

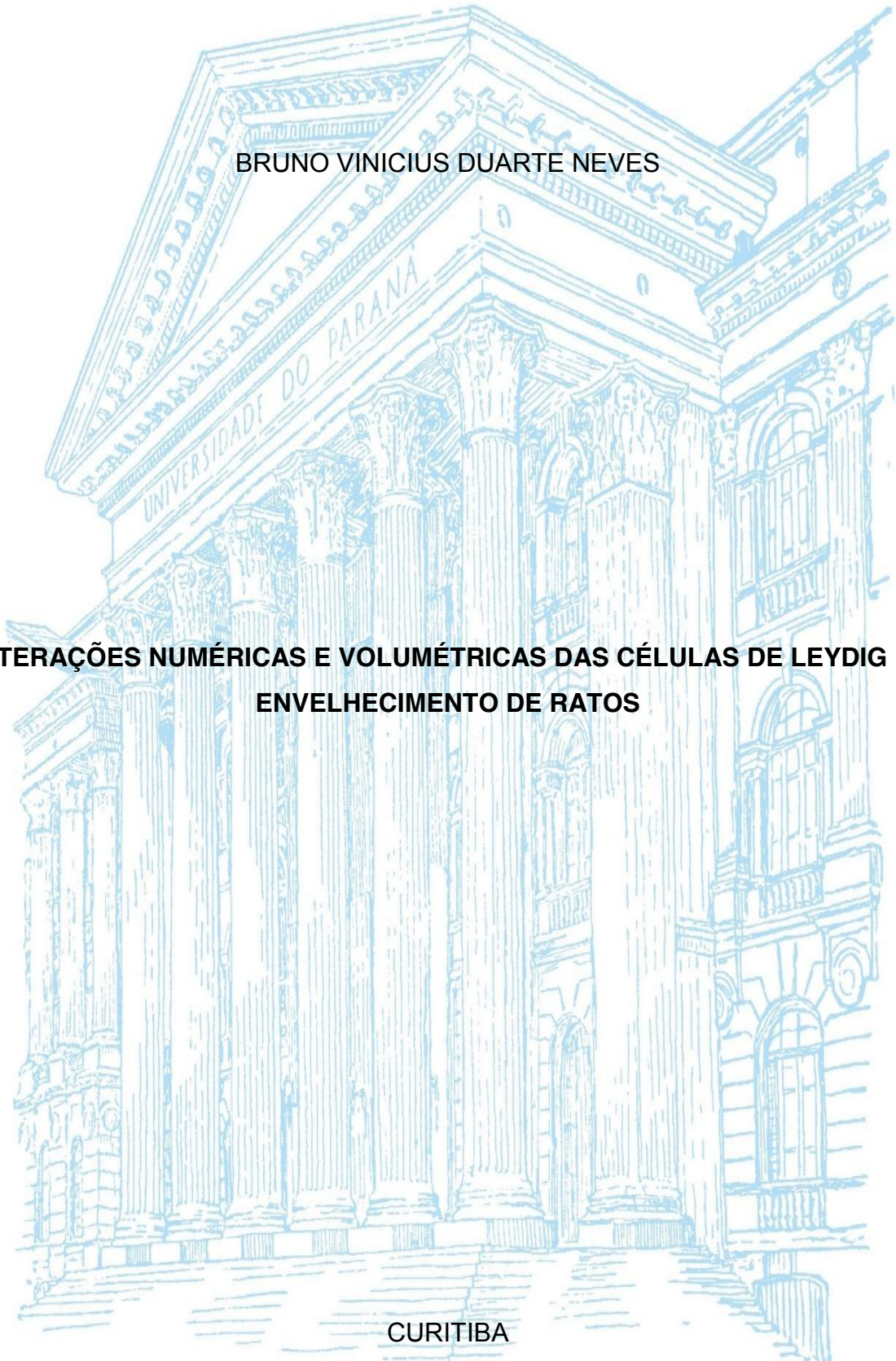
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO VINICIUS DUARTE NEVES

**ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E VOLUMÉTRICAS DAS CÉLULAS DE LEYDIG NO
ENVELHECIMENTO DE RATOS**

CURITIBA

2017



BRUNO VINICIUS DUARTE NEVES

**ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E VOLUMÉTRICAS DAS CÉLULAS DE LEYDIG NO
ENVELHECIMENTO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga
Coorientador: Dr. Fernando Lorenzini

CURITIBA
2017

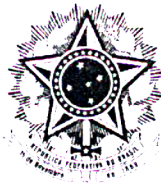
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

N414a Neves, Bruno Vinicius Duarte
Alterações numéricas e volumétricas das células de Leydig e
no envelhecimento de ratos / Bruno Vinicius Duarte Neves. –
Curitiba, 2017.
75 f. : il. color.

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

1. Células de Leydig. 2. Ratos. 3. Envelhecimento. I. Fraga,
Rogério de (orientador). II. Lorenzini, Fernando (co-orientador). III.
Título.

CDU 612.4



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

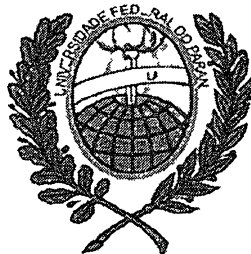
Ata do julgamento da 438ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Bruno Vinicius Duarte Neves** com o trabalho intitulado: "ALTERAÇÕES NUMÉRICAS E VOLUMÉTRICAS DAS CÉLULAS DE LEYDIG NO ENVELHECIMENTO DE RATOS". **Área de Concentração:** Clínica Cirúrgica, **Linha de Pesquisa:** Diagnóstico e Avaliação das repercussões da resposta inflamatória clínica e experimental em cirurgia, tendo como orientador o Professor Doutor Rogerio de Fraga.

Às nove 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: Marcelo Alves Aranha, 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.

Marcelo Alves Aranha

Luiz Sérgio Santos

Renato Tambara Filho



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
SETOR DE CIENCIAS DA SAUDE
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM CLINICA CIRURGICA
NIVEIS MESTRADO E DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno **BRUNO VINICIUS DUARTE NEVES**

Titulo da Dissertação **ALTERAÇÕES NUMERICAS E VOLUMETRICAS
DAS CELULAS DE LEYDIG NO ENVELHECIMENTO DE RATOS**

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Marcelo Alves Aranha	A	9,5
Luiz Sergio Santos	A	9,5
Renato Tambara Filho	A	9,5

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final A Equivalencia 9,5 (NOVE COM O)

Curitiba 17 de julho de 2017

MEMBROS	ASSINATURA
Marcelo Alves Aranha	
Luiz Sergio Santos	
Renato Tambara Filho	

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me concedeu sabedoria para realizar esta obra.

À minha família, coluna forte que me sustenta até os dias de hoje, minha eterna gratidão. Manuella minha esposa pelo amor incondicional, companheirismo e compreensão. Meus pais José e Vera pelo exemplo de vida. Minhas irmãs Amanda e Gabriela pelo amor fraternal. Minha avó Tereza pelos ensinamentos de que as virtudes, valores morais da vida, serão sempre os bens mais valiosos que possuímos.

Aos meus orientadores Professor Dr. Rogério de Fraga e Dr. Fernando Lorenzini, mentores e grandes incentivadores deste projeto, pelos brilhantes ensinamentos concedidos. Obrigado pela dedicação e paciência durante a construção deste trabalho.

À Professora Djanira Aparecida da Luz Veronez pela disponibilidade e atenção dispendida durante os estudos estereológicos.

Aos amigos do peito, parceiros e colegas de profissão Marcelo Zeni, Eduardo Felipe Melchiorretto que estiveram próximos transmitindo valiosos conhecimentos de forma justa. Ao companheiro de mestrado, junto desde os primórdios, Eduardo Pereira de Miranda, que sigamos em frente galgando degraus rumo a mais completa formação profissional.

Ao demais amigos e colegas de residência: Rafael Cavalheiro Cavalli, Mateus Cosentino Bellote, Christian Luiz Artner, Thiago Hota e Roberto Kincheski por compartilhar experiências e fazer parte da mais gloriosa fase acadêmica de um médico.

Finalmente agradeço a todos os professores que cruzaram meu caminho até os dias de hoje. Nada supera o sentimento de admiração que tenho por aqueles que me fizeram ser melhor do que ontem.

“HAPPINNES IS ONLY REAL WHEN SHARED.”

“A felicidade só é verdadeira quando partilhada.”

Christopher McCandless *AKA* Alexander Supertramp

RESUMO

Introdução: As células de Leydig são responsáveis pela produção de testosterona e sofrem os efeitos deletérios do envelhecimento. Com o avançar da idade, ocorre uma diminuição na esteroidogênese por alterações celulares ainda pouco conhecidas. **Objetivos:** Analisar os efeitos do envelhecimento nos ratos sobre o volume nuclear, citoplasmático, volume total e o número absoluto das células de Leydig. **Material e métodos:** Selecionados 72 ratos machos *Wistar*, aleatoriamente divididos em seis subgrupos com 12 roedores cada. Os animais foram submetidos à orquiectomia direita aos 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses de vida. Foram avaliados o peso e o volume do testículo direito. Realizado estudo estereológico das células de Leydig com medidas do volume nuclear, citoplasmático, volume total e contabilizado o número destas células. **Resultados:** O peso e o volume dos testículos apresentaram reduções que acompanharam o desenvolvimento corporal dos ratos. O volume nuclear apresentou redução no subgrupo de ratos com 24 meses de vida. O volume citoplasmático e o volume total das células de Leydig apresentaram reduções significativas nos subgrupos de ratos idosos (18 e 24 meses). Não houve redução na contagem das células de Leydig nos subgrupos. **Conclusão:** O envelhecimento nos ratos causou alterações nas células de Leydig, caracterizadas pela redução do volume nuclear, citoplasmático e total. Não houve variação numérica destas células.

Palavras-chave: Envelhecimento. Ratos. Testículo. Células de Leydig. Estereologia. Hipogonadismo. Testosterona.

ABSTRACT

Introduction: Leydig cells are responsible for producing testosterone and suffer the deleterious effects of time. With aging, there is a decrease in testosterone production due to cellular changes that remain unknown. **Purpose:** To analyze the effects of aging in rats on the nuclear volume, cytoplasmic volume, and total volume of Leydig cells, as well as their number. **Methods:** Seventy-two Wistar rats were divided into six subgroups of 12 rats, which underwent right orchiectomy at 3, 6, 9, 12, 18, and 24 months of age. The weight and volume of the resected testicles were assessed. A stereological study of Leydig cells was conducted, which included measurements of cell number and nuclear, cytoplasmic, and total cell volumes. **Results:** The weight and volume of the resected testicles showed reductions with age. Only the subgroup composed of 24-month old rats showed a decrease in the nuclear volume of Leydig cells. Significant reductions in the cytoplasmic volume and total volume of Leydig cells were observed in 18- and 24-month old rats. The number of Leydig cells did not vary significantly with age. **Conclusion:** Aging in rats resulted in reduction of the nuclear, cytoplasmic, and total cell volumes of Leydig cells. There was no change in the total number of these cells during aging.

Keywords: Aging. Rats. Leydig Cells. Testicle. Hypogonadism. Testosterone. Stereology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ANÁLISE MICROSCÓPICA DO TESTÍCULO DE RATOS WISTAR. COMPONENTE TUBULAR E INTERSTICIAL	20
FIGURA 2 – FUNCIONAMENTO ESQUEMÁTICO DAS CÉLULAS DE LEYDIG NA PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA	21
FIGURA 3 – MEDIÇÃO DO TESTÍCULO COM PAQUÍMETRO.....	25
FIGURA 4 – ORQUIECTOMIA DIREITA.....	25
FIGURA 5 – CORTE DOS TESTÍCULOS.....	26
FIGURA 6 – LÂMINAS DOS TESTÍCULOS.....	26
FIGURA 7 – ANÁLISE MICROSCÓPICA, DAS CÉLULAS DE LEYDIG	26
FIGURA 8 – IMAGENS MICROSCÓPICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	27
FIGURA 9 – SISTEMA-TESTE M42 SUPERPOSTO AO PARÊNQUIMA TESTICULAR. DISTÂNCIA “D” = 100 MICRÔMETROS. AUMENTO DE 40X.....	28

LISTA DE SIGLAS

CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAEM	Distúrbio Androgênico do Envelhecimento Masculino
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
G5	Grupo 5
G6	Grupo 6
LCAN	Número absoluto das células de Leydig
LCCV	Volume citoplasmático das células de Leydig
LCNV	Volume nuclear das células de Leydig
LCTV	Volume total das células de Leydig
LH	Hormônio Luteinizante
SNK	<i>Student Newman Keuls</i>
TSPO	Proteínas de Translocação
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VC	Volume Citoplasmático
VN	Volume Nuclear
Vol	Volume Total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	22
2	ANIMAIS E MÉTODOS	23
2.1	GRUPOS	23
2.2	EXPERIMENTAÇÃO	23
2.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMETRIA.....	28
2.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO.....	28
2.4.1	Estudo estereológico das células de Leydig.....	29
2.4.1.1	Volume Nuclear (VN) das células de Leydig	29
2.4.1.2	Volume Citoplasmático (VC) das células de Leydig	29
2.4.1.3	Volume Total (VOL) das células de Leydig	29
2.4.1.4	Número Total (NA) das células de Leydig.....	29
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3	ARTIGO	31
4	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE 1 – TABELAS	51
	ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR	73
	ANEXO 2 – PROTOCOLO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NO JORNAL CIENTÍFICO ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA	75

1 INTRODUÇÃO

A evolução das sociedades atuais proporcionou um aumento na expectativa de vida com conseqüente ampliação da população idosa mundial. Este fenômeno vem transformando as pirâmides etárias e pode ser considerado uma conquista, oferecendo maior qualidade de vida (VERAS, 2009).

Segundo definição da Política Nacional, idosos são os indivíduos que estão na faixa etária dos 60 anos ou mais. No Brasil, calcula-se que 20.590.599 milhões de pessoas tenham atingido esta idade, em torno de 10,8% da população. Os brasileiros enfrentam um envelhecimento populacional rápido e significativo. Desde a década de 40 as maiores taxas de crescimento populacional encontram-se nos idosos. Entre 1980 e 2005, este crescimento foi de 126,3%, comparados ao crescimento da população total de 55,3% (KÜCHEMANN, 2012).

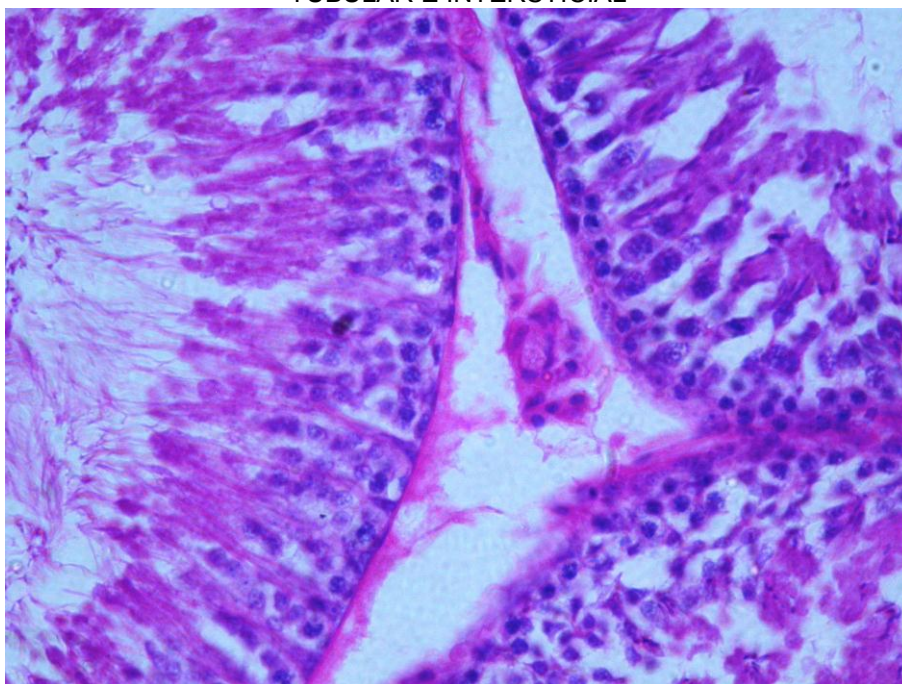
Dentre as várias alterações observadas com o avanço da idade, encontra-se a função gonadal. Estima-se que ocorra um declínio hormonal em 7% dos homens com menos de 60 anos, 20% em homens com mais de 60 anos, 30% naqueles com mais de 70 anos e 50% em homens acima de 80 anos de idade (HARMAN et al., 2001). O envelhecimento pode reduzir os níveis de testosterona produzidos pelos testículos em aproximadamente 1% a 2% ao ano (FELDMAN et al., 2002). O declínio na testosterona associado a sintomas clínicos caracteriza o Distúrbio Androgênico do Envelhecimento Masculino (DAEM) (MORALES; LUNENFELD, 2002). Alterações estruturais no corpo como: perda de massa muscular, problemas na cognição, depressão, perda da libido, disfunção erétil e também doenças como diabetes e síndrome metabólica são conseqüências dos níveis diminuídos de andrógenos (BASSIL; ALKAADE; MORLEY, 2009; MATSUMOTO, 2002).

Atualmente, existe um grande interesse na terapia de reposição hormonal (BASARIA, 2013; JASUJA, 2015). A utilização do tratamento com testosterona exógena eleva os níveis de testosterona para os limites da normalidade (DIAS, 2017).

O testículo é uma glândula com funções exócrinas e endócrinas advindas dos seus compartimentos funcionais: tubular e intersticial, respectivamente (RUSSELL et al., 1990). O compartimento tubular é o mais extenso setor do parênquima testicular. Ele é composto por túbulos seminíferos, células peritubulares, matriz extracelular e é responsável pela espermatogênese. Em contrapartida, a

porção intersticial (que ocupa 10% a 30% deste órgão) é formada por vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, população celular mista (macrófagos, fibroblastos) e principalmente pelas células de Leydig (HALES, 2002; RUSSELL et al., 1990;). Apresentando um formato poligonal, a célula de Leydig tem características microscópicas eosinofílicas (PELLINIEMI; KUOPIO; FRÖJDMAN, 1996). Esta célula foi descoberta em 1850 por Franz Leydig, ela está intimamente relacionada com a produção hormonal de testosterona (FAWCET; NEAVES; FLORES, 1973). Produzindo andrógenos, a célula de Leydig tem grande relevância na diferenciação e desenvolvimento do trato genital masculino. Ela apresenta papel trivial no surgimento dos caracteres sexuais secundários, na manutenção do processo espermatogênico e desempenho sexual dos homens (HEIDELBAUGH, 2010; PELLINIEMI; KUOPIO; FRÖJDMAN, 1996).

FIGURA 1 – ANÁLISE MICROSCÓPICA DO TESTÍCULO DE RATOS WISTAR. COMPONENTE TUBULAR E INTERSTICIAL

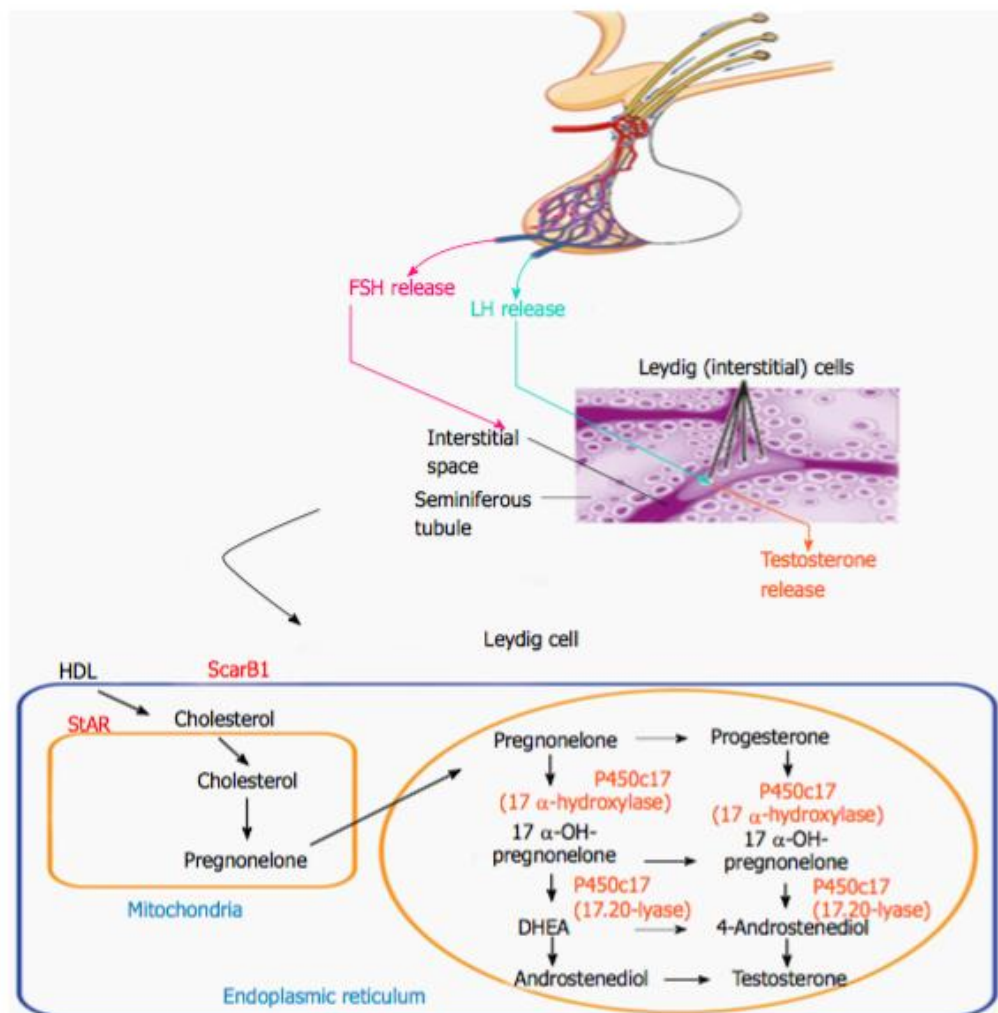


FONTE: O autor (2016).

Após atingir a idade adulta, o hormônio luteinizante (LH) se torna o principal regulador e estimulador das células de Leydig. Em resposta ao GnRH proveniente do hipotálamo, o LH é liberado pela adeno-hipófise de forma pulsátil na circulação periférica (VELDHUIS, 2008). A produção de testosterona envolve a interação do LH com seus receptores resultando em um aumento intra-celular de AMPc com posterior ativação da proteína quinase A (PKA) AMPc dependente. A PKA

desencadeia mecanismos que resultam na entrada do colesterol nas membranas das mitocôndrias através das proteínas de translocação (TSPO) e proteína reguladora aguda esteroidogênica ativada (StAR) (ANDRIC et al., 2010). Nas mitocôndrias, o colesterol é convertido em pregnenolona por inúmeras enzimas catabólicas responsáveis pela esteroidogênese. Posteriormente, no retículo endoplasmático liso, ocorre a conversão da pregnenolona em testosterona (PAYNE; HALES, 2004). Este hormônio esteróide e seus sub-produtos, fazem o feedback negativo no hipotálamo e hipófise, suprimindo o LH (BREMNER et al., 1993).

FIGURA 2 – FUNCIONAMENTO ESQUEMÁTICO DAS CÉLULAS DE LEYDIG NA PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA



Fonte: PEAK (2016).

Diversos estudos demonstram um declínio nos níveis de testosterona com o envelhecimento, mesmo na ausência de doenças (HARMAN et al., 2001). Assim como nos humanos, os ratos também apresentam diminuição na concentração

sérica de testosterona com o avançar da idade (CHEN; LUO; ZIRKIN, 1994). Nos ratos da raça Wistar, considera-se um animal idoso quando sua capacidade de produção hormonal e reprodutiva é reduzida, em torno dos 15 a 20 meses de vida (ZHAO, 2010).

Este hipogonadismo senil poderia ser justificado por uma diminuição do número ou hipotrofia das células de Leydig, mas também por uma diminuição da resposta testicular ao estímulo das gonadotrofinas (VELDHUIS, 2008). Foi observado nos estudos de Castro, Berndtson e Cardoso (2002) que existe uma correlação significativa entre o número de células de Leydig por grama de testículo com os níveis séricos de testosterona (CASTRO; BERNDTSON; CARDOSO, 2002).

A estereologia, é um método que sistematiza as amostras e as analisa aleatoriamente para fornecer um resultado quantitativo com um mínimo viés. A utilização desta ferramenta, permite aos pesquisadores obterem dados confiáveis independentemente da forma, tamanho e orientação espacial de um determinado órgão. As análises estereológicas podem estudar parâmetros histológicos e celulares de quaisquer tecido. Alguns desafios práticos estão presentes em órgãos anisotrópicos, os quais não possuem distribuição celular definida. O testículo é um deles, portanto, são necessárias amostras sistemáticas para evitar o viés (NOORAFSHAN, 2014).

Utilizar a estereologia para analisar as células de Leydig nos testículos de ratos, auxiliaria num maior entendimento da disfunção hormonal da testosterona. Devido a grande importância clínica do tema, este estudo visa analisar alterações volumétricas e numéricas das células de Leydig durante o processo natural do envelhecimento.

1.1 OBJETIVOS

O presente estudo foi proposto com os seguintes objetivos:

- a) avaliar através da estereologia o volume nuclear, o volume citoplasmático, o volume total e o número absoluto das células de Leydig; utilizando ratos em diferentes fases de suas vidas.
- b) analisar as características físicas dos ratos (peso e altura) e dos testículos (peso e volume) durante o envelhecimento;

2 ANIMAIS E MÉTODOS

O experimento realizado seguiu rigorosamente todos os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências do *Canadian Concil on Animal Care* (1993).

Este trabalho derivou de um projeto previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), intitulado: “Avaliação anátomo-fisiológica do envelhecimento urogenital masculino”. Seguindo as normas e rotinas foi apreciado e aprovado sob o processo de número: 23075.032620/2010-10 (Anexo 1).

2.1 GRUPOS

Para realização do presente estudo foram utilizados 72 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), do sexo masculino. Estes animais foram mantidos em gaiolas de polietileno com medidas de 60 x 50 x 22 cm e distribuídos em grupos de três animais por gaiola. As gaiolas foram devidamente identificadas com o nome do experimento e data de nascimento dos animais. A umidade e temperatura do ar (22 graus Celsius) foram controladas, realizado ciclo claro/escuro de doze horas. Os roedores foram mantidos livres de ruídos externos, receberam água filtrada e ração comercial padrão específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital[®] – Colombo, Paraná, Brasil), *ad libitum* durante todo o período do experimento.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em seis grupos de doze animais cada, sendo mortos conforme os diferentes tempos de vida de cada grupo:

Grupo 1: G1 (3 meses)	Grupo 2: G2 (6 meses)	Grupo 3: G3 (9 meses)	Grupo 4: G4 (12 meses)	Grupo 5: G5 (18 meses)	Grupo 6: G6 (24 meses)
------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

2.2 EXPERIMENTAÇÃO

A execução do experimento ocorreu no Departamento de Anatomia do Centro Politécnico da UFPR (Curitiba, PR) em dias pré-determinados. Os animais, divididos em grupos por suas respectivas idades, foram separados em gaiolas individuais até o laboratório para sua morte e coleta de materiais.

Foram realizadas as medidas corporais dos animais: peso (balança calibrada ultrassensível), estatura (medição com paquímetro digital) e cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC), através da fórmula: peso (em gramas) / estatura (em cm²).

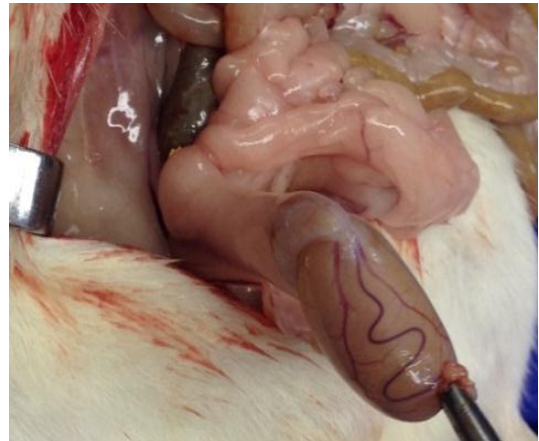
Os animais foram anestesiados com solução de Cloridrato de Cetamina (57,67mg/ml) associado a 2% de Cloridrato de Xilazina (0,2g/10 mL), com aplicação de 1ml/1000 gramas de peso vivo, via intraperitoneal. Após o procedimento anestésico, os roedores foram fixados com fita adesiva em prancha cirúrgica e submetidos a incisão mediana tóraco-abdominal. Com acesso ao coração, os ventrículos foram puncionados e coletado 5-10 mL de amostra sanguínea para análise bioquímica. Na sequência, realizado incisão dos ventrículos causando exsanguinação e indução de parada cardiorrespiratória. O ato operatório prosseguiu com a realização da orquiectomia bilateral e retirada de demais órgãos. O testículo direito foi selecionado e pesado em balança de precisão semi analítica (Shimadzu, BL220S). Suas dimensões (comprimento, largura, profundidade) foram mensuradas com o uso de paquímetro digital (Digimess®), sendo registrados os dados para análise. Posteriormente, o testículo direito foi incisado em 2mm de extensão e profundidade no pólo superior, terço médio e pólo inferior. Subsequentemente, o órgão foi submerso e fixado em ALFAC (85 partes de álcool etílico 80%, 10 partes de formaldeído 40% e 5 partes de ácido acético glacial, preparado no momento do uso) por 16 horas.

FIGURA 3 – MEDIÇÃO DO TESTÍCULO COM PAQUÍMETRO



Fonte: O autor (2016).

FIGURA 4 – ORQUIECTOMIA DIREITA

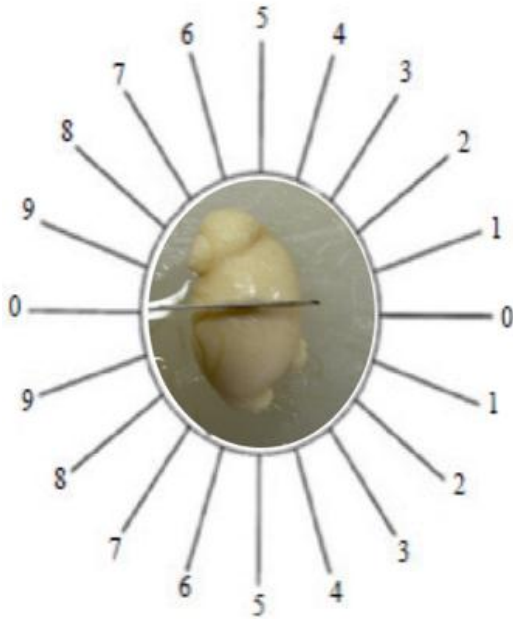


Fonte: O autor (2016).

Após a fixação, as peças permaneceram em álcool 70% e em seguida este material foi desidratado em uma série decrescente de xilol e álcoois para serem incluídos em parafina e emblocados. Como o testículo é um órgão anisotrópico, utilizou-se o método do *Orientator* (MATTFELDT; MOBIUS; MALL, 1985) para obtenção de cortes aleatórios e uniformes (FIGURA 5). 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 procede-se o terceiro corte, perpendicular ao segundo, mas com direção também aleatória. Desta forma, o parênquima testicular organizou-se uniformemente em isotrópico. Os materiais selecionados foram submetidos aos cortes sucessivos em micrótomo com 5 μm de espessura (*American Optical, Spencer AO 820*). A amostragem do tecido testicular foi realizada com dois cortes, excluindo entres eles três cortes de 5 μm , totalizando espessura de 25 μm entre os planos para a determinação dos parâmetros quantitativos tridimensionais. Foram montados 3 cortes por lâmina e corados pelo método HE (hematoxilina e eosina) (Figuras 6). Para determinar a tridimensão do testículo nas diferentes faixas etárias pré-determinadas, foram utilizados o método estereológico Sistema-teste M_{42} . Esse foi superposto as imagens histológicas para a contagem de pontos e de intersercções-teste (FIGURA 3).

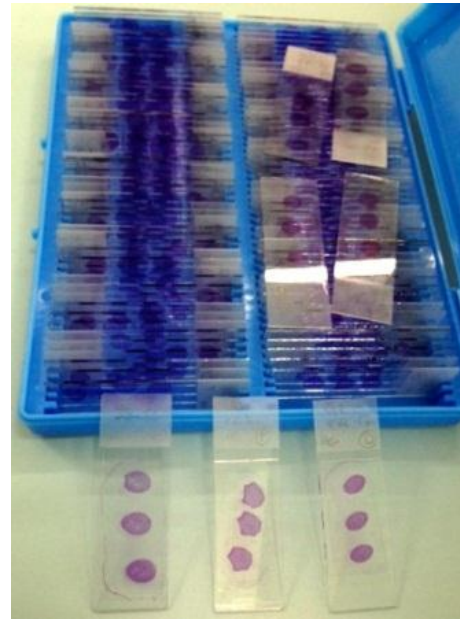
Os testículos esquerdos foram armazenados (congelados em freezer -80°C) para futuro estudo sobre stress oxidativo. Outros órgãos como: rins, bexiga, fígado, pênis, cérebro, coração e aorta foram utilizados em outros estudos.

FIGURA 5 – CORTE DOS TESTÍCULOS



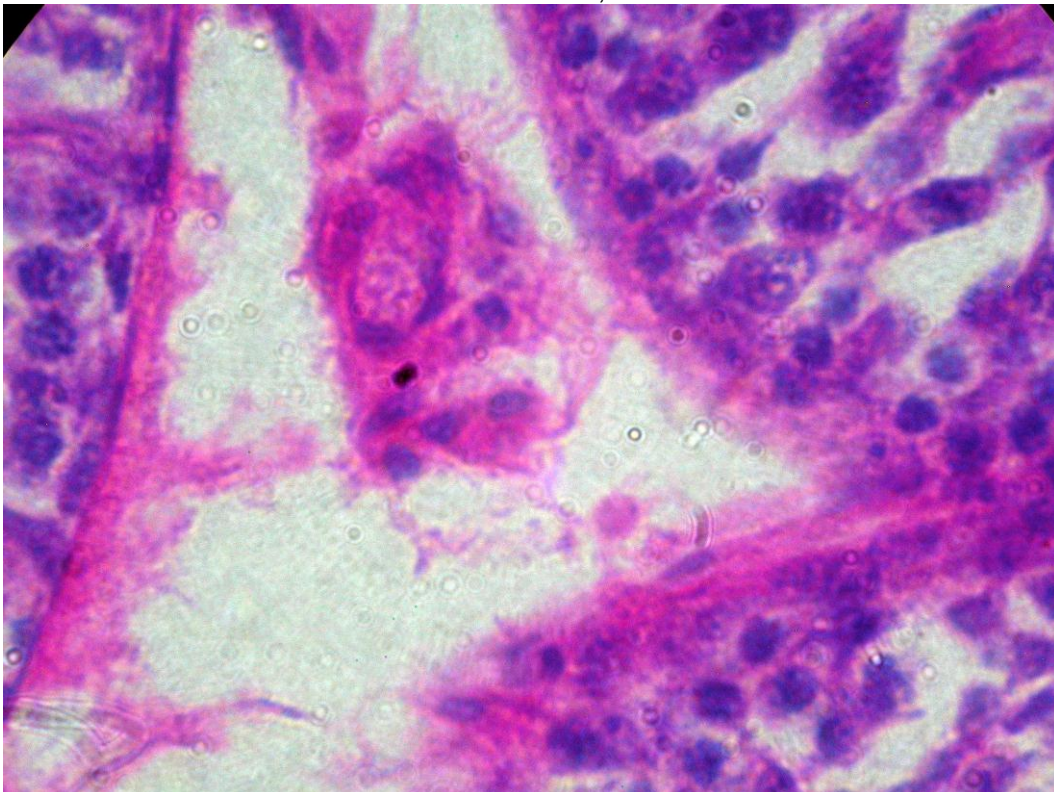
Fonte: O autor (2016).

FIGURA 6 – LÂMINAS DOS TESTÍCULO



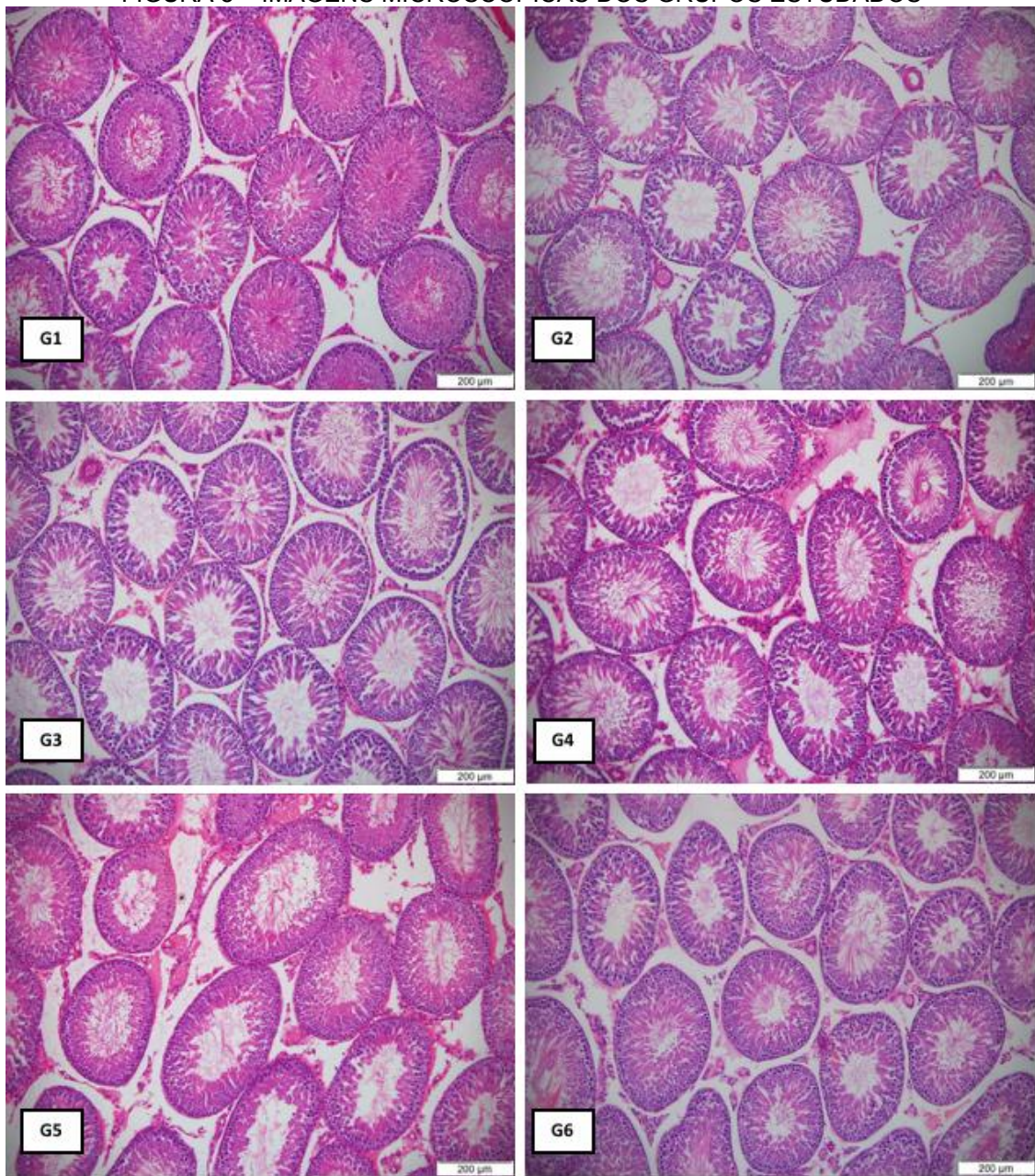
Fonte: O autor (2016).

FIGURA 7 – ANÁLISE MICROSCÓPICA, DAS CÉLULAS DE LEYDIG



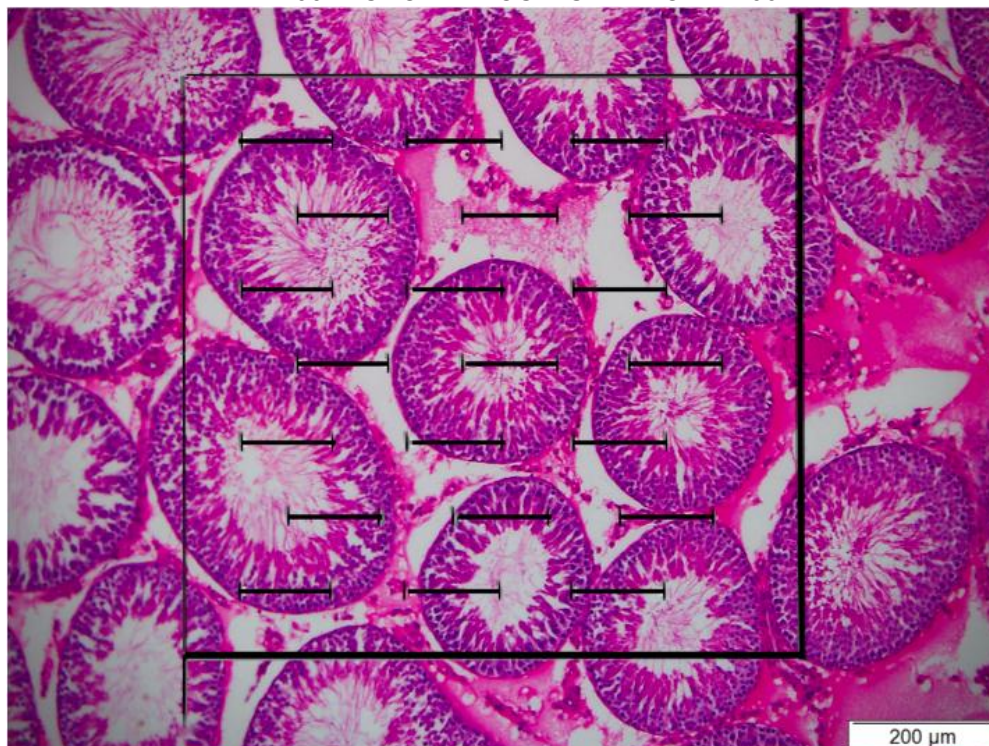
Fonte: O autor (2016).

FIGURA 8 – IMAGENS MICROSCÓPICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS



Fonte: O autor (2016).

FIGURA 9 – SISTEMA-TESTE M42 SUPERPOSTO AO PARÊNQUIMA TESTICULAR. DISTÂNCIA “D” = 100 MICRÔMETROS. AUMENTO DE 400X



FONTE: O autor (2016).

2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMETRIA

Dados das medidas corporais e testiculares foram obtidos conforme descrição prévia da experimentação.

O volume testicular foi calculado usando a fórmula: comprimento x largura x altura x 0.523 (SAKAMOTO et al., 2007).

2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO

As lâminas confeccionadas foram processadas eletronicamente. Captadas imagens de dez campos histológicos aleatórios de cada testículo estudado. Utilizado fotomicroscópio Axiophoto (Zeiss, D-7082) com aumento de 400 vezes para as análises quantitativas e volumétricas das células de Leydig. As imagens congeladas e digitalizadas foram analisadas por meio do Software MetaSystem / VSViewer.

2.4.1 Estudo estereológico das células de Leydig

Calculado os volumes nuclear, citoplasmático e em seguida o volume total das células de Leydig. O número absoluto destas células foi obtido através da densidade numérica.

2.4.1.1 Volume Nuclear (VN) das células de Leydig

Para obtenção do diâmetro nuclear médio das células de Leydig foram analisadas imagens microscópicas captadas com objetiva de 40 vezes. Mensurados e selecionados para cada animal, 10 núcleos com contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos bem evidentes.

O cálculo do VN utilizou a fórmula $VN = 4/3 \pi R^3$; onde R = raio nuclear.

2.4.1.2 Volume Citoplasmático (VC) das células de Leydig

O VC foi calculado a partir da fórmula $VC = \%citoplasma \times VN\% \text{ núcleo}$.

2.4.1.3 Volume Total (VOL) das células de Leydig

O VOL foi obtido somando o VN ao VC. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos (μm^3).

2.4.1.4 Número Absoluto (NA) das células de Leydig

O método *Physical Disector* (Sterio, 1984) foi utilizado para identificação do número absoluto (NA) das células de Leydig. O *disector* foi obtido por meio das fotomicrografias realizadas no fotomicroscópio Axiophoto (Zeiss, D-7082) de 10 campos microscópicos iguais, a partir dos cortes sucessivos do testículo. Este método consiste na contagem de núcleos presentes na secção referência e ausentes na secção *look-up* (secção separada a partir de uma determinada altura da secção referência). O mesmo procedimento foi realizado no sentido oposto, ou seja, o que era a secção referência passa a ser a *look-up*. Esse procedimento foi adotado para aumentar o número de *disectors*.

A aplicação dos *disectors* foi sistemática e aleatória para cobrir todos os cortes do testículo.

A densidade numérica foi obtida dividindo a somatória de Q^- de todos os *disectors* pela somatória do volume total dos *disectors* ($Vdis$). Esta última variável, obtida pelo produto da área do Sistema-teste e altura do *disector*:

$$Vdis = a \cdot h$$

$Vdis$ = volume total dos *disectors*

a = área do Sistema-teste

h = altura do *disector*

$$Nv = \Sigma Q^- / \Sigma Vdis$$

Nv = densidade numérica das células de Leydig

ΣQ^- = somatória das células de Leydig

$\Sigma Vdis$ = somatória do volume total dos *disectors*

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros estatísticos deste estudo, foram realizados por meio da análise de variância *one-way* (ANOVA). Comparado os diferentes resultados de cada grupo, utilizando teste t com *post Hoc* de *Student Newman Keuls* (SNK).

As análises e gráficos, foram gerados pelo software de estatística GraphPad Prism 6. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

3 ARTIGO

Os dados da presente tese – resultados e discussão – foram submetidos para análise e publicação no jornal científico *Acta Cirúrgica Brasileira*, (fator de impacto 0.1329 pela *Scielo*, em 2016) – anexos.

ARTICLE

*Numeric and volumetric changes in Leydig cells during aging of rats^I***Bruno Vinicius Duarte Neves^I****Fernando Lorenzini^{II}****Djanira Veronez^{III}****Eduardo Pereira de Miranda^{IV}****Gabriela Duarte Neves^V****Rogério de Fraga^{VI}**

^IFellow Master degree, Postgraduate Program in Surgical Clinic, Department of Urology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba-PR, Brazil. Substantive scientific and intellectual contributions to the study; conception and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; technical procedures; histopathological examinations; statistics analysis; manuscript writing; critical revision.

^{II}PhD, MD, Department of Urology, School of Medicine, UFPR, Curitiba-PR, Brazil. Substantive scientific and intellectual contributions to the study; conception and design; critical revision.

^{III}PhD, Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, UFPR, Curitiba-PR, Brazil. Substantive scientific and intellectual contributions to the study; conception and design; analysis and interpretation of data; histopathological examinations; critical revision.

^{IV}MD, Volunteer, Department of Urology, UFPR, Curitiba-PR, Brazil. Acquisition of data; technical procedures; histopathological examinations; critical revision.

^VGraduate student, School of Medicine, UNIVILLE, Joinville-SC, Brazil. Acquisition of data; technical procedures; histopathological examinations.

^{VI}PhD, Associate Professor, Department of Urology, School of Medicine, UFPR, Curitiba-PR, Brazil. Substantive scientific and intellectual contributions to the study; conception and design; analysis and interpretation of data; statistics analysis; critical revision.

Abbreviations:

Leydig cells (LC)

Testosterone (TT)

Group 1 (G1) / Group 2 (G2) / Group 3 (G3) / Group 4 (G4) / Group 5 (G5) / Group 6 (G6)

Leydig cell nuclear volume (LCNV)

Leydig cell cytoplasmic volume (LCCV)

Leydig cell total volume (LCTV)

Leydig cell absolute number (LCAN)

Numerical density (N_v)

Abstract

Purpose: To analyze the effects of aging in rats on the nuclear volume, cytoplasmic volume, and total volume of Leydig cells, as well as their number.

Methods: Seventy-two Wistar rats were divided into six subgroups of 12 rats, which underwent right orchietomy at 3, 6, 9, 12, 18, and 24 months of age. The weight and volume of the resected testicles were assessed. A stereological study of Leydig cells was conducted, which included measurements of cell number and nuclear, cytoplasmic, and total cell volumes.

Results: The weight and volume of the resected testicles showed reductions with age. Only the subgroup composed of 24-month old rats showed a decrease in the nuclear volume of Leydig cells. Significant reductions in the cytoplasmic volume and total volume of Leydig cells were observed in 18- and 24-month old rats. The number of Leydig cells did not vary significantly with age.

Conclusion: Aging in rats resulted in reduction of the nuclear, cytoplasmic, and total cell volumes of Leydig cells. There was no change in the total number of these cells during aging.

Keywords: Aging. Rats. Leydig Cells. Testicle. Hypogonadism. Testosterone. Stereology.

Introduction

A decline in gonadal function is one change that occurs in aging men (1). Even in the absence of disease, testosterone (TT) produced by testicles decreases progressively with age (2). This phenomenon, known as senile hypogonadism, has also been observed in rats (3).

Leydig cells (LCs), first discovered in 1850 by Franz Leydig, are closely associated with production of the hormone TT (4). Given their role in the production of androgens, these cells are important for differentiation and development of the male genital tract (5). However, LCs suffer the deleterious effects of cell aging, and can gradually lose their capacity for TT synthesis (6).

The mechanisms that cause this drop in steroidogenesis are still poorly understood (7). Stereology, the histological examination of cell structures (8), might facilitate a better understanding of this process. This study aims to evaluate volumetric and numeric changes in Leydig cells during aging by examining rats of different ages.

Methods

Animal husbandry and surgery

This study followed the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Federal University of Paraná (UFPR) Committee for Ethics in Research (case number 23075.032620/2010-10).

Seventy-two male albino Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) were used for the study. Relative humidity was maintained between 50% and 60%, and the ambient temperature was maintained at 22 °C, with a 12-hour light/dark cycle and minimal external noise. Access to water and standard food was provided on an *ad libitum* basis.

The rats were divided into six groups—designated G1 to G6—with 12 animals in each group, which underwent orchietomy at 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months of age, respectively.

For surgical procedures, the rats were anesthetized intraperitoneally with ketamine hydrochloride (57.67 mg/ml) and xylazine hydrochloride (2% w/v) at a dose of 1 ml/kg body weight. A one-punch cardiac puncture was carried out in the morning for blood sampling and induction of cardiac arrest by exsanguination. This was followed by resection of testicles, kidneys, bladder, liver, brain, heart, aorta, and penis. The right testicle was weighed on a high-precision electronic balance, and its dimensions (length, width, height) were measured with a digital caliper. The remaining organs were used in other studies.

Morphometric and histological analysis

Testicular volume was calculated using the following formula: length × width × height × 0.523 (9).

Incisions 2 mm in length and depth were made in the top, middle, and lower poles of the testicles, to improve penetration of the fixative (80% alcohol, formaldehyde, and acetic acid). The testicles were kept in the fixative solution for 16 hours, then dehydrated by passage through solutions of xylene and alcohol. Since the testicle is a non-isotropic organ, the orientator method (10) was employed to obtain uniform sections. The pieces of fixed testicle

were embedded in paraffin and sliced 5- μm thick using a microtome (American Optical Spencer AO 820). Three sections per blade were prepared and stained with hematoxylin and eosin (HE).

The sections were studied using a photomicroscope (Zeiss Axiophot D-7082) at 400 \times magnification. Digital images of ten random histological fields from each section were captured. Images were analyzed in MetaSystem VSVIEWER software.

Stereological study of Leydig cells

Leydig cell nuclear volume (LCNV)

To obtain the mean nuclear diameter of LCs, ten nuclear cores were overlaid with a circular contour. The following formula was used for this calculation: $\text{LCNV} = \frac{4}{3} \pi R^3$, where R = nuclear radius.

Leydig cell cytoplasmic volume (LCCV)

LCCV was calculated by applying the following formula: $\text{LCCV} = \% \text{cytoplasm} \times \% \text{nucleus}$.

Leydig cell total volume (LCTV)

LCTV was evaluated as the sum of LCNV and LCCV, expressed in cubic micrometers (μm^3).

Leydig cell absolute number (LCAN)

LCAN, which corresponds to the numerical density (N_v) of LCs, or the number of LCs per unit volume of testis, was estimated using the disector method (11). The disectors were compiled by joining photomicrographs of ten equal microscopic fields of each histological section of the testicle. The disector method involves counting the nuclei that are observable in a reference section and *not* observable in a look-up section separated from the reference section by a known distance. We carried out this procedure in both directions (i.e., moving from the reference section to the look-up section and *vice versa*) to increase the number of disectors. Disectors were overlaid systematically and randomly to cover the area encompassing all testicle sections.

N_v was obtained by dividing the sum of the number of disectors ($\sum Q^-$) by the sum of their volumes ($\sum V_{\text{dis}}$), which was obtained from the product of the test area and the disector height:

$$V_{\text{dis}} = a \times h$$

Where V_{dis} is the total volume of the disector, a is the test area, and h is the disector height.

Thus, N_v can be obtained from the following formula:

$$N_v = \frac{\sum Q^-}{\sum V_{\text{dis}}}$$

Where $\sum Q^-$ is the number of disectors and $\sum V_{\text{dis}}$ is the sum of the disectors volumes.

Statistical analysis

All parameters were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). In cases where a significant difference between groups was indicated, the results were compared using the Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test. All analyses and graphs were generated using GraphPad Prism 6 statistical software. The significance threshold was 95% ($p < 0.05$).

Results

There was no loss of subjects; all rats remained alive until the predetermined time at which all the members of the group were sacrificed. Figure 1 shows the morphological characteristics of the animals and Figure 2 shows the morphometric characteristics of the resected testicles.

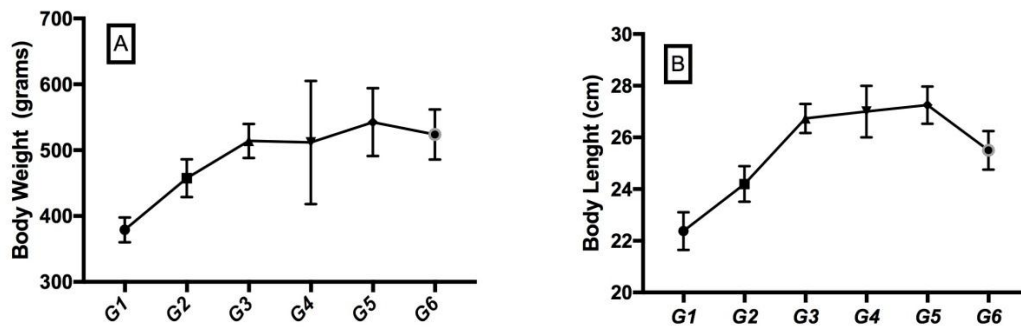


Figure 1 - A, mean body weight of rats in different age groups; B, mean body length of rats in different age groups

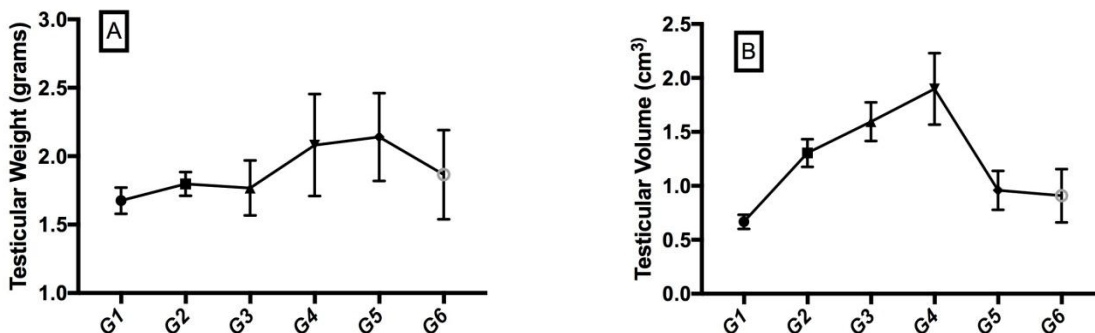


Figure 2 - A, mean testicular weight of rats in different age groups; B, mean testicular volume of rats in different age groups

LCNV was generally constant across age groups, except for G6, which exhibited a statistically significant reduction (Figure 3 and Table 1). However, LCCV values were observed to decrease progressively as the age of the rats increased, as demonstrated in Figure 4; statistically significant differences in LCCV were found when G1 was compared with the other groups (Table 2). Consequently, LCTV also declined gradually with age (Figure 5 and Table 3). In contrast, LCVAN varied minimally between different age groups; no statistically significant differences were observed (Figure 6).

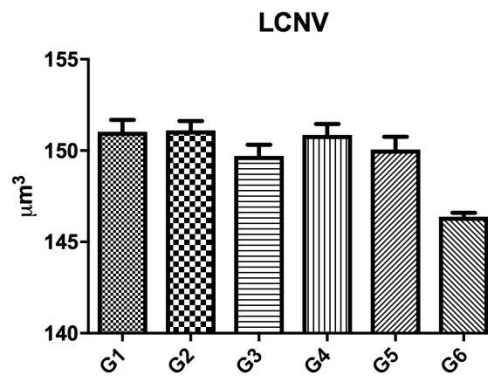


Figure 3 – Leydig cell nuclear volume (LCNV) of rats in different age groups

Table 1 – Comparison of mean Leydig cell nuclear volume (LCNV) between groups with different ages

Group	Versus Group	Absolute difference between groups	p	Mean LCVN (μm ³)
G1	G2	0.08	ns	151.05
	G3	1.32	ns	
	G4	0.17	ns	
	G5	0.97	ns	
	G6	4.64	*	
G2	G3	1.4	ns	150.98
	G4	0.25	ns	
	G5	1.05	ns	
	G6	4.7	*	
G3	G4	1.14	ns	149.58
	G5	0.34	ns	
	G6	3.32	*	
G4	G5	0.79	ns	150.39
	G6	4.46	*	
G5	G6	3.67	ns	149.93
G6	-	-	-	146.49

ns, not significant; *p < 0.05, post-hoc Student-Newman-Keuls test

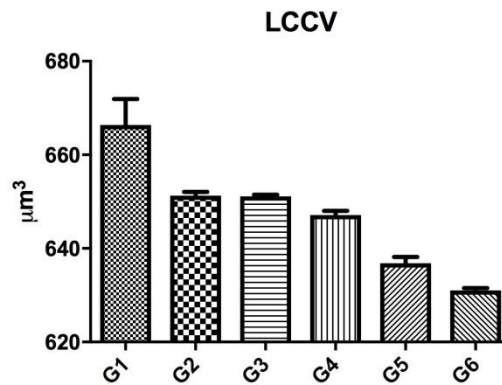


Figure 4 – Leydig cell cytoplasmic volume (LCCV) of rats in different age groups

Table 2 – Comparison of mean Leydig cell cytoplasmic volume (LCCV) between groups with different ages

Group	Versus Group	Absolute difference between groups	p	Mean LCCV (μm ³)
G1	G2	15.08	*	653.84
	G3	15.24	*	
	G4	19.23	*	
	G5	29.57	*	
	G6	35.37	*	
G2	G3	0.16	ns	651.38
	G4	4.15	ns	
	G5	14.49	*	
	G6	29.30	*	
G3	G4	3.99	ns	650.92
	G5	14.33	*	
	G6	20.14	*	
G4	G5	10.34	*	646.88
	G6	16.14	*	
G5	G6	5.805	ns	636.46
G6	-	-	-	631.22

ns, not significant; *p < 0.05, post-hoc Student-Newman-Keuls test

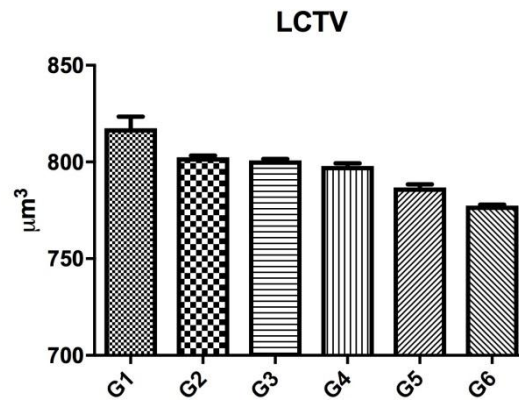


Figure 5 –Leydig cell total volume (LCTV) of rats in different age groups

Table 3 – Comparison of mean Leydig cell total volume (LCTV) between groups with different ages

Group	Versus Group	Absolute difference between groups	p	Mean LCTV (μm ³)
G1	G2	14.99	*	804.84
	G3	16.56	*	
	G4	19.41	*	
	G5	30.54	*	
	G6	40.01	*	
G2	G3	1.56	ns	803.62
	G4	4.41	ns	
	G5	11.13	*	
	G6	25.02	*	
G3	G4	2.84	ns	802.02
	G5	13.98	*	
	G6	23.46	*	
G4	G5	11.13	*	798.77
	G6	20.61	*	
G5	G6	9.47	*	787.06
G6	-	-	-	777.54

ns, not significant; *p < 0.05, post-hoc Student-Newman-Keuls test

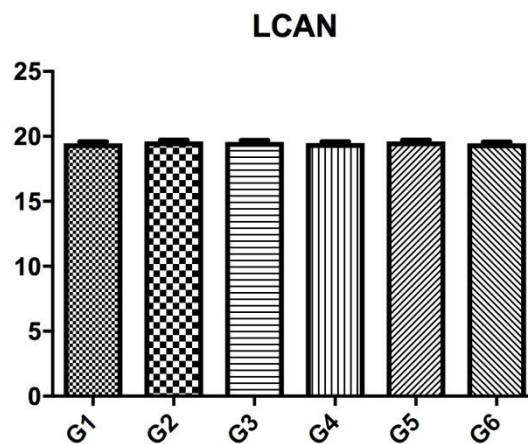


Figure 6 – Leydig cell absolute number (LCAN) of rats in different age groups

Discussion

During testicular development in rodents, LCs divide themselves into fetal and adult types. Fetal-type LCs ensure that the embryo develops as a male and undergo apoptosis after birth (12). Adult-type LCs, which originate from mesenchymal precursor cells, begin to differentiate 14 days after birth and gradually mature over time (13).

In rats, adult-type LCs progress through four developmental stages: stem cells until the 14th day after birth, progenitor cells until the 28th day, immature cells until the 56th day, and adult cells, characterized by high hormone production, after the 56th day (14). TT serum levels begin to rise on the seventh day after birth, and continue to increase until peaking on the 45th day (15). Rats achieve sexual and reproductive maturity between 40 and 60 days after birth and can live for up to three years. According to an editorial that established equivalencies between the ages of rats and humans, G1 and G6 rats may be considered equivalent in age to 27- and 61-year old humans, respectively (16).

Zirkin et al. have shown that serum levels of TT decrease with age in brown rats (3); this finding was confirmed by Wang et al. by characterization of intratesticular TT levels in rats at 22 weeks of age (17).

In the present study, the animals gained weight and grew in length until an age of 18 months, and subsequently decreased. Testicular weight and volume followed an almost identical trend. Comparable decreases in testicular weight have also been observed in rats subjected to chronic stress (18).

LCNV reduction in elderly rats may be related to chromatin remodeling and telomere shortening, which preclude cells from replicating in old age. Reductions in LCCV and LCTV are possibly associated with hypotrophy of cytoplasmic organelles, which also impairs steroidogenesis. These volumetric reductions predominantly occurred as the animals reached an advanced age, when the negative effects of aging are more evident. In previous stereological studies, it was established that the mean volume of LCs in rats declines with age (19), and it was shown that the total volume of LCs per testicle and their mean cell volume remain stable until six months of age, with significant reductions observed only in 12- and 19-month old rats (20).

In this study, LCAN remained constant as the rats aged. Similarly, Wang et al. demonstrated that the number of LCs in old rats (up to 21 months of age) is not lower than the number of LCs in young rats (18), and Chen et al. detected no difference in the number of LCs upon stereological analysis (19). Thus, the decline in TT levels with age cannot be explained by loss of LCs (17,21); this change is the result of LCs dysfunction rather than death (7).

In old age, adult-type LCs stop dividing. They exhibit defects in steroidogenic pathways and decreased hormone production (14,22). However, decreases in TT serum levels are not accompanied by changes in luteinizing hormone (LH) serum levels, and must therefore be caused by impaired stimulation of LCs.

LH stimulation increases LC volume and the number of subcellular organelles (endoplasmic reticulum and mitochondria), with a consequent elevation in TT levels due to increased capacity for hormone production. In contrast, deprivation of LH leads to hypotrophic changes in cell structure (23).

Haolin et al. conducted a study on in vitro cultures of young and old LCs, which were exposed directly to LH. Even when the LH concentration was maintained at the same level for both cultures, old LCs were unable to produce testosterone at levels comparable to those of young cells. The authors concluded that old LCs have defects in the LH-AMPC signaling cascade, which is involved in testosterone production (24).

Steroidogenesis by LCs is affected by age for multiple reasons: reduction of cAMP levels, decreased intracellular transport of cholesterol by the steroidogenic acute regulatory (StAR) and translocator (TSPO) proteins, and reduction of the activity of enzymes in mitochondria (CYP11A1, HSD3B) and the smooth endoplasmic reticulum (HSD3B, CYP17A1, HSD17B) (25).

Many potential causes of senescence in LCs have been proposed, including lesions by free radicals (26). It could also be speculated that lesions in the cell membrane are the most likely cause of senescence in LCs. This would explain the reduction in cAMP signaling in response to LH stimulation (14, 18). Oxidative stress is known to occur during steroidogenesis by LCs, and this may explain the volumetric changes identified in this work. The free radical theory advances the idea that aging is the result of cumulative cellular damage over time (27). This damage is caused by free radicals produced by catabolic pathways, and increases with age (28).

Hormonal changes during aging are of great clinical and scientific interest. The future offers interesting possibilities of improvement in TT production, such as LCs replacement by stem cell transplantation (29). New therapies currently under development, such as the use of drugs to stimulate hormone production in LCs, have shown encouraging results (30). Additional structural and morphometric evaluations are needed to corroborate these findings, followed by assays of oxidative stress.

Conclusion

Aging in rats was accompanied by hypotrophic changes in Leydig cells. Stereological analyses revealed a reduction in the nuclear, cytoplasmic, and total volumes of these cells. There was no concomitant reduction in cell number.

References

1. Matsumoto AM. Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* [Internet]. 2002 Feb;57(2):M76–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818427>
2. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):589–98.
3. Zirkin BR, Santulli R, Strandberg JD, Wright WW, Ewing LL. Testicular steroidogenesis in the aging brown Norway rat. *J Androl*. 1993;14(2):118–23.
4. Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* [Internet]. 1973;9(5):500–32. Available from: <http://www.bioreprod.org/content/9/5/500.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4203289>
5. Heidelbaugh JJ. Management of erectile dysfunction. *Am Fam Physician* [Internet]. 2010 Feb 1;81(3):305–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112889>
6. Zirkin BR, Chen H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod*. 2000;63:977–81.
7. Chen H, Huhtaniemi I, Zirkin BR. Depletion and repopulation of Leydig cells in the testes of aging brown Norway rats. *Endocrinology* [Internet]. 1996 Aug;137(8):3447–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8754773>
8. Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. *Ann Anat*. 2014;196(1):57–66.
9. Sakamoto H, Saito K, Oohta M, Inoue K, Ogawa Y, Yoshida H. Testicular volume measurement: comparison of ultrasonography, orchidometry, and water displacement. *Urology*. 2007;69(1):152–7.
10. Mattfeldt T, Möbius 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* [Internet]. 1985 Sep;139(Pt 3):279–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3908688>
11. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984;134(2):127–36.
12. Huhtaniemi I, Pelliniemi L. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992;201(2):125–40.
13. Nef S, Shipman T, Parada LF. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev Biol* [Internet]. 2000;224(2):354–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160600997859>
14. Chen H, Ge RS, Zirkin BR. Leydig cells: from stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;306(1–2):9–16.

15. Benton L, Shan L-X, Hardy MP. Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53(1):61–8.
16. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775–7.
17. Wang C, Leung A, Sinha-Hikim AP. Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology* [Internet]. 1993;133(6):2773–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243304>
18. Wang FF, Wang Q, Chen Y, Lin Q, Gao HB, Zhang P. Chronic stress induces ageing-associated degeneration in rat Leydig cells. *Asian J Androl* [Internet]. 2012;14(4):643–8. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22609820&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/aja.2011.183>
19. Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR. Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the Brown Norway rat. *J Androl* [Internet]. 1994;15(6):551–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7721657>
20. Kim I, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC. Changes in the testis interstitium of Brown Norway rats with aging and effects of luteinizing and thyroid hormones on the aged testes in enhancing the steroidogenic potential. *Biol Reprod* [Internet]. 2002;66(5):1359–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967198>
21. Ichihara I, Kawamura H, Pelliniemi LJ. Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tissue Res*. 1993;271(2):241–55.
22. Koeva Y, Bakalska M, Atanassova N, Georgieva K, Davidoff M. Age-related changes in the expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat Leydig cells. *Folia Histochem Cytobiol* [Internet]. 2009;47(2):281–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19995715
23. Mendis-Handagama SMLC. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histol Histopathol*. 1997;12(3):869–82.
24. Chen H, Hardy MP, Zirkin BR. Age-related decreases in Leydig cell testosterone production are not restored by exposure to LH in vitro. *Endocrinology*. 2002;143(5):1637–42.
25. Beattie MC, Adekola L, Papadopoulos V, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging and hypogonadism. *Exp Gerontol*. 2015;68:87–91.
26. Finkel T, Holbrook NJ, Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Caratelli M, et al. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* [Internet]. 2000;408(6809):239–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.024><http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.002><http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21467629><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3978761&tool=pm>
27. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* [Internet]. 1956;11(3):298–300. Available from: <https://academic.oup.com/geronj/article-lookup/doi/10.1093/geronj/11.3.298>
28. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* [Internet]. 1992 Aug 28;257(5074):1220–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1355616>
29. Yang Y, Li Z, Wu X, Chen H, Xu W, Xiang Q, Zhang Q., Chen J, Ge RS, Su Z, Huang Y. Direct reprogramming of mouse fibroblasts toward Leydig-like cells by defined factors. *Stem Cell Reports*. 2017;8(1):39–53.
30. Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS. Sildenafil treatment in vivo stimulates

Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2010;299(4):E544-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663985>

Conflict of interest: none

Financial source: none

Research performed at Laboratory of Anatomy and Experimental Surgery, Division of Urology, Department of Surgery, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba-PR, Brazil. Part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Surgical Clinic. Tutor: Rogério de Fraga and Fernando Lorenzini.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo estereológico identificou reduções nos volumes nucleares, nos volumes citoplasmáticos e nos volumes totais das células de Leydig durante o processo natural de envelhecimento em ratos. Não foram evidenciadas alterações numéricas nestas células.

A hipotrofia nas células de Leydig deve ser melhor avaliada e futuros trabalhos devem ser conduzidos para explicar as reduções volumétricas, incluindo análises do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ANDRIC, S. A. et al. Sildenafil treatment in vivo stimulates Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 299, n. 4, p. 544-550, Oct. 2010.
- BASARIA, S. Testosterone therapy in older men with late: onset hypogonadism: a counter-rationale. **Endocr Pract**, Jacksonville, v. 19, p. 853-863, 2013.
- BASSIL, N.; ALKAADE, S.; MORLEY, J. E. The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. **Ther Clin Risk Manag**, Albany, v. 5, p. 427-448, 2009.
- BREMNER, W. J. et al. Neuro-endocrine aspects of the control of gonadotropin secretion in men. In: WHITCOMB, R. W.; ZIRKIN, B. R. (Eds.). **Understanding male infertility: basic and clinical aspects**. New York: Raven Press, 1993. p. 29-41.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa: CCAC, 1993. v. 1
- CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 35, p. 493-498, 2002.
- CHEN, H.; LUO, L.; ZIRKIN, B. R. Leydig cell structure and function during aging. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (Eds.). **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996. p. 222-230.
- DIAS, J. P. et al. Testosterone vs. aromatase inhibitor in older men with low testosterone: effects on cardiometabolic parameters. **Andrology**, Oxford, v. 5, p. 31-40, 2017.
- FAWCET, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol Reprod**, v. 9, p. 500-532, Dec. 1973.
- FELDMAN, H. A. et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v. 87, n. 2, p. 589-598, Feb. 2002.
- HALES, D. B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **J Reprod Immunol**, Amsterdam, v. 57, p. 3-18, 2002.
- HARMAN, S. M. et al. Baltimore Longitudinal Study of Aging: longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men: Baltimore Longitudinal Study of Aging. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v. 86, n. 2, p. 724-731, Feb. 2001.

HEIDELBAUGH, J. J. Management of erectile dysfunction. **Am Fam Physician**, Kansas City, v. 81, n. 305-312, 2010.

JASUJA, G. K. et al. Ascertainment of testosterone prescribing practices in the VA. **Med Care**, Philadelphia, v. 53, p. 746-75, 2015.

KÜCHEMANN, B. A. Envelhecimento populacional, cuidado e cidadania: velhos dilemas e novos desafios. **Sociedade e Estado**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 165-180, 2012.

MATSUMOTO, A. M. Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, Washington, v. 57, n. 2, p. 76-99, Feb. 2002.

MATTFELDT, T.; MOBIUS, H. J.; MALL, G. Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. **J Microsc**, Oxford, v. 139, n. 3, p. 279-289, 1985.

MORALES, A.; LUNENFELD, B. International Society for the Study of the Aging Male. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. **Aging Male**, New York, v. 5, n. 2, p. 74-86, Jun. 2002.

NOORAFSHAN, A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. **Ann Anat**, Jena, v. 196, p. 57-66, 2014.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocr Rev**, Chevy Chase, v. 25, p. 947-970, 2004.

PEAK, T. C. et al. Stem cell therapy for the treatment of Leydig cell dysfunction in primary hypogonadism. **World J Stem Cells**, Beijing, v. 8, n. 10, p. 306-315, Oct. 2016.

PELLINIEMI, L. J.; KUOPIO, T.; FRÖJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A. H.; HARDY, M. P.; RUSSELL, L. D. (Org.). **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, 1996. Cap. 5. p. 143- 157.

RUSSELL, L. D. et al. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L. D. et al. (Org.). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990. Cap. 1. p. 1-40.

SAKAMOTO, H. et al. Testicular volume measurement: comparison of ultrasonography, orchidometry, and water displacement. **Urology**, New York, v. 69, n. 1, p. 152-157, Jan. 2007.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **J Microsc**, Oxford, v. 134, n. 2, p. 127-36, 1984.

VELDHUIS, J. D. Aging and hormones of the hypothalamo–pituitary axis: gonadotropic axis in men and somatotropic axes in men and women. **Ageing Res Rev**, Oxford, v. 7, p. 189-208, 2008.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 548-554, 2009.

ZHAO, W. et al. Impaired Bladder Function in Aging Male Rats. **J Urol**, Baltimore, v. 184, n.1, p. 378-385, 2010.

APÊNDICE 1 – TABELAS

TABELA MEDIDA ALTURA DOS RATOS

ALTURA DOS RATOS EM CENTÍMETROS					
G1	G2	G3	G4	G5	G6
21	23,5	26,8	30	29	26
24	24	27	27,5	26	26
22,5	25	27,5	29	26	24
21,5	23	27,5	26,5	27	28
21	26,5	25	28	27	26
22	25,5	27	27	28	26
23,5	23,7	25,5	27,5	27	25
23,5	23,5	26	24	28	26
22,5	23,1	26,5	26,5	29	24
24	24,2	28	26	26	26
22	25	26,5	26	26	25
21	23,4	27,5	26	28	24
Ratos 1-12	Ratos 13-24	Ratos 25-36	Ratos 37-48	Ratos 49-60	Ratos 61-72

TABELA ANÁLISE ESTATÍSTICA ALTURA DOS RATOS

TABLE ANALYZED	ALTURA RATOS				
Data sets analyzed	A : G1	B : G2	C : G3	D : G4	E : G5
ANOVA summary					
F	31,38				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0,7039				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.5291 (5, 66)				
P value	0,7534				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	3,709				
P value	0,5921				

(continua)

TABELA ANÁLISE ESTATÍSTICA ALTURA DOS RATOS

TABLE ANALYZED		ALTURA RATOS			
P value summary		ns			
Are SDs significantly different (P < 0.05)?		No			
ANOVA table		SS	DF	MS	F (DFn, DFd) P value
Treatment (between columns)		219,5	5	43,89	F (5, 66) = 31.38 P<0.0001
Residual (within columns)		92,32	66	1,399	
Total		311,8	71		
Data summary					
Number of treatments (columns)		6			
Number of values (total)		72			

(conclusão)

TABELA PESO RATOS

PESO DOS RATOS EM GRAMAS					
G1	G2	G3	G4	G5	G6
376	499	481	595	592	532
408	422	509	564	470	580
383	422	474	510	441	539
353	406	543	575	573	616
328	555	464	610	520	456
343	481	589	573	673	561
386	453	471	562	412	527
376	404	473	540	478	469
396	432	531	549	570	469
438	494	551	58	618	612
367	445	537	520	531	464
395	476	545	484	634	460
Ratos 1-12	Ratos 13-24	Ratos 25-36	Ratos 37-48	Ratos 49-60	Ratos 61-72

TABELA ANÁLISE ESTATÍSTICA PESO RATOS

TABLE ANALYZED	PESO RATOS				
Data sets analyzed	A : G1	B : G2	C : G3	D : G4	E : G5
ANOVA summary					
F	7,232				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0,3539				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1,113 (5, 66)				
P value	0,3623				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	37,12				
P value	<0,0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	219609	5	43922	F (5, 66) = 7,232	P<0,0001
Residual (within columns)	400855	66	6074		
Total	620464	71			
Data summary					
Number of treatments (columns)	6				
Number of values (total)	72				

TABELA DADOS MORFOMÉTRICOS DOS TESTÍCULOS

Grupo 3 meses (ratos 1-12)													média
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	1,675
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 Antero-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	
VOLUME:	0,62	0,71	0,84	0,75	0,67	0,66	0,66	0,58	0,52	0,56	0,84	0,59	0,666666667
Grupo 6 meses (ratos 13-24)													
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	1,7975
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 Antero-Posterior (cm)	1,06	0,96	1,04	0,98	1,22	1,19	1,05	1,08	1	1,1	1	1	
VOLUME:	1,42	1,1	1,3	1,2	1,65	1,69	1,3	1,3	1,2	1,3	1	1,2	1,305

(continua)

TABELA DADOS MORFOMÉTRICOS DOS TESTÍCULOS

Grupo 9 meses (ratos 25-36)													
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	1,768333333
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 Antero-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	
VOLUME:	1,6	1,49	0,85	1,7	1,63	1,66	1,89	1,72	1,84	1,36	1,86	1,54	1,595
Grupo 12 meses (ratos 37-48)													
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	2,0825
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 Antero-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	
VOLUME:	1,87	1,64	1,94	1,64	1,77	1,79	3,48	1,78	1,64	2,02	1,77	1,44	1,898333333
Grupo 18 meses (ratos 49-60)													
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	2,14
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 Antero-Posterior (cm)	0,9	1	0,8	1	1,1	0,9	0,8	0,8	1	1	1,1	0,8	
VOLUME:	0,9	1	0,8	1	1,5	0,9	0,6	0,7	0,9	1	1,5	0,7	0,958333333
Grupo 24 meses (ratos 61-72)													
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	2,089166667
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 Antero-Posterior (cm)	0,9	0,9	0,6	0,9	0,9	1	1	0,7	0,9	0,9	1	1	
VOLUME:	0,8	0,9	0,3	0,8	1,1	0,9	1,1	0,6	0,6	0,9	1	1,9	0,908333333

(conclusão)

TABELA PESO TESTÍCULOS – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Table Analyzed	Peso Testículos				
Data sets analyzed	A : G1	B : G2	C : G3	D : G4	E : G5
ANOVA summary					
F	2,518				
P value	0,0381				
P value summary	*				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0,1622				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1.519 (5, 65)				
P value	0,1962				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	32,44				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	2,032	5	0,4065	F (5, 65) = 2.518	P=0.0381
Residual (within columns)	10,49	65	0,1614		
Total	12,53	70			
Data summary					
Number of treatments (columns)	6				
Number of values (total)	71				
One-way analysis of variance					
P value	0,0381				
P value summary	*				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				

(continua)

TABELA PESO TESTÍCULOS – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Table Analyzed	Peso Testículos				
Number of groups	6				
F	2,518				
R squared	0,1622				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	32,44				
P value	< 0,0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2,032	5	0,4065		
Residual (within columns)	10,49	65	0,1614		
Total	12,53	70			
Newman-Keuls Multiple Comparison Test					
	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	
G1 vs G5	-0,465	4,009	No	ns	
G1 vs G4	-0,4067	---	No	ns	
G1 vs G6	-0,1905	---	No	ns	
G1 vs G2	-0,1225	---	No	ns	
G1 vs G3	-0,09333	---	No	ns	
G3 vs G5	-0,3717	---	No	ns	
G3 vs G4	-0,3133	---	No	ns	
G3 vs G6	-0,09712	---	No	ns	
G3 vs G2	-0,02917	---	No	ns	
G2 vs G5	-0,3425	---	No	ns	
G2 vs G4	-0,2842	---	No	ns	
G2 vs G6	-0,06795	---	No	ns	
G6 vs G5	-0,2745	---	No	ns	
G6 vs G4	-0,2162	---	No	ns	
G4 vs G5	-0,05833	---	No	ns	

(conclusão)

TABELA VOLUME DOS TESTÍCULOS – ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Table Analyzed	Volume testículos				
Data sets analyzed	A : G1	B : G2	C : G3	D : G4	E : G5
ANOVA summary					
F	24,55				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0,6503				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.7074 (5, 66)				
P value	0,6199				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	26,52				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	12,96	5	2,591	F (5, 66) = 24.55	P<0.0001
Residual (within columns)	6,966	66	0,1055		
Total	19,92	71			
Data summary					
Number of treatments (columns)	6				
Number of values (total)	72				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	12,96	5	2,591		
Residual (within columns)	6,966	66	0,1055		
Total	19,92	71			

(continua)

TABELA VOLUME DOS TESTÍCULOS – ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Table Analyzed	Volume testículos			
Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary
G1 vs G4	-1,232	13,13	Yes	***
G1 vs G3	-0,9283	9,899	Yes	***
G1 vs G2	-0,6383	6,806	Yes	***
G1 vs G5	-0,2917	3,11	No	ns
G1 vs G6	-0,2417	---	No	ns
G6 vs G4	-0,99	10,56	Yes	***
G6 vs G3	-0,6867	7,322	Yes	***
G6 vs G2	-0,3967	4,23	Yes	*
G6 vs G5	-0,05	---	No	ns
G5 vs G4	-0,94	10,02	Yes	***
G5 vs G3	-0,6367	6,789	Yes	***
G5 vs G2	-0,3467	3,696	Yes	*
G2 vs G4	-0,5933	6,327	Yes	***
G2 vs G3	-0,29	3,092	Yes	*
G3 vs G4	-0,3033	3,234	Yes	*

(conclusão)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA

VC = VOLUME DO CITOPLASMA DAS CÉLULAS DE LEYDIG (μm^3)					preto = grupo 06 meses			
VN = VOLUME DOS NÚCLEOS DAS CÉLULAS DE LEYDIG (μm^3)					vermelho = grupo 09 meses			
VOL = VOLUME DAS CÉLULAS DE LEYDIG (μm^3)					azul = grupo 12 meses			
NA = DENSIDADE DAS CÉLULAS DE LEYDIG POR ÁREA (μm^2)					laranja = grupo 18 meses			
					azul claro = grupo 24 meses			
Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
1	698,37	157,14	855,51	20	694,08	153,54	847,63	19,3
	689,49	154,76	844,25	22				
	701,21	153,81	855,02	19				
	683,91	158,17	842,08	21				
	679,77	153,81	833,58	19				
	701,99	147,62	849,61	17				
	679,48	157,62	837,1	20				
	703,77	150,48	854,25	18				
	699,14	153,81	852,95	18				
703,71	148,19	851,9	19	691,71	154,1	845,81	20	
701,21	154,76	855,97	20					
683,91	157,62	841,53	21					
679,77	157	836,31	21					
701,74	149,74	851,48	19					
699,32	154,76	854,08	19					
688,78	153,81	842,59	20					
701,99	154,76	856,75	19					
679,48	151,9	831,38	20					
703,77	154,76	858,53	21					
677,11	152,38	829,49	20					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
3	688,17	156	844,36	19	686,73	150,68	837,4	19,5
	703,71	149,62	853,33	20				
	701,21	144,76	845,97	19				
	693,82	145,71	839,53	18				
	679,77	156	835,96	18				
	690,43	144,76	835,19	19				
	679,48	143,81	823,29	20				
	682,73	157,14	839,87	21				
	699,14	154,76	853,9	21				
	648,79	153,81	802,6	20				
4	683,91	158,17	842,08	20	683,15	151,44	834,59	19,7
	704,62	153,81	858,43	19				
	689,49	147,62	837,11	19				
	683,91	155,71	839,62	17				
	671,15	150,48	821,63	21				
	668,89	156,67	825,56	21				
	678,74	148,13	826,87	19				
	698,50	148,57	847,07	19				
	711,96	149,48	861,44	20				
	640,36	145,71	786,07	22				
5	638,53	147,62	786,15	21	654,35	150,13	804,49	19,7
	638,55	156,67	795,22	22				
	650,39	148,48	798,87	19				
	638,51	150,36	788,87	19				
	650,39	149,52	799,91	18				
	638,57	150,47	789,04	20				
	674,92	157,22	832,14	18				
	693,22	149,69	842,91	17				
	636,54	146,57	783,11	21				
	683,91	144,74	828,65	22				
6	679,77	149,88	829,65	22	683,66	152,33	835,99	19,9
	701,74	149,48	851,22	19				
	699,32	147,62	846,94	18				
	688,78	153,81	842,59	22				
	677,62	158,17	835,79	21				
	662,38	153,81	816,19	18				
	665,24	147,62	812,86	17				
	694,76	155,71	850,47	19				
	677,66	150,48	828,14	21				
	689,36	156,67	846,03	22				
7	649,05	148,13	797,18	18	653,22	148,71	801,93	19,4
	657,62	148,57	806,19	19				
	650,48	149,48	799,96	18				
	653,81	145,71	799,52	19				
	648,19	147,62	795,81	20				
	654,76	156,67	811,43	21				
	657,62	148,48	806,1	20				
	656	148,18	804,37	21				
	649,74	148,57	798,31	19				
	654,76	145,71	800,47	19				
8	653,81	147,48	801,29	18	651,21	149,02	800,23	19,4
	654,76	146,67	801,43	18				
	651,9	155,71	807,61	17				
	654,76	148,14	802,9	21				
	652,38	148,57	800,95	21				
	656	153,81	810	20				
	649,62	147,48	797,1	19				
	644,76	147,62	792,38	19				
	645,71	145,71	791,42	20				
648,18	149,05	797,23	21					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
9	648,57	143,81	792,38	22	648,98	146,53	795,51	19,4
	645,71	148,57	794,28	21				
	647,48	145,71	793,19	22				
	646,67	143,81	790,48	19				
	655,71	149,05	804,76	18				
	648,14	146,67	794,81	18				
	648,57	148,16	796,73	19				
	653,81	145,71	799,52	17				
	647,48	146	793,67	17				
647,62	147,62	795,24	21	646,63	150,29	796,91	19,1	
645,71	144,76	790,47	21					
649,05	145,71	794,76	20					
643,81	156	800	20					
648,57	144,76	793,33	21					
645,71	143,81	789,52	19					
643,81	157,62	801,43	19					
649,05	152,38	801,43	18					
646,67	155,24	801,91	18					
648,16	144,76	792,92	17	649,43	153,68	803,11	19,9	
645,71	157,66	803,37	18					
646	159,36	805,55	19					
647,62	149,05	796,67	20					
644,76	157,62	802,38	21					
645,71	150,48	796,19	20					
656	153,81	810	21					
644,76	148,19	792,95	22					
643,81	154,76	798,57	20					
657,62	157,62	815,24	19	653,33	151,87	805,2	18,3	
652,38	156	808,57	19					
655,24	149,74	804,98	18					
644,76	154,76	799,52	17					
657,66	153,81	811,47	17					
659,36	154,76	814,12	20					
649,05	151,9	800,95	19					
657,62	154,76	812,38	18					
650,48	152,38	802,86	19					
653,81	156	810	20	655,93	150,57	806,5	20,5	
648,19	149,62	797,81	19					
654,76	144,76	799,52	17					
657,62	145,71	803,33	17					
656	156	812,38	21					
649,74	144,76	794,5	21					
654,76	143,81	798,57	21					
653,81	157,62	811,43	19					
654,76	152,38	807,14	19					
657,14	155,24	812,38	20					
667,11	144,76	811,87	22	653,08	151,39	804,47	19,4	
653,81	146	800	21					
658,17	147,62	805,79	22					
653,81	157,14	810,95	19					
647,62	152,73	800,35	19					
657,62	157,14	814,76	18					
650,48	154,76	805,24	20					
653,81	149,48	803,29	18					
648,19	146,67	794,86	17					
654,76	148,15	802,91	21					
657,62	158,57	816,19	22	656	150,48	806,67	22	
656	150,48	806,67	22					
649,74	148,22	797,96	19					
654,76	147,72	802,48	18					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
15	653,81	152	805,92	22	652,01	150	802,01	19,6
	654,76	150,36	805,12	20				
	651,9	149,52	801,42	21				
	654,76	150,47	805,23	19				
	652,38	157,22	809,6	19				
	656	149,69	805,88	18				
	649,62	146,57	796,19	18				
	644,76	144,74	789,5	17				
	645,71	149,88	795,59	21				
	656	149,48	805,67	21				
16	644,76	147,62	792,38	20	652,01	152,06	804,07	20,1
	643,81	153,81	797,62	19				
	657,14	158,17	815,31	19				
	654,76	153,81	808,57	20				
	653,81	147,62	801,43	21				
	658,17	155,71	813,88	22				
	653,81	150,48	804,29	21				
	647,62	156,67	804,29	22				
	655,71	148,13	803,84	19				
	650,48	148,57	799,05	18				
17	656,67	149,48	806,15	18	650,12	148,46	798,58	19,3
	648,13	145,71	793,84	19				
	648,57	147,62	796,19	17				
	649,48	156,67	806,15	17				
	645,71	148,48	794,19	21				
	647,62	148,18	795,8	21				
	656,67	148,57	805,24	20				
	648,48	145,71	794,19	20				
	650,36	147,48	797,84	21				
	649,52	146,67	796,19	19				
18	650,47	155,71	806,18	19	650,77	153	803,77	19,5
	657,22	148,14	805,36	18				
	649,69	148,57	798,26	18				
	646,57	153,81	800,38	19				
	644,74	153,81	798,55	21				
	649,88	154,76	804,64	19				
	649,48	151,9	801,38	22				
	647,62	154,76	802,38	19				
	653,81	152,38	806,19	22				
	658,17	156	814,36	18				
19	653,81	149,62	803,43	17	650,38	149,49	799,87	19,3
	647,62	144,76	792,38	19				
	655,71	145,71	801,42	20				
	650,48	156	806,67	17				
	656,67	144,76	801,43	18				
	648,13	143,81	791,94	22				
	648,57	157,62	806,19	21				
	649,48	152,38	801,86	20				
	645,71	155,24	800,95	17				
	647,62	144,76	792,38	22				
20	656,67	157,66	814,33	19	649,42	154,47	803,89	19,6
	648,48	159,36	807,84	22				
	648,18	149,05	797,23	18				
	648,57	157,62	806,19	18				
	645,71	150,48	796,19	19				
	647,48	153,81	801,29	22				
	646,67	148,19	794,86	18				
	655,71	154,76	810,47	22				
	648,14	157,62	805,76	20				
648,57	156	804,76	18					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
21	653,81	149,74	803,55	18	647,46	152,27	799,73	19,2
	647,48	154,76	802,24	22				
	647,62	153,81	801,43	20				
	645,71	154,76	800,47	19				
	649,05	151,9	800,95	17				
	643,81	154,76	798,57	22				
	648,57	152,38	800,95	19				
	645,71	156	801,9	18				
	643,81	149,62	793,43	20				
649,05	144,76	793,81	17	646,96	149,43	796,39	19,5	
22	646,67	145,71	792,38					20
648,16	156	804,35	17					
645,71	144,76	790,47	19					
646	143,81	790	19					
647,62	157,62	805,24	21					
644,76	152,38	797,14	20					
645,71	155,24	800,95	18					
656	144,76	800,95	19					
644,76	146	790,95	20	653,8	152,33	806,13	20	
23	643,81	147,62	791,43					22
657,62	157,14	814,76	21					
652,38	152,73	805,11	20					
655,24	157,14	812,38	22					
644,76	154,76	799,52	21					
657,66	149,48	807,14	19					
659,36	146,67	806,03	20					
649,05	148,15	797,2	19					
657,62	158,57	816,19	20	653,65	149,83	803,48	19,3	
650,48	150,48	800,96	18					
653,81	148,22	802,03	20					
24	648,19	147,72	795,91					19
654,76	152	806,87	20					
657,62	150,36	807,98	22					
656	149,52	805,71	19					
649,74	150,47	800,21	21					
654,76	157,22	811,98	19					
653,81	149,69	803,5	17					
654,76	146,57	801,33	20	650,342	152,15	802,492	19,9	
651,9	144,74	796,64	18					
654,76	149,88	804,64	18					
25	652,38	149,48	801,86					19
656	147,62	803,81	20					
649,62	153,81	803,43	21					
644,76	158,17	802,93	21					
645,71	153,81	799,52	19					
656	147,62	803,81	19					
644,76	155,71	800,47	20					
643,81	150,48	794,29	19					
657,62	156,67	814,29	20	650,458	148,647	799,105	19,5	
652,38	148,13	800,51	21					
26	655,24	148,57	803,81					20
644,76	149,48	794,24	19					
639	145,71	784,75	20					
647,62	147,62	795,24	19					
657,14	156,67	813,81	18					
652,73	148,48	801,21	18					
657,14	148,18	805,32	19					
654,76	148,57	803,33	20					
649,48	145,71	795,19	21					
646,67	147,48	794,15	21					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
27	648,15	146,67	794,82	20	651,282	148,657	799,939	19,5
	658,57	155,71	814,28	20				
	650,48	148,14	798,62	19				
	648,22	148,57	796,79	19				
	647,72	153,81	801,53	17				
	652	147,48	799,59	21				
	650,36	147,62	797,98	21				
	649,52	145,71	795,23	19				
	650,47	149,05	799,52	19				
	657,22	143,81	801,03	20				
28	649,69	148,57	798,26	22	651,139	147,006	798,145	19,7
	646,57	145,71	792,28	21				
	644,74	143,81	788,55	22				
	649,88	149,05	798,93	19				
	649,48	146,67	796,15	19				
	647,62	148,16	795,78	18				
	653,81	145,71	799,52	20				
	658,17	146	804,36	18				
	653,81	147,62	801,43	17				
	657,62	148,57	806,19	21				
29	655,71	149,05	804,76	22	650,752	146,691	797,443	19,9
	650,48	143,81	794,29	22				
	656,67	145,48	802,15	19				
	648,13	147,62	795,75	18				
	648,57	143,81	792,38	22				
	649,48	145,71	795,19	21				
	645,71	147,62	793,33	18				
	647,62	149,05	796,67	17				
	656,67	146	802,86	19				
	648,48	148,57	797,05	21				
30	648,18	145,71	793,89	22	649,665	147,05	796,715	19,7
	648,57	146,81	795,38	18				
	645,71	148,57	794,28	19				
	647,48	149,05	796,53	18				
	646,67	147,62	794,29	19				
	655,71	147,48	803,19	20				
	648,14	143,81	791,95	21				
	648,57	148,12	796,69	20				
	653,81	144,76	798,57	21				
	653,81	148,57	802,38	19				
31	654,76	153,81	808,57	19	651,103	150,857	801,96	19,2
	651,9	149,05	800,95	18				
	654,76	143,81	798,57	18				
	652,38	150,48	802,86	17				
	656	158,13	814,32	21				
	649,62	153,81	803,43	21				
	644,76	157,62	802,38	20				
	645,71	145,71	791,42	19				
	656	149,48	805,67	19				
	644,76	146,67	791,43	20				
32	643,81	148,15	791,96	21	652,798	149,343	802,141	19,4
	657,62	158,57	816,19	22				
	652,38	150,48	802,86	21				
	655,24	145,71	800,95	22				
	644,76	147,62	792,38	19				
	657,66	146,67	804,33	18				
	659,36	148,48	807,84	18				
	649,05	148,17	797,22	19				
	657,62	151,36	808,98	17				
650,48	148,22	798,7	17					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
33	653,81	147,72	801,53	21	653,554	149,828	803,382	19,4
	648,19	152	800,3	21				
	654,76	150,36	805,12	20				
	657,62	149,52	807,14	20				
	656	150,47	806,66	21				
	649,74	157,22	806,96	19				
	654,76	149,69	804,45	19				
	653,81	146,57	800,38	18				
	654,76	144,74	799,5	18				
651,9	149,88	801,78	17					
34	654,76	149,48	804,24	18	650,58	151,757	802,337	19,9
	652,38	147,62	800	19				
	656	153,81	810	20				
	649,62	145,71	795,33	21				
	644,76	147,62	792,38	20				
	645,71	159,05	804,76	21				
	656	156	812,38	22				
	644,76	158,57	803,33	20				
	643,81	145,71	789,52	19				
657,62	153,81	811,43	19					
35	652,38	148,57	800,95	18	651,744	152,603	804,347	18,4
	655,24	149,05	804,29	17				
	644,76	157,62	802,38	17				
	646	150,48	796,67	20				
	647,62	153,81	801,43	19				
	657,14	148,19	805,33	18				
	652,73	154,76	807,49	19				
	657,14	157,62	814,76	20				
	654,76	156	810,95	19				
649,48	149,74	799,22	17					
36	646,67	154,76	801,43	17	650,227	151,865	802,092	20,3
	648,15	153,81	801,96	21				
	658,57	154,76	813,33	21				
	650,48	151,9	802,38	21				
	648,22	154,76	802,98	19				
	647,72	152,38	800,1	19				
	652	156	808,3	20				
	650,36	149,62	799,98	22				
	649,52	144,76	794,28	21				
650,47	145,71	796,18	22					
37	657,22	156	813,41	19	651,099	150,571	801,67	19,4
	649,69	144,76	794,45	19				
	646,57	143,81	790,38	18				
	644,74	157,62	802,36	20				
	649,88	152,38	802,26	20				
	649,48	155,24	804,72	22				
	647,62	144,76	792,38	19				
	653,81	146	800	21				
	658,17	147,62	805,79	19				
653,81	157,14	810,95	17					
38	647,62	152,73	800,35	20	650,666	152,6	803,266	19,5
	655,71	157,14	812,85	18				
	650,48	154,76	805,24	18				
	656,67	156	812,86	19				
	648,13	149,94	798,07	20				
	648,57	154,76	803,33	21				
	649,48	154,76	804,24	21				
	645,71	150,48	796,19	19				
	647,62	144,76	792,38	19				
656,67	150,48	807,15	20					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
39	648,48	157,62	806,1	19	649,132	152,309	801,441	19,3
	648,18	144,76	792,94	20				
	648,57	152,86	801,43	21				
	645,71	146,67	792,38	20				
	647,48	157,38	804,86	19				
	646,67	154,76	801,43	20				
	655,71	157,62	813,33	19				
	648,14	149,52	797,66	18				
	648,57	157,14	805,71	18				
653,81	144,76	798,57	19	646,748	149,426	796,174	19,9	
647,48	153,81	801,29	20					
647,62	148,14	795,76	21					
645,71	147,62	793,33	21					
649,05	144,76	793,81	20					
643,81	147,14	790,95	20					
648,57	152,86	801,43	19					
645,71	148,17	793,88	19					
643,81	149,38	793,19	17					
649,05	149,52	798,57	21					
646,67	152,86	799,53	21	646,602	154,814	801,416	19,9	
648,16	157,62	805,78	19					
645,71	155,24	800,95	19					
646	144,76	790,95	20					
647,62	156,67	804,29	22					
648,57	153,81	802,38	21					
649,05	158,12	807,17	22					
643,81	156,67	800,48	19					
645,48	157,14	802,62	19					
647,62	153,82	801,44	18					
643,81	154,29	798,1	20	647,03	151,845	798,875	19,8	
645,71	156,67	802,38	18					
647,62	153,81	801,43	17					
649,05	154,76	803,81	21					
646	151,9	798,09	22					
648,57	153,84	802,41	22					
645,71	151,43	797,14	19					
646,81	148,17	794,98	18					
643,97	149,86	793,83	22					
649,05	151,82	800,87	21					
647,62	146,19	793,81	18	648,802	149,881	798,683	19,4	
647,48	141,43	788,91	17					
643,81	143,81	787,62	19					
648,12	146,67	794,79	21					
644,76	152,62	797,38	22					
648,57	154,76	803,33	18					
653,81	153,81	807,62	19					
649,05	154,76	803,81	18					
643,81	151,9	795,71	19					
650,48	146,19	796,67	20					
658,13	152,86	810,99	21	650,382	152,808	803,19	19,4	
653,81	156	810	20					
657,62	155	812,38	21					
645,71	158	803,33	19					
649,48	155,71	805,19	19					
646,67	156,67	803,34	18					
648,15	146,19	794,34	18					
658,57	142,86	801,43	17					
650,48	153,33	803,81	21					
645,71	154,76	800,47	21					
647,62	149,99	797,61	20					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
45	646,67	150,48	797,15	19	644,875	150,217	795,092	19,9
	648,17	155,24	803,41	19				
	643,81	149,52	793,33	20				
	647,62	148,11	795,73	21				
	637,62	148,57	786,19	22				
	640,48	150,48	790,96	21				
	643,81	145,71	789,52	22				
	648,19	148,57	796,76	19				
	644,76	152,86	797,62	18				
647,62	152,63	800,25	18					
46	646	144,76	790,95	19	644,411	148,789	793,2	19,4
	649,74	140,48	790,22	17				
	644,76	153,81	798,57	17				
	643,81	149,48	793,29	21				
	644,76	153,81	798,57	21				
	641,9	146,67	788,57	20				
	634,76	149,48	784,24	20				
	642,38	150,95	793,33	21				
	646	149,88	796,07	19				
649,62	148,57	798,19	19					
47	634,76	153,81	788,57	18	641,292	149,655	790,947	19,4
	645,71	148,05	793,76	18				
	646	153,81	800	17				
	644,76	149,48	794,24	18				
	643,81	148,11	791,92	19				
	647,14	153,81	800,95	20				
	634,76	147,62	782,38	21				
	633,81	145,71	779,52	20				
	648,17	149,48	797,65	21				
633,81	146,67	780,48	22					
48	647,62	148,12	795,74	20	644,666	147,31	791,976	18,6
	645,71	148,57	794,28	19				
	640,48	146,48	786,96	19				
	646,67	145,71	792,38	18				
	648,13	147,62	795,75	17				
	648,57	146,67	795,24	17				
	649,48	147,48	796,96	20				
	645,71	148,17	793,88	19				
	637,62	148,57	786,19	18				
636,67	145,71	782,38	19					
49	648,48	149,48	797,96	20	645,641	148,522	794,163	19,4
	640,36	146,67	787,03	19				
	639,52	145,71	785,23	17				
	640,47	148,12	788,59	17				
	647,22	148,57	795,79	21				
	649,69	153,81	803,5	21				
	646,57	150,48	797,05	21				
	644,74	147,62	792,36	19				
	649,88	145,71	795,59	19				
649,48	149,05	798,53	20					
50	637,62	153,81	791,43	22	642,059	151,529	793,588	19,7
	633,81	148,57	782,38	21				
	648,17	145,71	793,88	22				
	643,81	153,81	797,62	19				
	647,62	149,05	796,67	19				
	645,71	146,67	792,38	18				
	640,48	148,15	788,63	20				
	646,67	155,71	802,38	18				
	638,13	156	794,32	17				
638,57	157,62	796,19	21					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
51	639,48	148,57	788,05	22	641,457	151,091	792,548	19,3
	635,71	149,05	784,76	22				
	637,62	153,81	791,43	19				
	636,67	149,48	786,15	18				
	638,48	147,62	786,1	22				
	648,18	153,81	801,99	19				
	638,57	155,71	794,28	19				
	645,71	147,62	793,33	18				
	647,48	149,05	796,53	17				
	646,67	156	802,86	17				
52	635,71	158,57	794,28	20	635,847	152,057	787,904	19,1
	638,14	145,71	783,85	19				
	638,57	153,81	792,38	18				
	633,81	158,57	792,38	19				
	627,48	149,05	776,53	20				
	637,62	147,62	785,24	19				
	635,71	150,48	786,19	17				
	639,05	153,81	792,86	17				
	633,81	148,19	782	21				
	638,57	154,76	793,33	21				
53	635,71	147,62	783,33	21	639,339	152,248	791,587	20
	623,81	146	770	19				
	639,05	150,11	789,16	19				
	636,67	154,76	791,43	20				
	638,16	153,81	791,97	22				
	645,71	154,76	800,47	21				
	646	151,9	798,09	22				
	637,62	154,76	792,38	19				
	644,76	152,38	797,14	19				
	645,71	156	801,9	18				
54	636	147,62	783,81	20	637,083	146,285	783,368	19,4
	634,76	144,76	779,52	20				
	633,81	145,71	779,52	22				
	637,62	146	783,81	19				
	642,38	144,76	787,14	21				
	635,24	143,81	779,05	19				
	634,76	147,62	782,38	17				
	637,66	142,38	780,04	20				
	639,36	145,24	784,6	18				
	639,05	154,76	793,81	18				
55	647,62	156	803,81	19	638,698	149,869	788,567	19,9
	630,48	147,62	778,1	20				
	643,81	147,14	790,95	21				
	648,19	151,97	800,16	21				
	634,76	147,14	781,9	19				
	637,62	154,76	792,38	19				
	636	146	782,38	20				
	639,74	158,16	797,9	19				
	634,76	144,76	779,52	20				
	633,81	144,76	778,57	21				
56	634,76	150,48	785,24	20	631,103	150	781,103	19,5
	631,9	144,76	776,66	19				
	634,76	150,48	785,24	20				
	622,38	147,62	770	19				
	636	144,76	780,95	18				
	629,62	152,86	782,48	18				
	624,76	156,67	781,43	19				
	625,71	149,99	775,7	20				
	636	144,76	780,95	21				
	634,76	157,62	792,38	21				

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
57	633,81	159,52	793,33	20	631,463	154,769	786,232	19,4
	627,62	157,14	784,76	20				
	622,38	154,76	777,14	19				
	635,24	153,81	789,05	19				
	634,76	158,17	792,93	17				
	636	153,81	790	21				
	647,62	147,62	795,24	21				
	627,14	155,71	782,85	19				
	622,73	150,48	773,21	19				
627,14	156,67	783,81	19	630,652	148,712	779,364	20,4	
58	634,76	148,13	782,89					21
	639,48	148,57	788,05					19
	626,67	149,48	776,15					18
	628,15	145,71	773,86					22
	628,57	147,62	776,19					19
	620,48	156,67	777,15					22
	638,22	148,48	786,7					19
	637,72	148,18	785,9					22
	632	148,57	780,68	20				
620,36	145,71	766,07	22	633,9	149,024	782,924	19,9	
59	639,52	147,48	787					18
	620,47	146,67	767,14					21
	627,22	155,71	782,93					18
	639,69	148,14	787,83					19
	636,57	148,57	785,14					19
	634,74	153,81	788,55					20
	629,88	147,48	777,36					22
	629,48	147,62	777,1					21
	637,62	145,71	783,33	22				
643,81	149,05	792,86	19	634,435	146,53	780,965	19,4	
60	648,17	143,81	791,98					19
	633,81	148,57	782,38					18
	637,62	145,71	783,33					20
	645,71	143,81	789,52					18
	620,48	149,05	769,53					18
	626,67	146,67	773,34					20
	628,13	148,16	776,29					22
	628,57	145,71	774,28					19
	639,48	146	785,67	21				
635,71	147,62	783,33	19	632,323	146,691	779,014	19,2	
61	627,62	148,57	776,19					17
	636,67	149,05	785,72					20
	638,48	143,81	782,29					18
	638,18	145,48	783,66					18
	638,57	147,62	786,19					19
	625,71	143,81	769,52					20
	627,48	145,71	773,19					21
	626,67	147,62	774,29					21
	625,71	149,05	774,76	19				
638,14	146	784,33	19	627,056	147,05	774,106	19,4	
62	628,57	148,57	777,14					20
	633,81	145,71	779,52					19
	633,81	146,81	780,62					20
	624,76	148,57	773,33					21
	621,9	149,05	770,95					20
	624,76	147,62	772,38					19
	622,38	147,48	769,86					20
	626	143,81	770					19
	629,62	148,12	777,74	18				
624,76	144,76	769,52	18					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
63	625,71	147,62	773,33	19	628,749	145,17	773,919	19,7
	626	146	772,38	20				
	624,76	149,33	774,09	21				
	623,81	144,76	768,57	21				
	637,62	143,81	781,43	20				
	632,38	144,76	777,14	20				
	625,24	141,9	767,14	19				
	624,76	144,76	769,52	19				
	627,66	142,38	770,04	17				
639,36	146	785,55	21	631,222	145,285	776,507	20	
64	639,05	147,62	786,67					21
637,62	144,76	782,38	19					
620,48	145,71	766,19	19					
623,81	146	770	20					
638,19	144,76	782,95	22					
624,76	143,81	768,57	21					
637,62	147,62	785,24	22					
626	142,38	768,57	19					
639,74	145,24	784,98	19					
624,76	144,76	769,52	18	632,008	146,277	778,285	20	
65	623,81	146	770					20
634,76	147,62	782,38	18					
631,9	147,14	779,04	17					
624,76	148,22	772,98	21					
642,38	147,14	789,52	22					
636	144,76	780,95	22					
639,62	146	785,81	19					
624,76	145,99	770,75	18					
625,71	144,76	770,47	22					
636	144,76	780,95	21	631,225	146,244	777,469	19,1	
66	624,76	147,48	772,24					18
633,81	144,76	778,57	17					
627,62	148,48	776,1	19					
632,38	147,62	780	21					
645,24	144,76	790	22					
624,76	142,86	767,62	18					
626	146,67	772,86	19					
637,62	147,43	785,05	18					
637,14	144,76	781,9	19					
622,73	147,62	770,35	20	631,33	146,297	777,627	19,5	
67	627,14	149,52	776,66					21
634,76	147,14	781,9	20					
629,48	144,76	774,24	21					
626,67	143,81	770,48	19					
628,15	148,13	776,28	19					
628,57	146,72	775,29	18					
620,48	144,76	765,24	18					
638,22	147,14	785,36	17					
647,72	142,86	790,58	21					
632	148,13	780,24	21	630,555	145,742	776,297	20,1	
68	630,36	142,11	772,47					20
629,52	149,52	779,04	19					
630,47	142,86	773,33	19					
627,22	147,62	774,84	20					
639,69	145,24	784,93	21					
636,57	144,76	781,33	22					
624,74	146,67	771,41	21					
629,88	143,81	773,69	22					
629,48	148,16	777,64	19					
627,62	146,67	774,29	18					

(continua)

TABELA DADOS ESTEREOLOGIA (continuação)

Animal	VC	VN	VOL	NA	M VC	M VN	M VOL	M NA
69	623,81	147,14	770,95	18	634,253	146,718	780,971	19,3
	638,17	146,11	784,28	19				
	633,81	144,29	778,1	17				
	637,62	146,67	784,29	17				
	635,71	143,81	779,52	21				
	620,56	144,76	765,32	21				
	636,67	146,9	783,57	20				
	638,13	147,89	786,02	20				
	638,57	151,43	790	21				
639,48	148,18	787,66	19	631,08	146,84	777,92	19,1	
70	625,71	148,86	774,57					19
627,62	147,39	775,01	18					
626,67	146,19	772,86	18					
638,48	148,43	786,91	17					
638,18	146,81	784,99	18					
638,57	146,67	785,24	19					
625,71	150,72	776,43	20					
637,48	144,76	782,24	21					
626,67	143,81	770,48	20					
625,71	144,76	770,47	21	630,347	146,714	777,061	18,9	
71	638,14	147,93	786,07					22
623,57	148,24	771,81	20					
623,81	147,86	771,67	19					
637,48	146	783,67	19					
627,62	145	772,38	18					
625,71	148	773,33	17					
629,05	145,71	774,76	17					
623,81	150	773,59	20					
638,57	146,19	784,76	19					
635,71	142,86	778,57	18	631,864	147,574	779,438	19,3	
72	623,81	143,33	767,14					19
649,05	144,76	793,81	20					
626,67	149,52	776,19	19					
628,16	150,48	778,64	17					
635,71	145,24	780,95	17					
636	149,52	785,71	21					
637,62	148,13	785,75	21					
628,57	148,57	777,14	21					
629,05	150,48	779,53	19					
623,81	145,71	769,52	19					

(conclusão)

TABELA ANÁLISE ESTATÍSTICA ESTEREOLOGIA

Table Analyzed	VC		
One-way analysis of variance			
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	6		
F	26,65		
R squared	0,6688		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	115,4		
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	9243	5	1849
Residual (within columns)	4578	66	69,36
Total	13820	71	

(continua)

TABELA ANÁLISE ESTATÍSTICA ESTEREOLOGIA (continuação)

Table Analyzed	VC			
Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
24 meses vs 03 meses	-35,37	14,71	Yes	***
24 meses vs 06 meses	-20,30	8,442	Yes	***
24 meses vs 09 meses	-20,14	8,375	Yes	***
24 meses vs 12 meses	-16,14	6,714	Yes	***
24 meses vs 18 meses	-5,805	2,415	No	ns
18 meses vs 03 meses	-29,57	12,30	Yes	***
18 meses vs 06 meses	-14,49	6,028	Yes	***
18 meses vs 09 meses	-14,33	5,961	Yes	***
18 meses vs 12 meses	-10,34	4,299	Yes	**
12 meses vs 03 meses	-19,23	7,999	Yes	***
12 meses vs 06 meses	-4,156	1,729	No	ns
12 meses vs 09 meses	-3,995	---	No	ns
09 meses vs 03 meses	-15,24	6,337	Yes	***
09 meses vs 06 meses	-0,1609	---	No	ns
06 meses vs 03 meses	-15,08	6,270	Yes	***
Table Analyzed	VN			
One-way analysis of variance				
P value	< 0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	9,769			
R squared	0,4253			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	14,57			
P value	0,0124			
P value summary	*			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	192,6	5	38,52	
Residual (within columns)	260,3	66	3,943	
Total	452,9	71		
Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
24 meses vs 06 meses	-4,725	8,243	Yes	***
24 meses vs 03 meses	-4,643	8,099	Yes	***
24 meses vs 12 meses	-4,469	7,795	Yes	***
24 meses vs 18 meses	-3,670	6,401	Yes	***
24 meses vs 09 meses	-3,321	5,793	Yes	***
09 meses vs 06 meses	-1,404	2,449	No	ns
09 meses vs 03 meses	-1,322	---	No	ns
09 meses vs 12 meses	-1,148	---	No	ns
09 meses vs 18 meses	-0,3485	---	No	ns
18 meses vs 06 meses	-1,056	---	No	ns
18 meses vs 03 meses	-0,9732	---	No	ns
18 meses vs 12 meses	-0,7991	---	No	ns
12 meses vs 06 meses	-0,2565	---	No	ns
12 meses vs 03 meses	-0,1742	---	No	ns
03 meses vs 06 meses	-0,08234	---	No	ns
Table Analyzed	VOL			
One-way analysis of variance				
P value	< 0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	6			
F	27,52			
R squared	0,6759			

(continua)

TABELA ANÁLISE ESTATÍSTICA ESTEREOLOGIA (continuação)

Table Analyzed	VOL			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	91,40			
P value	< 0.0001			
P value summary	***			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	11380	5	2277	
Residual (within columns)	5459	66	82,71	
Total	16840	71		
Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
24 meses vs 03 meses	-40,01	15,24	Yes	***
24 meses vs 06 meses	-25,02	9,531	Yes	***
24 meses vs 09 meses	-23,46	8,935	Yes	***
24 meses vs 12 meses	-20,61	7,850	Yes	***
24 meses vs 18 meses	-9,475	3,609	Yes	*
18 meses vs 03 meses	-30,54	11,63	Yes	***
18 meses vs 06 meses	-15,55	5,922	Yes	***
18 meses vs 09 meses	-13,98	5,326	Yes	**
18 meses vs 12 meses	-11,13	4,241	Yes	**
12 meses vs 03 meses	-19,41	7,391	Yes	***
12 meses vs 06 meses	-4,412	1,681	No	ns
12 meses vs 09 meses	-2,847	---	No	ns
09 meses vs 03 meses	-16,56	6,307	Yes	***
09 meses vs 06 meses	-1,565	---	No	ns
06 meses vs 03 meses	-14,99	5,711	Yes	***
Table Analyzed	NA			
One-way analysis of variance				
P value	0,8848			
P value summary	ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	6			
F	0,3432			
R squared	0,02534			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	1,295			
P value	0,9354			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,2911	5	0,05822	
Residual (within columns)	11,20	66	0,1696	
Total	11,49	71		
Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
03 meses vs 18 meses	-0,1500	1,262	No	ns
03 meses vs 06 meses	-0,1417	---	No	ns
03 meses vs 09 meses	-0,1000	---	No	ns
03 meses vs 12 meses	-0,02500	---	No	ns
03 meses vs 24 meses	0,0000	---	No	ns
24 meses vs 18 meses	-0,1500	---	No	ns
24 meses vs 06 meses	-0,1417	---	No	ns
24 meses vs 09 meses	-0,1000	---	No	ns
24 meses vs 12 meses	-0,02500	---	No	ns
12 meses vs 18 meses	-0,1250	---	No	ns
12 meses vs 06 meses	-0,1167	---	No	ns
12 meses vs 09 meses	-0,07500	---	No	ns
09 meses vs 18 meses	-0,05000	---	No	ns
09 meses vs 06 meses	-0,04167	---	No	ns
06 meses vs 18 meses	-0,008333	---	No	ns

(conclusão)

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 Zamprônio
Coordenador do CEEA

ANEXO 2 – PROTOCOLO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NO JORNAL CIENTÍFICO *ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA*

ScholarOne Manuscripts

27/06/17 22:05

ScholarOne Manuscripts™

Bruno Neves ▾

[Instructions & Forms](#)[Help](#)[Log Out](#)

Acta Cirúrgica Brasileira

[# Home](#)[\\$ Author](#)[Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Acta Cirúrgica Brasileira

Manuscript ID ACB-2017-0131

Title Numeric and volumetric changes in Leydig cells during aging of rats

Authors Neves, Bruno
Lorenzini, Fernando
Veronez, Djanira
Pereira de Miranda, Eduardo
Neves, Gabriela
de Fraga, Rogerio

Date Submitted 27-Jun-2017

[Author Dashboard **](#)

SCHOLARONE™



© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.