryptorchid animal model. *Journal of Urology*, 158(5), pp.1978–1982.
- Plas, E. et al., 2000. Effects of aging on male fertility? *Experimental Gerontology*,

- 35(5), pp.543–551.
- Quinn, R., 2005. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*, 21(6), pp.775–777.
- Ryu, B.-Y. et al., 2006. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(6), pp.1505–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456131>.
- Serre, V. & Robaire, B., 1998. Paternal age affects fertility and progeny outcome in the Brown Norway rat. *Fertility and Sterility*, 70(4), pp.625–631.
- Sterio, D.C., 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134(2), pp.127–136.
- Tomomasa, H. et al., 2002. Germ cell apoptosis in undescended testis: the origin of its impaired spermatogenesis in the TS inbred rat. *The Journal of urology*, 168(1), pp.343–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050567>.
- Well, D. et al., 2007. Age-Related Structural and Metabolic Changes in the Pelvic Reproductive End Organs. *Seminars in Nuclear Medicine*, 37(3), pp.173–184.
- Xia, Y. et al., 2012. Stereological analysis of age-related changes of testicular peritubular cells in men. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 55(1), pp.116–119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2011.05.005>.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo experimental concluiu que:

- 1) O envelhecimento dos ratos causou alterações nos parâmetros histológicos da espermatogênese, representada pela redução significativa da densidade numérica de espermátides e diminuição da área dos túbulos seminíferos.
- 2) Mesmo sem sinais clínicos evidentes, a redução dos parâmetros da espermatogênese no envelhecimento ocorreu notadamente aos 18 meses de vida em ratos, que corresponde ao terço final da vida dos mesmos.

REFERÊNCIAS

1. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol.* 1998;33(7–8):639–53.
2. Organização Mundial da Saúde. OMS. Relatório Mund Envelhec e Saúde. 2015;1:1–29.
3. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. World economic and social survey, 2007: development in an ageing world [Internet]. Vol. 45, Choice Reviews Online. 2007. 45-2157-45-2157 p. Available from: <http://www.cro3.org/cgi/doi/10.5860/CHOICE.45-2157>
4. IBGE. Censo Demográfico 2010. Características da População e dos Domicílios. Inst Bras Geogr e Estatística. 2010;48.
5. Kovac JR, Addai J, Smith RP, Coward RM, Lamb DJ, Lipshultz LI. The effects of advanced paternal age on fertility. *Asian J Androl* [Internet]. 2013;15(6):723–8. Available from: <http://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2013.92%5Cnpapers2://publication/doi/10.1038/aja.2013.92>
6. Kavoussi PK. Surgical, Radiographic, and Endoscopic Anatomy of the Male Reproductive System. In: Wein, Alan J; Kavoussi, Louis R; Novick, Andrew C; Partin, Alan W; Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 498–515.
7. Fernandes LC. Reprodução Masculina. In: Curi R, Araújo Filho JP, editors. *Fisiologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p. 795–05.
8. Turek PJ. Male Reproductive Physiology. In: Wein, Alan J; Kavoussi, Louis R; Novick, Andrew C; Partin, Alan W; Peters CA, editor. *Campbell-Walsh Urology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 516–37.
9. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals : seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52(1):198–236.
10. Russell L, Ettlin R, Sinhahikim A, Clegg E. Histological and histopathological evaluation of the testis. St. Louis: Cache River Pr; 1990. 54-260 p.
11. Misell LM, Holochwost D, Boban D, Santi N, Shefi S, Hellerstein MK, et al. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J Urol.* 2006;175(1):242–6.
12. Eskenazi B, Wyrobek AJ, Sloter E, Kidd SA, Moore L, Young S, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod.*

- 2003;18(2):447–54.
13. Plas E, Berger P, Hermann M, Pflüger H. Effects of aging on male fertility? *Exp Gerontol.* 2000;35(5):543–51.
 14. Jiang H, Zhu WJ, Li J, Chen QJ, Liang WB, Gu YQ. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis. *Int Urol Nephrol.* 2014;46(5):879–85.
 15. Beattie MC, Adekola L, Papadopoulos V, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging and hypogonadism. *Exp Gerontol [Internet].* 2015;68:87–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2015.02.014>
 16. Hellstrom WJG. Semen and Sperm Reference Ranges for Men 45 Years of Age and Older. *J Androl [Internet].* 2006;27(3):421–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.05156>
 17. Lawson G, Fletcher R. Delayed fatherhood. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2014;40(4):283–8.
 18. Paniagua R, Martin A, Nistal M, Amat P. Testicular involution in elderly men: Comparison of histologic quantitative studies with hormone patterns. *Fertil Steril.* 1987;47(4):671–9.
 19. Well D, Yang H, Houseni M, Iruvuri S, Alzeair S, Sansovini M, et al. Age-Related Structural and Metabolic Changes in the Pelvic Reproductive End Organs. *Semin Nucl Med.* 2007;37(3):173–84.
 20. Xia Y, Zhu WJ, Hao SF, Liang WB, Li J. Stereological analysis of age-related changes of testicular peritubular cells in men. *Arch Gerontol Geriatr [Internet].* 2012;55(1):116–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2011.05.005>
 21. Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, et al. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl.* 2003;24(2):185–91.
 22. Mandarim-de-Lacerda CA. Métodos Quantitativos em Morfologia. Rio de Janeiro: EDUERJ; 1995. 72-107 p.
 23. Liu Z, Chang Q, Xu ZL, Zhang ZG. Stereological measurement of rat's seminiferous tubule. *Chin Med J (Engl).* 2009;122(21):2643–6.
 24. Bechara GR, De Souza DB, Simoes M, Felix-Patrício B, Medeiros JL, Costa WS, et al. Testicular Morphology and Spermatozoid Parameters in Spontaneously Hypertensive Rats Treated with Enalapril. *J Urol.*

- 2015;194(5):1498–503.
25. CCAC. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol. 1, ©Canadian Council on Animal Care. 1993. 18,21.
 26. Neves SPM, 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;234 p.
 27. Mattfeldt T, Mobius HJ, Mall G. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *J Microsc.* 1985;139(3):279–89.
 28. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134(2):127–36.
 29. Junqueira L, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Editora Santos; 1983. 123 p.
 30. Junqueira L, Carneiro J. Histologia básica. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 524 p.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Manual de Normatização de Documentos Científicos**. Curitiba: Editora UFPR, 2017
(Orientação para Normalização Trabalhos Acadêmicos)

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: 01/05/2017

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: 10/06/2017

Canadian Council on Animal Care. **Guide for the Care and Use of Experimental Animals**. Disponível em:
<http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/>POLICIES/CATEG.H TM>. Acesso em 13/03/08

APÊNDICES

Apêndice I – Dados da morfometria macroscópica dos testículos

Grupo 3 meses

Peso do Testículo Direito (g)	1,54	1,95	1,81	1,66	1,67	1,59	1,54	1,44	1,57	1,68	1,85	1,8
TD Longitudinal (cm)	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,8	1,63
TD Medial-Lateral (cm)	1	1	1	1	0,9	1	1	1	0,9	0,9	1	1
TD Ântero-Posterior (cm)	0,7	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,9	0,7

Grupo 6 meses

Peso do Testículo Direito(g)	1,76	1,74	1,73	1,55	1,98	1,91	1,78	1,62	1,89	2	1,76	1,85
TD Longitudinal (cm)	2,19	2,03	2,07	2,05	2,26	2,16	2,13	2,12	2	2	1,9	2,1
TD Medial-Lateral (cm)	1,34	1,21	1,38	1,2	1,29	1,43	1,24	1,21	1,15	1,2	1,1	1,1
TD Ântero-Posterior (cm)	1,06	0,96	1,04	0,98	1,22	1,19	1,05	1,08	1	1,1	1	1

Grupo 9 meses

Peso do Testículo Direito (g)	1,83	1,59	0,88	1,86	1,79	1,7	1,94	1,85	1,94	1,87	2,2	1,77
TD Longitudinal (cm)	2,23	2,02	1,83	2,15	2,15	2,15	2,25	2,2	2,15	2,05	2,3	2,15
TD Medial-Lateral (cm)	1,25	1,32	1	1,32	1,3	1,35	1,4	1,3	1,4	1,2	1,35	1,25
TD Ântero-Posterior (cm)	1,11	1,17	0,91	1,2	1,12	1,1	1,15	1,15	1,2	1,05	1,15	1,1

Grupo 12 meses

Peso do Testículo Direito (g)	2,05	1,68	2,11	1,9	2,19	1,85	3,87	1,84	1,96	1,88	2,02	1,64
TD Longitudinal (cm)	2,3	2,2	2,3	2,25	2,2	2,2	2,8	2,3	2,2	2,3	2,2	2,1
TD Medial-Lateral (cm)	1,3	1,3	1,35	1,4	1,4	1,3	1,7	1,35	1,3	1,4	1,4	1,2
TD Ântero-Posterior (cm)	1,2	1,1	1,2	1	1,1	1,2	1,4	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1

Grupo 18 meses

Peso do Testículo Direito (g)	2,17	2,07	1,82	2,05	2,98	2,02	1,48	1,63	2,33	2,1	3,21	1,82
TD Longitudinal (cm)	1,9	1,9	1,9	1,9	2,2	2	1,6	1,8	1,8	2	2,2	1,7
TD Medial-Lateral (cm)	1	1,1	1,1	1	1,2	1	1	1	1	1	1,2	1
TD Ântero-Posterior (cm)	0,9	1	0,8	1	1,1	0,9	0,8	0,8	1	1	1,1	0,8

Grupo 24 meses

Peso do Testículo Direito (g)	1,84	1,77	0,81	1,69	2,39	2,03	2,28	1,69	1,36	2,29	2,37	4,55
TD Longitudinal (cm)	1,8	1,9	1,5	1,8	2,1	1,8	2	1,8	1,8	1,9	2	2,6
TD Medial-Lateral (cm)	1	1	0,7	1	1,1	1	1,1	1	0,8	1	1	1,4
TD Ântero-Posterior (cm)	0,9	0,9	0,6	0,9	0,9	1	1	0,7	0,9	0,9	1	1

Apêndice II – Dados da estereologia e morfometria

NE: Densidade numérica das espermátides (Nv[espermátide]) em μm^3

AE: Altura do epitélio em μm

AT: Área tubular em μm^2

Grupo 3meses:

NE	AE	AT
78	128,57	8.564,23
63	123,81	9.145,37
89	119,05	9.661,13
67	123,81	8.661,13
82	140,48	9.571,15
99	138,1	9.709,58
67	123,81	9.564,23
96	147,62	8.861,85
72	135,71	7.654,00
47	140,48	8.571,15
42	116,67	9.612,68
83	138,1	8.608,89
91	128,57	8.709,22
62	140,48	9.571,15
74	135,71	8.640,37
60	147,62	7.861,85
92	116,67	7.612,68
72	140,48	8.571,15
84	138,1	9.608,89
69	128,57	9.709,58
67	135,71	8.640,37
83	140,48	8.571,15
89	116,67	9.612,68
97	135,71	7.640,37
67	138,1	8.608,89
64	128,57	8.709,58
62	123,81	8.608,89
74	140,48	9.571,15
81	147,62	8.861,85
80	135,71	8.640,37
78	119,05	8.661,13
91	123,81	8.564,23
89	128,57	8.709,58
88	135,71	7.640,37
67	123,81	8.661,13
69	119,05	8.661,13
73	116,67	8.612,68
79	138,1	8.709,58
67	135,71	8.640,37
65	126,19	8.640,37
98	147,62	8.861,85
78	128,57	8.709,58
95	119,05	8.661,13
89	123,81	8.608,89
72	140,48	8.571,15

97	147,62	8.861,85
92	123,81	8.564,23
81	135,71	7.640,37
72	147,62	7.861,85
65	119,05	7.661,13
73	126,19	8.640,37
72	128,57	8.709,58
69	135,71	9.640,37
60	123,81	9.608,89
65	128,57	8.709,58
71	119,05	8.661,13
63	147,62	8.861,85
83	140,48	7.571,15
61	123,81	9.608,89
87	138,1	8.608,89
78	104,76	7.138,50
85	97,62	8.411,96
79	126,19	9.640,37
89	100	9.138,50
71	104,76	9.138,50
79	123,81	8.550,39
69	104,76	8.138,50
79	111,90	9.550,39
83	104,76	8.138,50
32	102,38	8.349,67
78	126,19	7.640,37
89	97,62	8.411,96
97	104,76	9.138,50
77	135,71	6.640,37
98	126,19	9.640,37
92	104,76	9.138,50
95	123,81	9.550,39
74	97,62	8.349,67
97	102,38	8.349,67
69	95,24	8.349,67
57	104,76	8.391,20
65	126,19	8.640,37
99	97,62	9.391,20
78	107,14	9.335,83
75	100	9.391,20
79	107,14	8.335,83
47	104,76	9.138,50
97	126,19	9.640,37
68	100	8.138,50
89	104,76	8.138,50
71	104,76	8.138,50

79	90,48	7.190,48
69	104,76	7.138,50
79	90,48	7.190,48
83	97,62	7.190,48
32	104,76	9.138,50
78	92,86	9.138,50
89	66,67	9.138,50
97	100	8.138,50
77	104,76	8.138,50
98	97,62	8.411,96
92	109,52	9.411,96
95	107,14	9.335,83
74	104,76	9.138,50
97	123,81	9.608,89
69	138,1	8.608,89
57	100	7.138,50
65	104,76	9.138,50
99	107,14	9.335,83
78	92,86	8.550,39
75	138,1	8.608,89
79	100	9.138,50
47	109,52	7.411,96
97	92,86	7.411,96
68	97,62	7.411,96
57	95,24	9.608,89
92	104,76	9.608,89
81	116,67	9.608,89
59	123,81	9.608,89
88	138,1	8.608,89
79	116,67	8.612,68
82	107,14	8.612,68
91	100	8.612,68
82	114,29	8.612,68
78	116,67	8.612,68
89	123,81	8.550,39
83	104,76	8.550,39
84	111,90	8.550,39
91	100	8.550,39
77	71,43	8.335,83
86	88,1	8.335,83
77	92,86	8.335,83
97	100	8.335,83
99	76,19	9.190,48
83	71,43	9.190,48
93	73,81	9.190,48
69	66,67	9.138,50

79	100	9.138,50
86	104.76	9.138,50
75	123.81	8.550,39
79	104.76	8.550,39
47	111.90	8.550,39
97	100	8.550,39
68	92.86	8.550,39
74	126.19	7.640,37
97	104.76	7.640,37
81	97.62	7.640,37
59	135.71	7.640,37
88	100	7.640,37
79	76.19	7.349,67
82	92.86	8.349,67
87	83.33	9.391,20
76	104.76	8.571,15
75	109.52	8.571,15
68	90.48	8.571,15
57	95.24	8.571,15
55	109.52	8.709,58
70	88.1	8.709,58
50	128.57	8.709,58
47	90.48	8.301,22
67	85.71	8.301,22
70	78.57	8.301,22
87	92.86	8.301,22
89	100	8.301,22
76	104.76	8.661,13
98	90.48	8.564,23
89	123.81	8.709,58
79	140.48	9.861,85
82	123.81	8.861,85
98	116.67	9.861,85
52	90.48	8.301,22
88	80.95	8.301,22
95	92.86	8.301,22
89	88.1	8.301,22
72	95.24	8.301,22
97	114.29	9.564,23
92	92.86	7.211,24
32	104.76	7.453,49
78	104.76	7.453,49
89	111.90	7.861,85
97	88.1	7.411,96
77	97.62	7.411,96
98	73.81	8.142,03
92	69.05	8.142,03
95	61.9	8.142,03
74	97.62	8.142,03
97	90.48	8.142,03
69	80.95	8.225,08
57	90.48	8.453,49
65	109.52	8.453,49
99	76.19	8.225,08
78	90.48	8.453,49
75	85.71	7.142,03
79	69.05	8.142,03
48	76.19	7.225,08
58	128.57	7.564,23
55	123.81	7.564,23
67	119.05	8.661,13
89	123.81	8.661,13
82	140.48	8.571,15
80	138.1	8.709,58
94	123.81	7.564,23
79	147.62	6.861,85
75	85.71	7.142,03

79	76.19	8.142,03
47	85.71	8.142,03
97	69.05	9.142,03
68	76.19	9.142,03
89	80.95	9.225,08
71	69.05	8.225,08
79	76.19	8.225,08
69	85.71	8.301,22
79	78.57	8.301,22
52	92.86	8.301,22
56	100	8.301,22
42	104.76	9.661,13
49	90.48	9.564,23
71	123.81	8.709,58
41	140.48	8.861,85
32	123.81	9.861,85
37	116.67	9.861,85
35	90.48	8.301,22
59	80.95	8.301,22
62	92.86	9.301,22
64	88.1	8.301,22
74	95.24	8.301,22
82	114.29	8.564,23
80	92.86	9.211,24
75	104.76	8.453,49
38	104.76	8.453,49
41	111.90	7.861,85
57	88.1	7.411,96
69	97.62	7.411,96
78	73.81	8.142,03
51	69.05	8.142,03
54	61.9	8.142,03
50	97.62	8.142,03
67	90.48	8.142,03
38	80.95	7.225,08
45	90.48	9.453,49
61	109.52	9.453,49
64	76.19	7.225,08
67	90.48	8.453,49
69	85.71	8.142,03
54	76.19	8.142,03
53	85.71	9.142,03
49	69.05	8.142,03
61	76.19	8.142,03
60	80.95	8.225,08
71	69.05	7.225,08
48	76.19	7.225,08
58	128.57	7.564,23
55	123.81	7.564,23
67	119.05	8.661,13
89	123.81	8.661,13
82	140.48	8.571,15
80	138.1	8.709,58
94	123.81	7.564,23
79	147.62	6.861,85
69	135.71	7.640,37

79	140.48	7.571,15
83	116.67	7.612,68
32	138.1	7.608,89
78	128.57	8.709,58
89	140.48	8.571,15
97	135.71	9.640,37
77	147.62	9.861,85
98	116.67	9.612,68
92	140.48	9.571,15
95	138.1	9.608,89
74	128.57	9.709,58
97	135.71	9.640,37
69	140.48	8.571,15
57	116.67	7.612,68
65	135.71	7.640,37
99	138.1	7.608,89
78	128.57	7.709,58
75	123.81	7.608,89
79	140.48	7.571,15
47	147.62	8.861,85
97	135.71	7.640,37
68	119.05	8.661,13
89	123.81	9.564,23
71	128.57	9.709,58
79	135.71	9.640,37
69	123.81	8.661,13
79	119.05	7.661,13
83	116.67	7.612,68
32	138.1	7.709,58
78	135.71	7.640,37
89	126.19	8.640,37
97	147.62	8.861,85
77	128.57	9.709,58
98	119.05	9.661,13
92	123.81	8.608,89
95	140.48	8.571,15
74	147.62	8.861,85
97	123.81	8.564,23
69	135.71	7.640,37
57	147.62	7.861,85
65	119.05	8.661,13
99	126.19	8.640,37
78	128.57	8.709,58
75	135.71	7.640,37
79	123.81	7.608,89
47	128.57	8.709,58
97	119.05	9.661,13
68	147.62	9.861,85
57	140.48	9.571,15
92	123.81	8.608,89
81	138.1	9.608,89
59	104.76	7.138,50
88	97.62	7.411,96
79	126.19	8.640,37
82	100	9.138,50
91	104.76	7.138,50

82	123.81	7.550,39
78	104.76	9.138,50
89	111.90	8.550,39
83	104.76	8.138,50
84	102.38	9.349,67
91	126.19	8.640,37
77	97.62	9.411,96
86	104.76	9.138,50
77	135.71	9.640,37
97	126.19	9.640,37
99	104.76	7.138,50
83	123.81	7.550,39
93	97.62	8.349,67
69	102.38	7.349,67
79	95.24	8.684,67
86	104.76	7.391,20
75	126.19	9.640,37
79	97.62	9.391,20
47	107.14	9.335,83

97	100	8.391,20
68	107.14	7.335,83
74	104.76	9.138,50
97	126.19	8.640,37
81	100	9.138,50
59	104.76	8.138,50
88	104.76	8.138,50
79	90.48	9.190,48
82	104.76	9.138,50
87	90.48	8.190,48
76	97.62	7.190,48
75	104.76	9.138,50
68	92.86	8.138,50
57	66.67	9.138,50
55	100	8.138,50
70	104.76	8.138,50
50	97.62	9.411,96
47	109.52	9.411,96
67	107.14	8.335,83

70	104.76	9.138,50
87	123.81	9.608,89
89	138.1	8.608,89
76	100	8.138,50
98	104.76	8.138,50
89	107.14	9.335,83
79	92.86	8.550,39
82	138.1	7.608,89
98	100	8.138,50
52	109.52	8.411,96
88	92.86	9.411,96
95	97.62	9.411,96
89	95.24	8.608,89
72	104.76	8608,89
97	116.67	7.608,89
92	123.81	7.608,89
32	138.1	9.608,89

Grupo 6 meses:

NE	AE	AT
78	116.67	8.612,68
89	107.14	9.622,11
97	100	7.612,68
77	114.29	8.512,88
98	116.67	9.612,68
92	123.81	9.550,39
95	104.76	8.550,39
74	111.90	9.550,39
97	100	9.550,39
69	71.43	9.335,83
57	88.1	9.335,83
65	92.86	9.335,83
99	100	9.335,83
78	76.19	8.190,48
75	71.43	8.190,48
79	73.81	8.190,48
47	66.67	8.138,50
97	100	9.138,50
68	104.76	8.878,50
89	123.81	9.550,39
71	104.76	8.450,39
79	111.90	9.550,39
69	104.76	8.550,39
79	111.90	9.550,39
52	100	9.550,39
56	71.43	9.335,83
42	88.1	9.335,83
49	92.86	9.335,83
71	100	9.335,83
41	76.19	8.190,48
32	71.43	8.190,48
37	73.81	8.190,48

35	66.67	8.138,50
59	100	9.138,50
62	104.76	8.878,50
64	123.81	9.550,39
74	104.76	8.450,39
82	111.90	9.550,39
80	100	8.550,39
75	92.86	8.550,39
38	126.19	8.640,37
41	104.76	7.640,39
57	97.62	8.640,46
69	135.71	8.640,32
78	100	8.640,37
51	76.19	7.349,67
54	92.86	8.349,67
50	83.33	7.391,20
67	104.76	8.571,15
38	109.52	9.571,15
45	90.48	8.561,45
61	95.24	8.571,15
64	109.52	9.709,22
67	88.1	9.701,43
69	128.57	8.709,58
54	90.48	9.301,22
53	140.48	7.571,15
49	138.1	8.608,89
61	128.57	9.709,58
60	135.71	8.640,37
71	140.48	8.571,15
48	116.67	8.612,68
58	135.71	8.640,37
55	138.1	8.608,89
67	128.57	9.709,58

89	123.81	7.608,89
82	140.48	9.571,15
80	147.62	7.861,85
94	135.71	8.640,37
79	119.05	8.661,13
69	123.81	7.564,23
79	128.57	8.709,58
83	135.71	8.640,37
32	123.81	8.661,13
78	119.05	8.661,13
89	116.67	9.612,68
97	138.1	7.709,58
77	135.71	8.640,37
98	126.19	9.340,37
92	147.62	7.861,85
95	128.57	7.709,58
74	119.05	8.661,13
97	123.81	8.608,89
69	140.48	9.571,15
57	147.62	8.861,85
65	123.81	8.564,23
99	135.71	8.640,37
78	147.62	8.861,85
75	119.05	7.661,13
79	126.19	7.640,37
47	128.57	8.709,58
97	135.71	8.640,37
68	123.81	8.608,89
89	128.57	8.709,58
71	119.05	8.661,13
79	147.62	7.861,85
69	140.48	9.571,15
79	123.81	8.708,89

83	138.1	8.608,89
32	104.76	9.138,50
78	97.62	8.411,96
89	126.19	8.640,37
97	100	8.138,50
77	104.76	8.138,50
98	123.81	9.550,39
92	104.76	9.138,50
95	111.90	8.550,39
74	104.76	9.138,50
97	102.38	7.349,67
69	126.19	7.640,37
57	97.62	8.411,96
65	104.76	9.138,50
99	135.71	7.640,37
78	126.19	7.640,37
75	104.76	9.138,50
79	123.81	8.550,39
47	97.62	8.349,67
97	102.38	8.349,67
68	95.24	8.349,67
57	104.76	8.391,20
92	126.19	7.640,37
81	97.62	9.391,20
59	107.14	9.335,83
88	100	9.391,20
79	107.14	9.335,83
82	104.76	9.138,50
91	126.19	8.640,37
82	100	9.138,50
78	104.76	9.138,50
89	104.76	9.138,50
83	90.48	9.190,48
84	104.76	9.138,50
91	90.48	8.190,48
77	97.62	8.190,48
86	104.76	8.138,50
77	92.86	9.138,50
97	66.67	9.138,50
99	100	9.138,50
83	104.76	8.138,50
93	97.62	8.411,96
69	109.52	8.411,96
79	107.14	8.335,83
86	104.76	9.138,50
75	123.81	8.608,89
79	138.1	8.608,89
47	100	9.138,50
97	104.76	9.138,50
68	107.14	9.335,83
74	92.86	9.550,39
97	138.1	8.608,89
81	100	9.138,50
59	109.52	8.411,96
88	92.86	8.411,96

79	97.62	8.411,96
82	95.24	7.608,89
87	104.76	7.608,89
76	116.67	7.608,89
75	123.81	7.608,89
68	138.1	7.608,89
57	116.67	8.612,68
55	107.14	8.612,68
70	100	8.612,68
50	114.29	8.612,68
47	116.67	8.612,68
67	123.81	7.550,39
70	104.76	7.550,39
87	111.90	7.550,39
89	100	7.550,39
76	71.43	8.335,83
98	88.1	8.335,83
89	92.86	8.335,83
79	100	8.335,83
82	76.19	9.190,48
98	71.43	9.190,48
52	73.81	9.190,48
88	66.67	9.138,50
95	100	9.138,50
89	104.76	9.138,50
72	123.81	8.550,39
97	104.76	8.550,39
92	111.90	8.550,39
32	100	8.550,39
78	92.86	8.550,39
89	126.19	7.640,37
97	104.76	7.640,37
77	97.62	7.640,37
98	135.71	7.640,37
92	100	8.640,37
95	76.19	8.349,67
74	92.86	7.349,67
97	83.33	8.391,20
69	104.76	8.571,15
57	109.52	8.571,15
65	90.48	8.571,15
99	95.24	8.571,15
78	109.52	6.709,58
75	88.1	6.709,58
79	128.57	6.709,58
47	90.48	9.301,22
97	85.71	9.301,22
68	78.57	9.301,22
89	92.86	9.301,22
71	100	7.301,22
79	104.76	8.661,13
69	90.48	8.564,23
79	123.81	8.709,58
52	140.48	5.861,85
56	123.81	5.861,85

42	116.67	5.861,85
49	90.48	9.301,22
71	80.95	9.301,22
41	92.86	9.301,22
32	88.1	9.301,22
37	95.24	9.301,22
35	114.29	8.564,23
59	92.86	7.211,24
62	104.76	8.453,49
64	104.76	8.453,49
74	111.90	7.861,85
82	88.1	7.411,96
80	97.62	7.411,96
75	73.81	7.142,03
38	69.05	8.142,03
41	61.9	8.142,03
57	97.62	8.142,03
69	90.48	8.142,03
78	80.95	8.225,08
51	90.48	8.453,49
54	109.52	8.453,49
50	76.19	8.225,08
67	90.48	8.453,49
38	85.71	9.142,03
45	76.19	9.142,03
61	85.71	9.142,03
64	69.05	9.142,03
67	76.19	9.142,03
69	80.95	9.225,08
54	69.05	8.225,08
53	76.19	8.225,08
49	85.71	8.301,22
61	78.57	8.301,22
97	92.86	8.301,22
77	100	8.301,22
98	104.76	7.661,13
92	90.48	7.564,23
95	123.81	8.709,58
74	140.48	8.861,85
97	123.81	8.861,85
69	116.67	8.861,85
57	90.48	8.301,22
65	80.95	8.301,22
99	92.86	8.301,22
78	88.1	8.301,22
75	95.24	8.301,22
79	114.29	7.564,23
47	92.86	8.211,24
97	104.76	8.453,49
68	104.76	8.453,49
89	111.90	7.861,85
71	88.1	8.411,96
79	97.62	8.411,96
69	73.81	9.142,03
79	69.05	9.142,03

52	61.9	9.142,03
56	97.62	9.142,03
42	90.48	9.142,03
49	80.95	9.225,08
71	90.48	9.453,49
41	109.52	9.453,49
32	76.19	9.225,08
37	90.48	9.453,49
35	85.71	9.142,03
59	76.19	9.142,03
62	85.71	9.142,03
64	69.05	9.142,03
74	76.19	9.142,03
82	80.95	9.225,08
80	69.05	9.225,08
75	76.19	8.225,08
38	128.57	7.564,23
41	123.81	7.564,23
57	119.05	8.661,13
69	123.81	8.661,13
78	140.48	7.571,15
51	138.1	7.709,58
54	123.81	8.564,23
50	147.62	6.861,85
67	135.71	7.640,37
38	140.48	6.571,15
45	116.67	7.612,68
61	138.1	8.608,89
64	128.57	8.709,58
67	140.48	7.571,15
69	135.71	8.640,37
54	147.62	8.861,85
53	116.67	8.612,68

49	140.48	8.571,15
61	138.1	8.608,89
60	128.57	8.709,58
71	135.71	8.640,37
48	140.48	8.571,15
58	116.67	8.612,68
55	135.71	8.640,37
67	138.1	8.608,89
89	128.57	8.709,58
82	123.81	7.608,89
80	140.48	8.571,15
94	147.62	7.861,85
79	135.71	7.640,37
69	119.05	7.661,13
79	123.81	8.564,23
83	128.57	8.709,58
32	135.71	7.640,37
78	123.81	7.661,13
89	119.05	7.661,13
97	116.67	7.612,68
77	138.1	8.709,58
98	135.71	7.640,37
92	126.19	7.640,37
95	147.62	7.861,85
74	128.57	8.709,58
97	119.05	8.661,13
69	123.81	7.608,89
57	140.48	7.571,15
65	147.62	7.861,85
99	123.81	7.564,23
78	135.71	8.640,37
75	147.62	8.861,85
79	119.05	8.661,13

47	126.19	8.640,37
97	128.57	8.709,58
68	135.71	8.640,37
89	123.81	8.608,89
71	128.57	8.709,58
79	119.05	8.661,13
69	147.62	6.861,85
79	140.48	7.571,15
83	123.81	8.608,89
32	138.1	8.608,89
78	104.76	9.138,50
89	97.62	8.411,96
97	126.19	7.640,37
77	100	9.138,50
98	104.76	8.138,50
92	123.81	8.550,39
95	104.76	9.138,50
74	111.90	8.550,39
97	104.76	9.138,50
69	102.38	8.349,67
57	126.19	7.640,37
65	97.62	7.411,96
99	104.76	7.138,50
78	135.71	7.640,37
75	126.19	7.640,37
79	104.76	8.138,50
47	123.81	6.550,39
97	97.62	7.349,67
68	102.38	7.349,67
57	95.24	7.349,67
92	104.76	7.391,20

Grupo 9 meses:

NE	AE	AT
81	126.19	7.640,37
59	135.71	7.391,20
88	126.19	8.335,83
79	104.76	8.391,20
82	123.81	8.335,83
91	97.62	9.138,50
82	102.38	8.640,37
78	95.24	9.138,50
89	104.76	9.138,50
83	126.19	9.138,50
84	97.62	9.190,48
91	107.14	9.138,50
77	100	9.190,48
86	107.14	9.190,48
77	104.76	9.138,50
97	126.19	9.138,50
99	100	9.138,50
83	104.76	9.138,50

93	104.76	9.138,50
69	90.48	8.411,96
79	104.76	8.411,96
86	90.48	7.335,83
75	97.62	8.138,50
79	104.76	8.608,89
47	92.86	8.608,89
97	66.67	9.138,50
68	100	9.138,50
74	104.76	8.335,83
97	97.62	8.550,39
81	138.1	8.608,89
59	100	9.138,50
88	109.52	7.411,96
79	92.86	7.411,96
82	97.62	7.411,96
87	95.24	8.608,89
76	104.76	8.608,89
75	116.67	8.608,89

68	123.81	8.608,89
57	138.1	8.608,89
55	116.67	8.612,68
70	107.14	8.612,68
50	100	8.612,68
47	114.29	8.612,68
67	116.67	8.612,68
70	123.81	7.550,39
87	104.76	7.550,39
89	111.90	7.550,39
76	100	7.550,39
98	71.43	9.335,83
89	88.1	9.335,83
79	92.86	9.335,83
82	100	9.335,83
98	76.19	9.190,48
52	71.43	9.190,48
88	73.81	9.190,48
95	66.67	9.138,50

89	100	9.138,50
72	104.76	9.138,50
97	123.81	9.550,39
92	104.76	8.550,39
32	111.90	8.550,39
78	100	8.550,39
89	92.86	8.550,39
97	126.19	7.640,37
77	104.76	7.640,37
98	97.62	7.640,37
92	135.71	7.640,37
95	100	7.640,37
74	76.19	8.349,67
97	92.86	8.349,67
69	83.33	8.391,20
57	104.76	8.571,15
65	109.52	8.571,15
99	90.48	8.571,15
78	95.24	8.571,15
75	109.52	7.709,58
79	88.1	8.709,58
47	128.57	8.709,58
97	90.48	9.301,22
68	128.57	8.564,23
89	123.81	9.145,37
71	119.05	9.661,13
79	123.81	8.661,13
69	140.48	9.571,15
79	138.1	9.709,58
52	123.81	9.564,23
56	147.62	8.861,85
42	135.71	7.654,00
49	140.48	8.571,15
71	116.67	9.612,68
41	138.1	8.608,89
32	128.57	8.709,22
37	140.48	9.571,15
35	135.71	8.640,37
59	147.62	7.861,85
62	116.67	7.612,68
64	140.48	8.571,15
74	138.1	9.608,89
82	128.57	9.709,58
80	135.71	8.640,37
75	140.48	8.571,15
38	116.67	9.612,68
41	135.71	7.640,37
57	138.1	8.608,89
69	128.57	8.709,58
78	123.81	8.608,89
51	140.48	9.571,15
54	147.62	8.861,85
50	135.71	8.640,37
67	119.05	8.661,13
38	123.81	8.564,23
45	128.57	8.709,58

61	135.71	7.640,37
64	123.81	8.661,13
67	119.05	8.661,13
69	116.67	8.612,68
54	138.1	8.709,58
53	135.71	8.640,37
49	126.19	8.640,37
61	147.62	8.861,85
97	128.57	8.709,58
77	119.05	8.661,13
98	123.81	8.608,89
92	140.48	8.571,15
95	147.62	8.861,85
74	123.81	8.564,23
97	135.71	7.640,37
69	147.62	7.861,85
57	119.05	7.661,13
65	126.19	8.640,37
99	128.57	8.709,58
78	135.71	9.640,37
75	123.81	9.608,89
79	128.57	8.709,58
47	119.05	8.661,13
97	147.62	8.861,85
68	140.48	7.571,15
89	123.81	9.608,89
71	138.1	8.608,89
79	104.76	7.138,50
69	97.62	8.411,96
79	126.19	9.640,37
52	100	9.138,50
56	104.76	9.138,50
42	123.81	8.550,39
49	104.76	8.138,50
71	111.90	9.550,39
41	104.76	8.138,50
32	102.38	8.349,67
37	126.19	7.640,37
35	97.62	8.411,96
59	104.76	9.138,50
62	135.71	6.640,37
64	126.19	9.640,37
74	104.76	9.138,50
82	123.81	9.550,39
80	97.62	8.349,67
75	102.38	8.349,67
38	95.24	8.349,67
41	104.76	8.391,20
57	126.19	8.640,37
69	97.62	9.391,20
78	107.14	9.335,83
51	100	9.391,20
54	107.14	8.335,83
50	104.76	9.138,50
67	126.19	9.640,37
38	100	8.138,50

45	104.76	8.138,50
61	104.76	8.138,50
64	90.48	7.190,48
67	104.76	7.138,50
69	90.48	7.190,48
54	97.62	7.190,48
53	104.76	9.138,50
49	92.86	9.138,50
61	66.67	9.138,50
60	100	8.138,50
71	104.76	8.138,50
48	97.62	8.411,96
58	109.52	9.411,96
55	107.14	9.335,83
67	104.76	9.138,50
89	123.81	9.608,89
82	138.1	8.608,89
80	100	7.138,50
94	104.76	9.138,50
79	107.14	9.335,83
69	92.86	8.550,39
79	138.1	8.608,89
83	100	9.138,50
32	109.52	7.411,96
78	92.86	7.411,96
89	97.62	7.411,96
97	95.24	9.608,89
77	104.76	9.608,89
98	116.67	9.608,89
92	123.81	9.608,89
95	138.1	8.608,89
74	116.67	8.612,68
97	107.14	8.612,68
69	100	8.612,68
57	114.29	8.612,68
65	116.67	8.612,68
99	123.81	8.550,39
78	104.76	8.550,39
75	111.90	8.550,39
79	100	8.550,39
47	71.43	8.335,83
97	88.1	8.335,83
68	92.86	8.335,83
89	100	8.335,83
71	76.19	9.190,48
79	71.43	9.190,48
69	73.81	9.190,48
79	66.67	9.138,50
83	100	9.138,50
32	104.76	9.138,50
78	123.81	8.550,39
89	104.76	8.550,39
97	111.90	8.550,39
77	100	8.550,39
98	92.86	8.550,39
92	126.19	7.640,37

95	104.76	7.640,37
74	97.62	7.640,37
97	135.71	7.640,37
69	100	7.640,37
57	76.19	7.349,67
65	92.86	8.349,67
99	83.33	9.391,20
78	104.76	8.571,15
75	109.52	8.571,15
79	90.48	8.571,15
47	95.24	8.571,15
97	109.52	8.709,58
68	88.1	8.709,58
57	128.57	8.709,58
92	90.48	8.301,22
81	85.71	8.301,22
59	78.57	8.301,22
88	92.86	8.301,22
79	100	8.301,22
82	104.76	8.661,13
91	90.48	8.564,23
82	123.81	8.709,58
78	140.48	9.861,85
89	123.81	8.861,85
83	116.67	9.861,85
84	90.48	8.301,22
91	80.95	8.301,22
77	92.86	8.301,22
86	88.1	8.301,22
77	95.24	8.301,22
97	114.29	9.564,23
99	92.86	7.211,24
83	104.76	7.453,49
93	104.76	7.453,49
69	111.90	7.861,85
79	88.1	7.411,96
86	97.62	7.411,96
75	73.81	8.142,03
79	69.05	8.142,03
47	61.9	8.142,03
97	97.62	8.142,03
68	90.48	8.142,03
74	80.95	8.225,08
97	90.48	8.453,49
81	109.52	8.453,49
59	76.19	8.225,08
88	90.48	8.453,49

79	85.71	7.142,03
82	76.19	8.142,03
87	85.71	8.142,03
76	69.05	9.142,03
75	76.19	9.142,03
68	80.95	9.225,08
57	69.05	8.225,08
55	76.19	8.225,08
70	85.71	8.301,22
50	78.57	8.301,22
47	92.86	8.301,22
67	100	8.301,22
70	104.76	9.661,13
87	90.48	9.564,23
89	123.81	8.709,58
76	140.48	8.861,85
98	123.81	9.861,85
89	116.67	9.861,85
79	90.48	8.301,22
82	80.95	8.301,22
98	92.86	9.301,22
52	88.1	8.301,22
88	95.24	8.301,22
95	114.29	8.564,23
89	92.86	9.211,24
72	104.76	8.453,49
97	104.76	8.453,49
92	111.90	7.861,85
32	88.1	7.411,96
78	97.62	7.411,96
89	73.81	8.142,03
97	69.05	8.142,03
77	61.9	8.142,03
98	97.62	8.142,03
92	90.48	8.142,03
95	80.95	7.225,08
74	90.48	9.453,49
97	109.52	9.453,49
69	76.19	7.225,08
57	90.48	8.453,49
65	85.71	8.142,03
99	76.19	8.142,03
78	85.71	9.142,03
75	69.05	8.142,03
79	76.19	8.142,03
47	80.95	8.225,08
97	69.05	7.225,08

68	76.19	7.225,08
89	128.57	7.564,23
71	123.81	7.564,23
79	119.05	8.661,13
69	123.81	8.661,13
79	140.48	8.571,15
52	138.1	8.709,58
56	123.81	7.564,23
42	147.62	6.861,85
49	135.71	7.640,37
71	140.48	7.571,15
41	116.67	7.612,68
32	138.1	7.608,89
37	128.57	8.709,58
35	140.48	8.571,15
59	135.71	9.640,37
62	147.62	9.861,85
64	116.67	9.612,68
74	140.48	9.571,15
82	138.1	9.608,89
80	128.57	9.709,58
75	135.71	9.640,37
38	140.48	8.571,15
41	116.67	7.612,68
57	135.71	7.640,37
69	138.1	7.608,89
78	128.57	7.709,58
51	123.81	7.608,89
54	140.48	7.571,15
50	147.62	8.861,85
67	135.71	7.640,37
38	119.05	8.661,13
45	123.81	9.564,23
61	128.57	9.709,58
64	135.71	9.640,37
67	123.81	8.661,13
69	119.05	7.661,13
54	116.67	7.612,68
53	138.1	7.709,58
49	135.71	7.640,37
61	126.19	8.640,37
97	147.62	8.861,85

Grupo 12 meses:

NE	AE	AT
77	128.57	9.709,58
98	119.05	9.661,13
92	123.81	8.608,89
95	140.48	8.571,15
74	147.62	8.861,85
97	123.81	8.564,23
69	135.71	7.640,37
57	147.62	7.861,85
65	119.05	8.661,13
99	126.19	8.640,37
78	128.57	8.709,58
75	135.71	7.640,37
79	123.81	7.608,89
47	128.57	8.709,58
97	119.05	9.661,13
68	147.62	9.861,85
89	140.48	9.571,15
71	123.81	8.608,89
79	138.1	9.608,89
69	104.76	7.138,50
79	97.62	7.411,96
52	126.19	8.640,37
56	100	9.138,50
42	104.76	7.138,50
49	123.81	7.550,39
71	104.76	9.138,50
41	111.90	8.550,39
32	104.76	8.138,50
37	102.38	9.349,67
35	126.19	8.640,37
59	97.62	9.411,96
62	104.76	9.138,50
64	135.71	9.640,37
74	126.19	9.640,37
82	104.76	7.138,50
80	123.81	7.550,39
75	97.62	8.349,67
38	102.38	7.349,67
41	95.24	8.684,67
57	104.76	7.391,20
69	126.19	9.640,37
78	97.62	9.391,20
51	107.14	9.335,83
54	100	8.391,20
50	107.14	7.335,83
67	104.76	9.138,50
38	126.19	8.640,37
45	100	9.138,50
61	104.76	8.138,50
64	104.76	8.138,50
67	90.48	9.190,48
69	104.76	9.138,50
54	90.48	8.190,48

53	97.62	7.190,48
49	104.76	9.138,50
61	92.86	8.138,50
60	66.67	9.138,50
71	100	8.138,50
48	104.76	8.138,50
58	97.62	9.411,96
55	109.52	9.411,96
67	107.14	8.335,83
89	104.76	9.138,50
82	123.81	9.608,89
80	138.1	8.608,89
94	100	8.138,50
79	104.76	8.138,50
69	107.14	9.335,83
79	92.86	8.550,39
83	138.1	7.608,89
32	100	8.138,50
78	109.52	8.411,96
89	92.86	9.411,96
97	97.62	9.411,96
77	95.24	8.608,89
98	104.76	8608,89
92	116.67	7.608,89
95	123.81	7.608,89
74	138.1	9.608,89
97	116.67	8.612,68
69	107.14	9.622,11
57	100	7.612,68
65	114.29	8.512,88
99	116.67	9.612,68
78	123.81	9.550,39
75	138.1	8.608,89
79	128.57	8.709,22
47	140.48	9.571,15
97	135.71	8.640,37
68	147.62	7.861,85
89	116.67	7.612,68
71	140.48	8.571,15
79	138.1	9.608,89
69	128.57	9.709,58
79	135.71	8.640,37
83	140.48	8.571,15
32	116.67	9.612,68
78	135.71	7.640,37
89	138.1	8.608,89
97	128.57	8.709,58
77	123.81	8.608,89
98	140.48	9.571,15
92	147.62	8.861,85
95	135.71	8.640,37
74	119.05	8.661,13
97	123.81	8.564,23
69	104.76	9.138,50
54	128.57	8.709,58

57	123.81	8.709,58
65	140.48	5.861,85
99	123.81	5.861,85
78	116.67	5.861,85
75	90.48	9.301,22
79	80.95	9.301,22
47	92.86	9.301,22
97	88.1	9.301,22
68	95.24	9.301,22
57	114.29	8.564,23
92	92.86	7.211,24
81	104.76	8.453,49
59	104.76	8.453,49
88	111.90	7.861,85
79	88.1	7.411,96
82	97.62	7.411,96
91	73.81	7.142,03
82	69.05	8.142,03
78	61.9	8.142,03
89	97.62	8.142,03
83	90.48	8.142,03
84	80.95	8.225,08
91	90.48	8.453,49
77	109.52	8.453,49
86	76.19	8.225,08
77	90.48	8.453,49
98	85.71	9.142,03
92	76.19	9.142,03
95	85.71	9.142,03
74	69.05	9.142,03
97	76.19	9.142,03
69	80.95	9.225,08
57	69.05	8.225,08
65	76.19	8.225,08
99	85.71	8.301,22
78	78.57	8.301,22
75	92.86	8.301,22
71	100	8.301,22
41	104.76	7.661,13
32	90.48	7.564,23
37	123.81	8.709,58
35	140.48	8.861,85
59	123.81	8.861,85
62	116.67	8.861,85
64	90.48	8.301,22
74	80.95	8.301,22
82	92.86	8.301,22
80	88.1	8.301,22
75	95.24	8.301,22
38	114.29	7.564,23
41	92.86	8.211,24
57	104.76	8.453,49
69	104.76	8.453,49
78	111.90	7.861,85

51	88.1	8.411,96
54	97.62	8.411,96
50	73.81	9.142,03
67	69.05	9.142,03
38	61.9	9.142,03
45	97.62	9.142,03
61	90.48	9.142,03
64	80.95	9.225,08
67	90.48	9.453,49
69	109.52	9.453,49
54	76.19	9.225,08
53	90.48	9.453,49
49	85.71	9.142,03
61	76.19	9.142,03
60	85.71	9.142,03
71	69.05	9.142,03
48	76.19	9.142,03
58	80.95	9.225,08
55	69.05	9.225,08
67	76.19	8.225,08
89	128.57	7.564,23
82	123.81	7.564,23
80	119.05	8.661,13
94	123.81	8.661,13
79	140.48	7.571,15
69	138.1	7.709,58
79	123.81	8.564,23
83	147.62	6.861,85
32	135.71	7.640,37
78	140.48	6.571,15
89	116.67	7.612,68
97	138.1	8.608,89
77	128.57	8.709,58
98	140.48	7.571,15
92	135.71	8.640,37
95	147.62	8.861,85
74	116.67	8.612,68
97	140.48	8.571,15
69	138.1	8.608,89
57	128.57	8.709,58
65	135.71	8.640,37
99	140.48	8.571,15
78	116.67	8.612,68
75	135.71	8.640,37
79	138.1	8.608,89
47	128.57	8.709,58
97	123.81	7.608,89
68	140.48	8.571,15
89	147.62	7.861,85
71	135.71	7.640,37
79	119.05	7.661,13
69	123.81	8.564,23
79	128.57	8.709,58
83	135.71	7.640,37
32	123.81	7.661,13

78	119.05	7.661,13
89	116.67	7.612,68
97	138.1	8.709,58
77	135.71	7.640,37
98	126.19	7.640,37
92	147.62	7.861,85
95	128.57	8.709,58
74	119.05	8.661,13
97	123.81	7.608,89
69	140.48	7.571,15
57	147.62	7.861,85
65	123.81	7.564,23
99	135.71	8.640,37
78	147.62	8.861,85
75	119.05	8.661,13
95	126.19	8.640,37
89	128.57	8.709,58
72	135.71	8.640,37
97	123.81	8.608,89
92	128.57	8.709,58
81	119.05	8.661,13
72	147.62	6.861,85
65	140.48	7.571,15
73	123.81	8.608,89
72	138.1	8.608,89
69	104.76	9.138,50
60	97.62	8.411,96
65	126.19	7.640,37
71	100	9.138,50
63	104.76	8.138,50
83	123.81	8.550,39
61	104.76	9.138,50
87	111.90	8.550,39
76	104.76	9.138,50
65	102.38	8.349,67
64	126.19	7.640,37
89	97.62	7.411,96
71	104.76	7.138,50
79	135.71	7.640,37
66	126.19	7.640,37
65	104.76	8.138,50
64	123.81	6.550,39
32	97.62	7.349,67
74	102.38	7.349,67
89	95.24	7.349,67
97	104.76	7.391,20
101	126.19	7.640,37
98	135.71	7.391,20
92	126.19	8.335,83
95	104.76	8.391,20
74	123.81	8.335,83
97	97.62	9.138,50
69	102.38	8.640,37
57	95.24	9.138,50
65	104.76	9.138,50

99	126.19	9.138,50
78	97.62	9.190,48
75	90.48	9.301,22
79	80.95	9.301,22
47	92.86	9.301,22
97	88.1	9.301,22
68	95.24	9.301,22
52	114.29	8.564,23
55	92.86	7.211,24
64	104.76	8.453,49
52	104.76	8.453,49
89	111.90	7.861,85
71	88.1	7.411,96
79	97.62	7.411,96
69	73.81	7.142,03
79	69.05	8.142,03
83	61.9	8.142,03
32	97.62	8.142,03
78	90.48	8.142,03
89	80.95	8.225,08
97	90.48	8.453,49
77	109.52	8.453,49
98	76.19	8.225,08
92	90.48	8.453,49
95	85.71	9.142,03
74	76.19	9.142,03
97	85.71	9.142,03
69	69.05	9.142,03
57	76.19	9.142,03
65	80.95	9.225,08
99	69.05	8.225,08
78	76.19	8.225,08
75	85.71	8.301,22
95	78.57	8.301,22
89	92.86	8.301,22
72	100	8.301,22
97	104.76	7.661,13
92	90.48	7.564,23
81	123.81	8.709,58
72	140.48	8.861,85
65	123.81	8.861,85
73	116.67	8.861,85
72	90.48	8.301,22
69	80.95	8.301,22
60	92.86	8.301,22
65	88.1	8.301,22
71	95.24	8.301,22
63	114.29	7.564,23
83	92.86	8.211,24
61	104.76	8.453,49
87	104.76	8.453,49
76	111.90	7.861,85
65	88.1	8.411,96
64	97.62	8.411,96
89	73.81	9.142,03

71	69.05	9.142,03
79	61.9	9.142,03
66	97.62	9.142,03
65	90.48	9.142,03
64	80.95	9.225,08
32	90.48	9.453,49
74	109.52	9.453,49
89	76.19	9.225,08
97	90.48	9.453,49
101	85.71	9.142,03
98	76.19	9.142,03
92	85.71	9.142,03

95	69.05	9.142,03
74	76.19	9.142,03
97	80.95	9.225,08
69	69.05	9.225,08
57	76.19	8.225,08
65	128.57	7.564,23
99	123.81	7.564,23
78	119.05	8.661,13
75	123.81	8.661,13
79	140.48	7.571,15
47	138.1	7.709,58
49	123.81	8.564,23

68	147.62	6.861,85
52	135.71	7.640,37
55	140.48	6.571,15
64	116.67	7.612,68
52	138.1	8.608,89
35	128.57	8.709,58
43	140.48	7.571,15
33	135.71	8.640,37
52	147.62	8.861,85
41	116.67	8.612,68

Grupo 18 meses:

NE	AE	AT
32,00	118.57	6.564,23
27,38	113.81	6.564,23
28,33	119.05	7.661,13
28,10	113.81	7.661,13
29,05	110.48	7.571,15
27,38	118.1	5.709,58
29,05	113.81	7.564,23
27,38	117.62	5.861,85
27,38	115.71	6.640,37
28,33	110.48	7.571,15
28,10	116.67	6.612,68
29,05	118.1	6.608,89
27,38	118.57	5.709,58
27,38	110.48	6.571,15
28,33	115.71	6.640,37
28,10	117.62	5.861,85
29,05	116.67	7.612,68
27,38	110.48	7.571,15
27,38	118.1	6.608,89
28,33	118.57	5.709,58
28,10	115.71	6.640,37
29,05	110.48	6.640,37
27,38	116.67	6.612,68
27,38	115.71	6.640,37
28,33	118.1	6.608,89
28,10	118.57	5.709,58
29,05	113.81	5.608,89
27,38	110.48	6.571,15
27,38	117.62	5.861,85
28,33	115.71	7.640,37
28,10	119.05	7.661,13
29,05	113.81	6.564,23
27,38	118.57	5.709,58
27,38	115.71	6.640,37
28,33	113.81	7.661,13
28,10	119.05	7.661,13
29,05	116.67	7.612,68

27,38	118.1	5.709,58
27,38	115.71	6.640,37
28,33	116.19	6.640,37
28,10	117.62	6.861,85
29,05	118.57	6.709,58
27,38	119.05	7.661,13
27,38	113.81	7.608,89
28,33	110.48	6.571,15
28,10	117.62	6.861,85
29,05	113.81	7.564,23
27,38	115.71	7.840,37
27,38	117.62	7.861,85
28,33	119.05	7.661,13
28,10	116.19	7.640,37
29,05	118.57	7.709,58
27,38	115.71	7.640,37
27,38	113.81	8.608,89
28,33	118.57	8.709,58
28,10	119.05	8.661,13
29,05	117.62	7.861,85
27,38	110.48	7.571,15
27,38	113.81	5.608,89
28,33	118.1	5.608,89
28,10	104.76	6.138,50
29,05	97.62	7.411,96
27,38	116.19	7.640,37
27,38	90.48	6.138,50
28,33	80.95	6.138,50
28,10	92.86	6.550,39
29,05	88.1	5.138,50
27,38	95.24	6.550,39
27,38	114.29	7.138,50
28,33	92.86	7.349,67
28,10	104.76	7.640,37
29,05	104.76	6.411,96
27,38	111.90	6.138,50
27,38	88.1	640,37
28,33	97.62	6.640,37

28,10	73.81	7.138,50
29,05	69.05	6.550,39
27,38	61.9	7.349,67
27,38	97.62	7.349,67
28,33	90.48	7.349,67
28,10	80.95	6.391,20
29,05	90.48	6.640,37
27,38	109.52	6.391,20
27,38	76.19	6.335,83
28,33	90.48	6.391,20
28,10	85.71	6.335,83
29,05	76.19	6.138,50
27,38	85.71	7.640,37
27,38	69.05	6.138,50
28,33	76.19	7.138,50
28,10	80.95	6.138,50
29,05	69.05	6.190,48
27,38	76.19	6.138,50
27,38	85.71	6.190,48
28,33	78.57	6.190,48
28,10	92.86	6.138,50
29,05	100	6.138,50
27,38	104.76	6.138,50
27,38	90.48	6.138,50
28,33	113.81	6.138,50
28,10	110.48	7.411,96
29,05	113.81	7.411,96
27,38	116.67	7.335,83
27,38	90.48	6.138,50
28,33	80.95	6.608,89
28,10	92.86	6.608,89
29,05	88.1	6.138,50
27,38	95.24	7.138,50
27,38	114.29	6.335,83
28,33	92.86	6.550,39
28,10	104.76	7.608,89
29,05	104.76	6.138,50
27,38	111.90	6.411,96

27,38	88.1	6.411,96
28,33	97.62	6.271,86
28,10	73.81	7.608,89
29,05	69.05	7608,89
27,38	61.9	7.608,89
27,38	97.62	7.608,89
28,33	90.48	7.608,89
28,10	80.95	7.612,68
29,05	90.48	7.612,68
27,38	109.52	7.612,68
27,38	76.19	7.612,68
28,33	90.48	7.612,68
28,10	85.71	6.550,39
29,05	76.19	6.550,39
27,38	85.71	6.550,39
27,38	69.05	6.550,39
28,33	76.19	6.335,83
28,10	80.95	6.335,83
29,05	69.05	6.335,83
27,38	76.19	6.335,83
27,38	76.19	6.190,48
28,33	71.43	6.190,48
28,10	73.81	6.190,48
29,05	66.67	6.138,50
27,38	100	6.138,50
27,38	104.76	6.138,50
28,33	113.81	6.550,39
28,10	104.76	5.550,39
29,05	111.90	5.550,39
27,38	100	5.550,39
27,38	92.86	5.550,39
28,33	116.19	7.640,37
28,10	104.76	7.640,37
29,05	97.62	7.240,37
27,38	115.71	6.640,37
27,38	100	7.640,37
28,33	76.19	6.349,67
28,10	92.86	6.349,67
29,05	83.33	6.391,20
27,38	104.76	6.571,15
27,38	109.52	6.571,15
28,33	90.48	5.571,15
28,10	95.24	5.571,15
29,05	109.52	6.709,58
27,38	88.1	6.709,58
27,38	118.57	6.709,58
28,33	90.48	7.301,22
28,10	85.71	7.301,22
29,05	78.57	7.301,22
27,38	92.86	7.301,22
27,38	100	7.301,22
28,33	104.76	6.661,13
28,10	90.48	6.564,23
29,05	113.81	6.709,58
27,38	110.48	6.861,85

27,38	113.81	6.861,85
28,33	116.67	6.861,85
28,10	90.48	6.301,22
29,05	80.95	6.301,22
27,38	92.86	6.301,22
27,38	88.1	6.301,22
28,33	95.24	6.301,22
28,10	114.29	7.564,23
29,05	92.86	6.211,24
27,38	104.76	7.453,49
27,38	104.76	7.453,49
28,33	111.90	5.861,85
28,10	88.1	6.411,96
29,05	97.62	6.411,96
27,38	73.81	7.142,03

27,38	69.05	7.142,03
28,33	61.9	7.142,03
28,10	97.62	7.142,03
29,05	90.48	7.142,03
31,19	80.95	7.225,08
25,95	90.48	7.453,49
32,62	109.52	7.453,49
33,81	76.19	6.225,08
32,86	90.48	6.453,49
28,57	85.71	6.142,03
29,05	76.19	6.142,03
30,24	85.71	6.142,03
30,95	69.05	7.142,03
30,71	76.19	6.142,03
30,95	80.95	7.225,08
30,24	69.05	7.225,08
30,95	76.19	7.225,08
30,48	118.57	6.564,23
33,57	113.81	6.564,23
31,43	119.05	6.661,13
30,95	113.81	6.661,13
29,76	110.48	6.571,15
28,57	118.1	5.709,58
27,38	113.81	6.564,23
27,86	117.62	5.861,85
29,05	115.71	7.736,12
23,33	110.48	7.571,15
23,10	116.67	7.612,68
27,86	118.1	6.608,89
28,33	118.57	7.709,58
29,05	110.48	7.571,15
29,76	115.71	6.540,37
30,24	117.62	6.861,85
30,95	116.67	6.612,68
32,14	110.48	6.571,15
28,57	118.1	6.608,89
27,38	118.57	5.709,58
27,38	115.71	7.640,37
28,33	110.48	6.571,15
28,10	116.67	6.612,68
29,05	115.71	6.640,37
31,19	118.1	6.608,89
25,95	118.57	5.709,58
32,62	113.81	6.608,89
33,81	110.48	6.571,15
32,86	117.62	5.861,85
28,57	115.71	7.640,37
29,05	119.05	6.661,13
30,24	113.81	6.564,23
30,95	118.57	5.709,58
30,71		7.661,13
30,95		7.661,13
30,24		7.571,15
30,95		5.709,58
30,48		7.564,23

33,57		5.861,85
31		6.640,37
30,95		7.571,15
29,76		6.612,68
28,57		6.608,89
27,38		5.709,58
27,86		6.571,15
29,05		6.640,37
23,33		5.861,85
23,10		7.612,68
27,86		7.571,15
28,33		6.608,89
29		5.709,58
29,76		6.640,37
30,24		6.640,37
30,95		6.612,68
32,14		6.640,37
28,57		6.608,89
27,38		5.709,58
27,38		5.608,89
28,33		6.571,15
28,10		5.861,85
29,05		7.640,37
31,19		7.661,13
26		6.564,23
32,62		5.709,58
33,81		6.640,37
32,86		7.661,13

28,57		7.661,13
29,05		7.612,68
30,24		5.709,58
30,95		6.640,37
31		6.640,37
30,95		6.861,85
30,24		6.709,58
30,95		7.661,13
30		7.608,89
33,57		6.571,15
31,43		6.861,85
30,95		7.564,23
29,76		7.840,37
28,57		7.861,85
27,38		7.661,13
28		7.640,37
29,05		7.709,58
23,33		7.640,37
23,10	100	8.608,89
27,86	107.14	8.709,58
28,33	104.76	8.661,13
29,05	116.19	7.861,85
29,76	100	7.571,15
30,24	104.76	5.608,89
30,95	104.76	5.608,89
32,14	90.48	6.138,50
28,57	104.76	7.411,96
27,38	90.48	7.640,37

27,38	97.62	6.138,50
28,33	104.76	6.138,50
28,10	92.86	6.550,39
29,05	66.67	5.138,50
31,19	100	6.550,39
25,95	104.76	7.138,50
32,62	97.62	7.349,67
33,81	109.52	7.640,37
32,86	107.14	6.411,96
28,57	104.76	6.138,50
29,05	113.81	640,37
30,24	118.1	6.640,37
30,95	100	7.138,50
30,71	104.76	6.550,39
30,95	107.14	7.349,67
30,24	92.86	7.349,67
30,95	118.1	7.349,67
30,48	100	6.391,20
33,57	109.52	6.640,37
31,43	92.86	6.391,20
30,95	97.62	6.335,83
29,76	95.24	6.391,20
28,57	104.76	6.335,83
27,38	116.67	6.138,50
27,86	113.81	7.640,37
29,05	118.1	6.138,50

Grupo 24 meses:

NE	AE	AT
23,33	116.67	7.138,50
23,10	107.14	6.138,50
27,86	100	6.190,48
28,33	114.29	6.138,50
29,05	116.67	6.190,48
29,76	113.81	6.190,48
30,24	104.76	6.138,50
30,95	111.90	6.138,50
32,14	100	6.138,50
28,57	71.43	6.138,50
27,38	88.1	6.138,50
27,38	92.86	7.411,96
28,33	100	7.411,96
28,10	76.19	7.335,83
29,05	71.43	6.138,50
31,19	73.81	6.608,89
25,95	66.67	6.608,89
32,62	100	6.138,50
33,81	104.76	7.138,50
32,86	113.81	6.335,83
28,57	104.76	6.550,39
29,05	111.90	7.608,89
30,24	100	6.138,50

30,95	92.86	6.411,96
30,71	116.19	6.411,96
30,95	104.76	6.271,86
30,24	97.62	7.608,89
30,95	115.71	7.608,89
30,48	100	7.608,89
33,57	76.19	7.608,89
31,43	92.86	7.608,89
30,95	83.33	7.612,68
29,76	104.76	7.612,68
28,57	109.52	7.612,68
27,38	90.48	7.612,68
27,86	95.24	7.612,68
29,05	109.52	6.550,39
23,33	88.1	6.550,39
23,10	118.57	6.550,39
27,86	90.48	6.550,39
28,33	128.57	6.335,83
29,05	123.81	6.335,83
29,76	119.05	6.335,83
30,24	123.81	6.335,83
30,95	140.48	6.190,48
28,57	113.81	8.661,13
29,05	110.48	7.571,15
30,24	118.1	7.709,58
30,95	113.81	8.564,23
30,71	117.62	8.861,85
30,95	115.71	8.640,37
30,24	110.48	7.571,15
30,95	116.67	7.612,68
30,48	118.1	7.608,89
33,57	118.57	7.709,58
31,43	110.48	7.571,15

30,95	115.71	8.640,37
29,76	117.62	8.861,85
28,57	116.67	8.612,68
27,38	110.48	7.571,15
27,86	118.1	8.608,89
29,05	118.57	8.709,58
23,33	115.71	7.640,37
23,10	110.48	7.571,15
27,86	116.67	8.612,68
28,33	115.71	8.640,37
29,05	118.1	8.608,89
29,76	118.57	6.709,58
30,24	113.81	7.608,89
30,95	110.48	7.571,15
32,14	117.62	8.861,85
28,57	115.71	7.640,37
27,38	119.05	6.661,13
27,38	113.81	7.564,23
28,33	118.57	6.709,58
28,10	115.71	7.640,37
29,05	113.81	7.661,13
31,19	119.05	7.661,13
25,95	116.67	7.612,68
25,48	118.1	6.709,58
23,10	115.71	7.640,37
23,33	116.19	7.640,37
23,57	117.62	7.861,85
24,76	118.57	7.709,58
21,90	119.05	6.661,13
20,24	113.81	7.608,89
21,19	110.48	6.571,15
17,86	117.62	7.861,85
17,62	113.81	7.564,23
16,43	115.71	7.640,37
27,63	117.62	7.861,85
43,00	119.05	7.661,13
37,00	116.19	7.640,37
20,95	118.57	7.709,58
21,43	115.71	7.640,37
22,38	113.81	7.608,89
23,57	118.57	6.709,58
23,10	119.05	7.661,13
22,62	117.62	6.861,85
22,38	110.48	7.571,15
23,57	113.81	7.608,89
23,33	118.1	7.608,89
23,33	104.76	8.138,50
23,57	97.62	6.411,96
23,10	116.19	7.640,37
13,57	100	8.138,50
21,90	104.76	8.138,50
25,71	113.81	7.550,39
26,90	104.76	8.138,50
28,57	111.90	7.550,39
28,10	104.76	7.138,50

27,38	102.38	7.349,67
30,24	116.19	8.640,37
31,43	97.62	7.411,96
32,86	104.76	7.138,50
34,05	97.62	8.640,37
32,62	107.14	8.640,37
23,33	100	8.138,50
24,29	107.14	7.550,39
24,76	104.76	7.349,67
23,81	126.19	7.349,67
24,29	100	7.294,31
23,10	104.76	7.391,20
23,57	104.76	6.640,37
24,05	90.48	6.391,20
24,76	104.76	6.335,83
25,48	90.48	6.391,20
25,95	97.62	6.335,83
25,00	104.76	6.138,50
31,43	92.86	6.640,37
33,57	66.67	8.138,50
37,38	100	8.138,50
35,24	104.76	8.138,50
34,52	97.62	8.190,48
30,95	109.52	8.138,50
29,76	107.14	8.190,48
33,33	104.76	8.190,48
33,10	123.81	8.138,50
37,38	138.1	8.138,50
35,71	100	8.138,50
35,00	104.76	8.138,50
27,22	107.14	8.138,50
31,00	92.86	7.411,96
29,00	109.52	7.411,96
16,19	107.14	7.335,83
13,57	104.76	7.138,50
13,10	113.81	6.608,89
16,67	118.1	6.608,89
11,90	100	8.138,50
11,19	104.76	8.138,50
15,95	107.14	7.335,83
16,67	92.86	6.550,39
20,71	118.1	6.608,89
24,29	100	6.138,50
25,95	109.52	6.411,96
23,33	92.86	6.411,96
21,19	97.62	6.411,96
18,81	95.24	6.608,89
19,52	104.76	6.608,89
23,33	116.67	6.608,89
12,38	113.81	6.608,89
36,67	118.1	6.608,89
26,19	116.67	6.612,68
23,33	107.14	6.612,68
19,52	100	6.612,68
21,19	114.29	6.612,68

30,95	116.67	6.612,68
29,76	113.81	6.550,39
30,95	104.76	6.550,39
29,76	111.90	6.550,39
32,86	100	6.550,39
26,19	71.43	7.335,83
32,14	88.1	7.335,83
37,38	92.86	7.335,83
23,57	100	7.335,83
23,33	76.19	8.190,48
32,62	71.43	8.190,48
33,81	73.81	8.190,48
36,43	66.67	8.138,50
42,38	100	8.138,50
43,33	104.76	8.138,50
30,24	113.81	7.550,39
31,43	104.76	7.550,39
8,81	111.90	7.550,39
16,43	100	7.550,39
19,52	92.86	7.550,39
23,33	116.19	7.640,37
24,05	104.76	7.640,37
27,38	97.62	7.640,37
23,10	115.71	7.640,37
22,62	100	7.640,37
23,57	76.19	7.349,67
24,33	92.86	7.349,67
27,00	83.33	7.391,20
26,00	104.76	7.571,15
25,48	109.52	7.571,15
26,19	90.48	7.571,15
24,29	95.24	7.571,15
23,10	109.52	7.709,58
25,00	88.1	7.709,58
26,19	118.57	7.709,58
25,00	90.48	7.301,22
28,57	85.71	7.301,22
28,10	78.57	7.301,22
27,38	92.86	7.301,22
28,57	100	7.301,22
30,95	104.76	7.661,13
29,76	90.48	7.564,23
17,14	113.81	6.709,58
25,95	110.48	6.861,85
30,48	113.81	6.861,85
31,43	116.67	6.861,85
34,52	100	6.301,22
23,33	104.76	7.301,22
21,19	113.81	7.301,22
20,71	104.76	7.301,22
21,67	111.90	7.301,22
20,24	104.76	6.564,23
20,71	102.38	8.211,24
27,38	116.19	6.453,49
37,62	97.62	6.453,49

38,10	104.76	6.861,85
42,62	115.71	7.411,96
35,71	116.19	7.411,96
34,52	104.76	8.142,03
39,76	113.81	8.142,03
45,00	97.62	8.142,03
36,19	102.38	8.142,03
42,86	95.24	8.142,03
44,05	104.76	8.225,08
42,38	116.19	7.453,49
35,95	97.62	7.453,49
32,86	107.14	7.225,08
30,71	100	7.453,49
28,57	107.14	8.142,03
31,43	104.76	8.142,03
36,67	116.19	8.142,03
40,00	100	8.142,03
42,62	104.76	8.142,03
44,05	104.76	8.225,08
45,24	90.48	8.225,08
47,14	104.76	8.225,08
35,71	90.48	8.301,22
31,94	97.62	8.301,22
28,00	104.76	8.301,22
21,00	92.86	8.301,22
29,00	66.67	7.661,13
32,00	100	7.564,23
21,19	104.76	7.709,58
20,71	97.62	7.861,85
21,67	109.52	7.861,85
20,24	107.14	7.861,85
20,71	104.76	8.301,22
27,38	113.81	8.301,22
37,62	118.1	8.301,22
38,10	100	8.301,22
43,00	104.76	8.301,22
38,00	107.14	7.564,23
29,76	92.86	7.211,24
28,57	118.1	7.453,49
27,38	100	7.453,49
27,86	109.52	7.861,85
29,05	92.86	7.411,96

23,33	97.62	7.411,96
23,10	95.24	8.142,03
27,86	104.76	8.142,03
28,33	116.67	8.142,03
29,05	113.81	8.142,03
29,76	118.1	8.142,03
30,24	116.67	8.225,08
30,95	107.14	7.453,49
32,14	100	8.453,49
28,57	114.29	8.225,08
27,38	116.67	8.453,49
27,38	113.81	8.142,03
28,33	104.76	8.142,03
28,10	111.90	8.142,03
29,05	100	8.142,03
31,19	71.43	8.142,03
25,95	88.1	8.225,08
25,48	92.86	8.225,08
23,10	100	8.225,08
23,33	118.57	7.564,23
23,57	113.81	7.564,23
24,76	119.05	7.661,13
21,90	113.81	7.661,13
20,24	110.48	7.571,15
21,19	118.1	7.709,58
17,86	113.81	7.564,23
17,62	117.62	7.861,85
16,43	115.71	7.640,37
27,63	110.48	7.571,15
43,00	116.67	7.612,68
37,00	118.1	7.608,89
20,95	118.57	6.709,58
21,43	110.48	7.571,15
22,38	115.71	7.640,37
23,57	117.62	6.861,85
23,10	116.67	7.612,68
22,62	110.48	7.571,15
22,38	118.1	7.608,89
23,57	118.57	6.709,58
23,33	115.71	7.640,37
23,33	110.48	7.571,15
23,57	116.67	7.612,68

23,10	115.71	7.640,37
13,57	118.1	7.608,89
21,90	118.57	7.709,58
25,71	113.81	7.608,89
26,90	110.48	7.571,15
28,57	117.62	6.861,85
28,10	115.71	7.640,37
27,38	119.05	7.661,13
30,24	113.81	7.564,23
31,43	118.57	6.709,58
32,86	115.71	7.640,37
34,05	113.81	7.661,13
32,62	119.05	7.661,13
23,33	116.67	7.612,68
24,29	118.1	6.709,58
24,76	115.71	7.640,37
23,81	116.19	7.640,37
24,29	117.62	6.861,85
23,10	118.57	6.709,58
23,57	119.05	7.661,13
24,05	113.81	7.608,89
24,76	110.48	7.571,15
25,48	117.62	6.861,85
25,95	113.81	6.564,23
25,00	115.71	6.640,37
31,43	117.62	6.861,85
33,57	119.05	6.661,13
37,38	116.19	6.640,37
35,24	118.57	6.709,58
34,52	115.71	6.640,37
30,95	113.81	7.608,89
29,76	118.57	6.709,58
33,33	119.05	6.661,13
33,10	117.62	6.861,85
37,38	110.48	6.571,15
35,71	113.81	6.608,89
35,00	118.1	6.608,89
27,22	104.76	8.138,50
31,00	97.62	7.411,96
29,00	116.19	6.640,37

Apêndice III – Peso e estatura dos animais – comparação entre os grupos.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Peso do Animal (g)	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

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Estatura do Animal (cm)	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

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

ANEXO 2: PROTOCOLO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Manuscript submitted - ANDR-2017-0239  Entrada  

 **Andrology** <onbehalfof+andrologyoffice@gmail.com@manuscriptcentral.com> 15 de jun (Há 11 dias) 
para mim

 [inglês](#)  [português](#) [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) 

This email has been sent automatically.

Dr. Pereira de Miranda,

We acknowledge with thanks the receipt of your manuscript entitled "Stereological and morphological analysis of the effects of aging on spermatogenesis in rat testis" to Andrology.

The paper will be sent to the editors and referees, and you will hear from us again soon.

Yours sincerely,

The editorial office



Andrology