

VINÍCIUS HEROLD DORNELAS E SILVA

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL TESTICULAR DO LOBO-GUARÁ
(*Chrysocyon brachyurus*) NAS DIFERENTES ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DO
ANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção de título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Silva, Vinícius Herold Dornelas, 1987-
S586a Avaliação morfofuncional testicular do lobo-guará (*Chrysocyon
2018 brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do
ano / Vinícius Herold Dornelas Silva. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Lobo-Guará - Reprodução. 2. Testículos - Morfologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

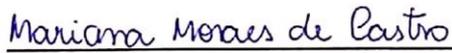
CDD 22. ed. 599.77

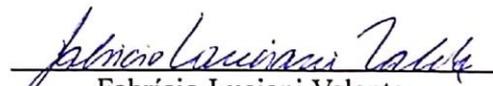
VINICIUS HEROLD DORNELAS E SILVA

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL TESTICULAR DO LOBO-GUARÁ
(Chrysocyon brachyurus) NAS DIFERENTES ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DO
ANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2018.


Mariana Moraes de Castro


Fabrício Luciani Valente


Faider Alberto Castaño Villadiego


Moacir Carretta Júnior
(Coorientador)


Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>).....	1
1.2. Conservação.....	4
1.3. Testículo.....	5
1.4. Sazonalidade	8
2. REFERÊNCIAS.....	10
ARTIGO 1	
AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DA PORÇÃO TUBULAR DO TESTÍCULO DO LOBO-GUARÁ (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) NAS DIFERENTES ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DO ANO	18
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Local e animais de estudo	21
2.2. Análises microscópicas e morfometria	21
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	30
6. REFERÊNCIAS.....	31
ARTIGO 2	

AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DA CÉLULA DE LEYDIG DO TESTICULO DE LOBO-GUARÁ (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) NAS DIFERENTES ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DO ANO	34
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Local e animais de estudo	37
2.2. Análises microscópicas e morfométricas.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4. CONCLUSÃO	44
5. REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

INTODUÇÃO GERAL

Figura 1: Área de distribuição do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (IUCN, 2018)..2

Figura 2. Indivíduo de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) macho adulto mantido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV).....3

ARTIGO 1

Figura 1: Pesos testicular, tubular e intertubular no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....24

Figura 2: Túbulo seminífero de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em regressão durante a época de nascimento dos filhotes (inverno). Seta indica uma célula de Sertoli, ponta da seta indica uma espermatogônia, Int. - Intertubulo, Ept. - Epitélio tubular Objetiva de 40x28

Figura 3: Túbulo seminífero de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) apresentando epitélio produtivo durante a época de acasalamento (outono), Int. - Intertubulo, Ept. - Epitélio tubular. Objetiva 40x.....29

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1: Peso corporal e testicular médio de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), e índices gonadossomático (IGS) e tubulossomático (ITS) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....22

Tabela 2: Proporção volumétrica de túbulo seminífero e de tecido intertubular no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....23

Tabela 3: Diâmetro médio, comprimento total e comprimento por grama de testículo do túbulo seminífero de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....25

ARTIGO 2

Tabela 1: Peso corporal e testicular, proporção volumétrica e volume de túbulo seminífero e de tecido intertubular no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....37

Tabela 2: Proporção volumétrica de citoplasma de célula de Leydig, núcleo de célula de Leydig e célula de Leydig, e os seus respectivos volumes, no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....39

Tabela 3: Volume de uma célula, diâmetro médio do núcleo, número total e número por grama de testículo de células de Leydig em de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.....41

RESUMO

SILVA, Vinícius Herold Dornelas e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Avaliação morfofuncional testicular do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Coorientador: Moacir Carretta Júnior.

Classificado como ameaçado de extinção pela IUCN e vulnerável pela Lista Nacional Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sofre com a redução e fragmentação do seu ambiente, atropelamentos, redução da população de suas presas naturais. Estudo sobre a diversidade genética dessa espécie relatou que mais de 40% das amostras obtida foram de animais mortos em estradas ou resgatados próximos de áreas urbanas com sinais de envenenamento e/ou machucados. Assim para o estabelecimento de técnicas em reprodução assistida e para a manutenção da variabilidade genética da espécie torna-se necessário o esclarecimento da dinâmica de funcionamento dos parâmetros testiculares ao longo do ano. Poucos estudos existem sobre a variação na produção de espermatozoide para carnívoros neotropicais, entretanto, foi identificaram uma variação nos parâmetros seminais ao longo do ano para o lobo-guará. Neste sentido, o estudo quantitativo dos componentes testiculares ao longo das estações climáticas torna-se essencial para o entendimento desse processo nessa espécie. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica do parênquima testicular do lobo-guará ao longo do ano. Foram avaliadas amostras testiculares de quatro indivíduos de lobos-guará para cada uma das diferentes estações climáticas do ano, estas amostras foram obtidas no acervo do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), Viçosa, Minas Gerais. O volume testicular foi obtido através do cálculo do volume do elipsoide, e posteriormente foi realizada a confecção de lâminas histológicas. Os parâmetros morfométricos do testículo, como a proporção e o volume de túbulo seminífero, intertúbulo e de célula de Leydig, o comprimento tubular, o diâmetro de túbulo seminífero e de núcleo de célula de Leydig e o número de células de Leydig, foram mensurados ao longo das quatro estações climáticas do ano. O peso do testículo ($6,03 \pm 0,3g$), a proporção ($75,95 \pm 5,84\%$) e o volume ($4,58 \pm 0,47ml$) de túbulo seminífero mostraram-se maiores no outono, época de acasalamento, porém o volume de tecido intertubular não se alterou ao longo das diferentes estações

climáticas. O diâmetro médio do túbulo seminífero na época acasalamento também foi maior ($225,31 \pm 6,07 \mu\text{m}$) em relação ao período fora da época acasalamento. A proporção ($40,00 \pm 3,34\%$) e o volume ($1,57 \pm 0,38\text{ml}$) de intertúbulo foram maiores no inverno, época de nascimento dos filhotes, o mesmo ocorre para o número de célula de Leydig totais, ($9,44 \times 10^8 \pm 1,72 \times 10^8$), sendo o diâmetro e o volume do núcleo da célula o único componente que não teve variações ao longo do ano. Neste sentido é possível concluir que há uma sazonalidade nos constituintes do testículo de lobo-guará ao longo das diferentes estações climáticas do ano na região de estudo.

ABSTRACT

SILVA, Vinícius Herold Dornelas e, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Testicular morphofunctional evaluation of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) at the different climatic seasons of the year.** Advisor: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-advisor: Moacir Carretta Júnior.

Classified as endangered by the IUCN and vulnerable by the National List Species of Brazilian Fauna Threatened of Extinction, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) suffers from the reduction and fragmentation of its environment, trampling, and population reduction of its natural prey. A study on the genetic diversity of this species reported that more than 40% of the samples obtained were from animals killed on roads or rescued near urban areas with signs of poisoning and / or bruising. Thus for the establishment of techniques in assisted reproduction and for the maintenance of the genetic variability of the species it is necessary to clarify the dynamics of testicular parameters functioning throughout the year. Few studies exist on the variation in sperm production for neotropical carnivores, however, a variation on the seminal parameters was identified for the maned wolf throughout the year. In this sense, the quantitative study of the testicular components throughout the climatic seasons becomes essential for the understanding of this process in this species. Thus, the objective of this work was to evaluate the dynamics of the testicular parenchyma of the maned wolf throughout the year. Testicular samples of four individuals of maned wolves were evaluated for each of the different climatic seasons of the year. These samples were obtained from the Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), Viçosa, Minas Gerais. The testicular volume was obtained by calculating the volume of the ellipsoid, and later the preparation of histological slides was performed. The morphometric parameters of the testis, such as the ratio and volume of seminiferous, intertubule and Leydig cell tubule, tubular length, seminiferous tubule diameter and Leydig cell nucleus, and Leydig cell number were measured at during the four seasons of the year. The weight of the testis (6.03 ± 0.3 g), the proportion ($75.95 \pm 5.84\%$) and the volume (4.58 ± 0.47 ml) of the seminiferous tubule were higher in the autumn, mating season, but the volume of intertubular tissue did not change over the different climatic seasons. The mean diameter of the seminiferous tubule at the mating season was also higher (225.31 ± 6.07 μm) compared to the off-season mating period. The proportion

($40.00 \pm 3.34\%$) and volume (1.57 ± 0.38 ml) of intertubule were higher in the winter, the cub' birth time, the same for the total Leydig cell number, ($9.44 \times 10^8 \pm 1.72 \times 10^8$), the diameter and volume of the cell nucleus being the only component that did not change throughout the year. In this sense, it is possible to conclude that there is a seasonality in the constituents of the testudo of maned wolf along the different climatic seasons of the year in the region of study.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A distribuição e abundância dos grandes carnívoros reduziram drasticamente com o decorrer da ocupação humana (Paquet e Hackman, 1995). O que prejudica à manutenção da variabilidade genética, ligada intrinsecamente a conservação das espécies, pois quando uma população quando isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética e vários fatores se somam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a diminuição da fertilidade, maior susceptibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermáticas e o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, afetando a espermatogênese, ovulação, morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien e MCCulloch, 1985; Wildt et al., 1987; Wildt et al., 1992; Munson et al., 1996; Eizirik et al., 2001).

1.1. Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*)

A família Canídea pertence à ordem Carnívora, um grande grupo de mamíferos predadores caracterizados por possuírem dois pares de dentes caninos e os quartos pré-molares superiores e primeiros molares inferiores modificados para maximizar a eficiência de corte de pele, músculos e tendões de suas presas (Xiaoming et al., 2004). Apesar da dentição adaptada à dieta carnívora, muitas espécies incluem outros elementos na dieta, como insetos e vegetais, algumas em grande proporção, como é o caso do lobo guará (IUCN, 2004; Nalla, 2017).

Atualmente existem 16 gêneros de canídeos, que abrigam 36 espécies distribuídas pelos mais diversos ecossistemas, desde desertos até o Ártico (IUCN, 2004; Sillero-Zubiri e Macdonald, 2004). Dentre elas, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) representa a maior espécie de canídeo na América do Sul e a quarta maior espécie mundial. A área de ocorrência desta espécie abrange do nordeste do Brasil (exceto áreas costeiras) até o norte da Argentina, Paraguai, leste da Bolívia e oeste dos Pampas del Chaco no Peru (Figura 1), em um total de aproximadamente 5 milhões de km² (Dietz, 1985).

O lobo-guará possui pernas longas e pelagem vermelha como ferrugem cobrindo a maior parte do corpo, enquanto em volta do focinho e na região distal das pernas a pelagem é marrom escura ou preta, e na região cervical dorsal possui coloração preta, formando uma crina. A pelagem da crina é muitas vezes erguida durante encontros de

podendo o território da fêmea se sobrepor ao do macho (Melo et al., 2007). Quanto ao comportamento reprodutivo, são monogâmicos facultativos na maior parte da vida (Miranda, 2003), com pares andando juntos durante a estação reprodutiva (abril-junho) para o acasalamento (Dietz, 1984). Melo et al. (2007 e 2009) observaram que o macho de lobo-guará diminui sua área de vida durante o período peri-parto, assim como a distância da fêmea e seu nível de atividade, indicando cuidados parentais, mesmo que não diretamente, com a prole. Em cativeiro foi relatado machos representando um papel no crescimento dos filhotes com regurgitação de comida (Rasmussen e Tilson, 1984), o mesmo foi observado para outras espécies de canídeos como o lobo cinzento (*Canis lupus*), cão selvagem africano (*Lycaon pictus*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) e cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) (Asa e Valdespino, 1998).



Figura 2: Indivíduo de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) macho adulto mantido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV).

O período de gestação do lobo-guará é de 63-67 dias, as ninhadas são de 2-5 filhotes e os nascimentos podem ocorrer no início de fevereiro, mas a maioria dos filhotes nasce durante a estação seca de junho a setembro (Dietz, 1984). A época de acasalamento

dessa espécie corresponde, no Brasil, à estação climática do outono compreendida entre os meses de abril a junho, o nascimento dos filhotes é na estação climática do inverno que são os meses de julho, agosto e setembro. Já as estações climáticas da primavera (outubro a dezembro) e do verão (janeiro a março) é o período fora da época reprodutiva dessa espécie, em que macho e fêmea estão em territórios separados (Lyon e Stearns, 1995).

1.2. Conservação

O lobo-guará está listado no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) como espécie cujo comércio deve ser controlado, apesar de não se encontrar em perigo de extinção, de modo a evitar uma comercialização não compatível com a sua sobrevivência (Cites-Listed Species, 2017), além de constar na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (ICMBio, 2016) como vulnerável e como quase ameaçado de extinção pela *IUCN* (International Union for Conservation of Nature) *Red List of Threatened Species* (IUCN, 2015). As principais causas do declínio desta espécie são a redução e fragmentação drástica do seu ambiente, atropelamentos em rodovias, redução da população de suas presas naturais e a forte pressão de caça, uma vez que acabam invadindo fazendas e predando animais domésticos como uma alternativa de alimentação (Dietz, 1984; Dietz, 1987; Fonseca et al., 1994; Vieira, 1996). Estudo sobre a diversidade genética dessa espécie na região do Distrito Federal, Brasil, relatou que mais de 40% das amostras obtidas foram de animais mortos em estradas ou resgatados próximos de áreas urbanas com sinais de envenenamento e/ou machucados (Lion et al., 2011). Os animais domésticos também podem representar uma ameaça a essa espécie, pois competem por alimento e podem se tornar fonte de doenças (Rodden et al., 2004).

O lobo-guará é uma espécie nativa do cerrado, um ambiente que sofre forte pressão humana, sendo que este bioma tem apenas 6% em áreas protegidas e até 2002 perdeu mais de 50% de sua área original, sendo as principais causas da perda de área a degradação do solo, uso intenso de fertilizantes, pastagens com gramíneas exóticas e queimadas repetitivas (Klink e Machado, 2005; Machado et al., 2004; Myers et al., 2000). Essa espécie possui ainda uma grande importância ecológica, pois, assim como os demais carnívoros, apresenta um papel determinante na regulação da densidade de suas espécies de presas, além de muitas outras espécies da comunidade, processo conhecido como “cascata trófica” (Greene, 1988; Terborgh, 1990).

A perda contínua e acelerada da biodiversidade global tem desafiado o campo da biologia da conservação, que define os muitos fatores que influenciam ecossistemas e a sobrevivência das espécies. A fragmentação, exploração e poluição dos habitats naturais têm resultado em perdas catastróficas de variabilidade genética causadas pela constrição subsequente de populações (Wildt et al., 1992). O estabelecimento de técnicas em reprodução assistida para a manutenção da variabilidade genética de espécies em acelerado processo de extinção torna-se necessário, assim como o esclarecimento de parâmetros básicos de sua reprodução.

1.3. Testículo

O testículo dos mamíferos é um órgão de forma ovalada a arredondada, geralmente, localizado fora da cavidade abdominal em uma prega cutânea, denominada escroto (Dyce, 2004). A localização testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior nos testículos do que a temperatura da cavidade abdominal para manutenção das funções testiculares (Junqueira e Carneiro, 2008).

Este órgão está envolto pela túnica albugínea, uma cápsula constituída de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas espécies, também por células contráteis (Setchell, 1991). Essa túnica é contínua com as trabéculas de tecido conjuntivo, os septos testiculares, que convergem para o interior do testículo no sentido do mediastino formando lóbulos testiculares, que apresentam vasos e alojam os túbulos seminíferos (Paula, 1999; Carretta Junior, 2008).

Embriologicamente a maioria das células somáticas constituintes dos testículos são procedente dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático, exceto as células germinativas que se originam do epiblasto (1998; Merchant-Larrios e Moreno-Mendoza, 1998). Funcionalmente o testículo pode ser dividido em dois compartimentos principais, tubular e intertubular (Ashdown e Hancock, 1988). O compartimento tubular, formado pelo epitélio germinativo ou seminífero, é constituído por dois tipos de células, as da linhagem germinativa e as somáticas, ou células de Sertoli, que envolvem e nutrem as células germinativas. No compartimento intertubular se localizam as células intersticiais de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, além de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo (Rondon et al., 2000; Junqueira e Carneiro, 2008).

Os hormônios gonadotróficos hipofisários controlam as funções endócrinas e exócrinas do testículo. O hormônio folículo estimulante (FSH) está relacionado com o início e manutenção da atividade gametogênica dos túbulos seminíferos, e o hormônio luteinizante (LH) controla a atividade endócrina das células de Leydig. Estas são responsáveis pela produção de testosterona, dando suporte à atividade gametogênica, além de serem responsáveis pelas características sexuais secundárias no macho adulto (Ashdown e Hancock, 1988).

O índice gonadossomático (IGS) é a relação entre o tamanho corporal e o tamanho dos testículos, e ele pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie (Kenagy e Trombulak, 1986). Animais que adotam comportamento sexual baseado em sistemas promíscuo ou poliândrico, no qual diferentes machos copulam com a mesma fêmea no mesmo ciclo estral, apresentam maior IGS quando comparados aos animais que adotam sistemas monogâmicos ou poligínico, no qual um único macho é responsável pela cópula com uma ou várias fêmeas (Short, 1997).

Existe também uma correlação entre o peso testicular e a produção espermática (Amann, 1970; Olar et al., 1983; França e Russell, 1998), entretanto, o tamanho testicular não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, sendo o investimento somático em massa gonadal maior em animais de pequeno porte em relação àqueles de maior porte corporal (Kenagy e Trombulak, 1986). Esse fato contribui para a economia de energia, já que animais de grande porte podem produzir grandes quantidades de espermatozoides, sem a necessidade de maior investimento em tamanho testicular (Paula, 1999).

Há uma grande variação na proporção volumétrica de túbulo seminífero existente no testículo entre as diferentes espécies, sendo esse componente o mais abundante do parênquima testicular em todos os animais já estudados (França e Russell, 1998; Leal et al., 2006; Costa et al., 2008; Caldeira et al., 2010). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, como o diâmetro tubular, a espessura do epitélio seminífero e o comprimento total de túbulos seminíferos, apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações que permitem a descrição da mesma em uma dada espécie (França e Russell, 1998; Paula, 1999).

O epitélio seminífero é composto por quatro camadas de células germinativas de gerações distintas. Na camada basal do epitélio seminífero observam-se espermatogônias e espermatócitos primários iniciais; já as camadas intermediárias são formadas por gerações de espermatócitos primários mais desenvolvidos e espermatócitos secundários;

enquanto na camada apical encontram-se as espermatídes. Todas essas células estão organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Estes estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta sequência, completa e ordenada, constitui o processo denominado como ciclo do epitélio seminífero (CES) (Leblond e Clermont, 1952; Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990).

Entre os métodos utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado nos animais domésticos é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermatídes e na presença de figuras de divisões meióticas (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977; Guerra, 1983; França, 1991), método este designado como da morfologia tubular. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados, existindo somente um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990).

A sustentação e organização das células germinativas ao longo do epitélio seminífero são feitas por uma célula somática, a célula de Sertoli (Russell et al., 1990). Esta desempenha papel fundamental na mediação da ação do FSH e da testosterona no processo espermatogênico, no suporte e nutrição das células germinativas em desenvolvimento, na compartimentalização do epitélio seminífero, na liberação de espermatozoides no lume tubular, na secreção de fluidos, e na fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermatídes em espermição (Russell e Griswold, 1993; França e Russell, 1998). Amann e Almquist (1961) desenvolveram a metodologia para o acesso à reserva espermática testicular através da quantificação da população de espermatídes no epitélio seminífero, ou seja, o número potencial de espermatozoides em produção no testículo, ou por grama de testículo a cada ciclo do epitélio seminífero de uma dada espécie. Estes mesmo autores descreveram a produção espermática testicular como sendo a divisão da reserva espermática por um divisor de tempo, ou seja, a duração do ciclo do epitélio seminífero (Amann e Almquist, 1962).

O compartimento intertubular do testículo consiste de diferentes componentes alocados entre os túbulos seminíferos. Dentre estes estão tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, porém o principal componente deste compartimento são as células de Leydig (Hooker, 1970). Elas iniciam a secreção de testosterona ainda na vida fetal para a diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculinos. Porém, é durante

a puberdade que as células intersticiais de Leydig tornam-se mais evidentes e funcionais. A densidade populacional das células de Leydig pode variar entre indivíduos de espécies diferentes e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar o seu número por animal estão a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (Russell et al., 1994; Russell, 1996).

Estudos correlacionando a estrutura e a função das células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar este hormônio do que de diferenças no volume total das mesmas no testículo (Ewing et al., 1979). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (Zirkin, 1998). Neste sentido, Costa et al. (2006) observaram que os níveis séricos de testosterona em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) apresentaram correlação positiva e significativa com o volume individual de células de Leydig e não com a sua proporção total ou com o número das mesmas por testículo.

1.4. Sazonalidade

O município de Viçosa está localizado na Zona da Mata de Minas Gerais, no bioma Mata Atlântica, apresenta uma estação chuvosa caracterizada por chuvas que se concentram no período do verão (dezembro a fevereiro). Nestes meses também são registrados os maiores valores médios para as temperaturas máximas e também os maiores valores referentes às temperaturas mínimas mensais. A estação seca (junho, julho e agosto) é marcada pelos baixos índices pluviométricos e por apresentar as menores temperaturas mínimas mensais (Batista e Rodrigues, 2010).

Em regiões temperadas as espécies dependem do fotoperíodo nos ciclos sazonais de reprodução, migração, torpor e hibernação, além destes fatores outros como disponibilidade de alimento, interação social e estresse podem modular o impacto do fotoperíodo no animal (Dardente et al., 2016). Os outros fatores são mais influenciadores na sazonalidade animal em regiões tropicais, onde o fotoperíodo apresenta uma variação anual comparativamente fraca (Marshall, 1936; Hazlerigg, 2014). Estes fatores atuam nas

vias neuroendócrinas que estão associadas aos neurônios no cérebro que estimulam a secreção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), e estes controlam a secreção dos esteroides gonadais e, por sua vez, os esteróides retornam para controlar a secreção das gonadotrofinas (Bronson, 2009).

Algumas estratégias reprodutivas visando minimizar o custo energético da reprodução em frente às mudanças climáticas ambientais são observadas em machos adultos, como por exemplo, crescimento e involução testicular entre os períodos reprodutivos e não reprodutivos (Bronson e Heideman, 1994). Essas mudanças sazonais estão associadas com alterações da massa testicular, mudanças estas que ocorrem nas suas estruturas e funções durante os ciclos anuais, o que requer uma precisão de mecanismos associados à estimulação e inibição da proliferação celular para o desenvolvimento da espermatogênese (Schön et al., 2004).

Nos mamíferos das regiões temperadas, com marcada variação climática, se observa uma sazonalidade reprodutiva com espermatogênese e esteroidogênese destacadas em uma específica época do ano (Tsubota et al., 1997). Alterações na morfometria tubular foram observadas em várias espécies entre as estações reprodutivas e não reprodutivas como: ferretes (*Mustela putorius furo*) (Neal et al., 1977), cervo nobre (*Dama*) (Asher e Peterson, 1991), urso negro (*Ursus americanos*) (Tsubota et al., 1997) e cão guaxinim (Kaneko et al., 2005).

Os lobos-guará são monogâmicos facultativos na maior parte da vida (Miranda, 2003), as fêmeas são monoestrais apresentando um único período de ovulação por ciclo (Johnson et al., 2014). Recentemente, Teodoro et al. (2012) demonstraram características de sazonalidade quanto as características seminais ao longo do ano em lobos-guará na região sudeste do Brasil, sendo o volume do ejaculado, o número de espermatozoide e o percentual de espermatozoides vivos maiores na época reprodutiva.

2. REFERÊNCIAS

AMANN, R.P. AND ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal and extra-gonadal sperm reserves. *Journal of Dairy Science*, n.44, p.1537-1543. 1961.

AMANN, R.P. AND ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, n. 45, p. 774-781. 1962.

AMANN, R.P. Sperm production rates. Johnson, In: A.D., Gomes, W.R., Van Demark, N.L. (Eds.), *The Testis*, vol. I. Academic Press Inc., New York, NY, pp. 433–482. 1970.

ASA, C.S.; AND VALDESPIN, C. Canid reproductive biology: An integration of proximate mechanisms and ultimate causes. *American Zoologist*, n. 38, p. 251-259. 1998.

ASHDOWN, R.R.; HANCOCK, J.L. Anatomia funcional da reprodução masculina, *Reprodução Animal*, 4. ed. São Paulo: Manole, cap. 2, p. 7 – 31. 1988.

ASHER, G.W. AND PETERSON, A.J. Pattern of LH and testosterone secretion of adult male fallow deer (*Dama dama*) during the transition into the breeding season. *Journoul Reproduction and Fertility*, n. 91, p. 649-654. 1991

BATISTA, M. DA S. AND RODRIGUES, R. DE Á. Análise Climática de Viçosa Associada à Ocorrência de Eventos Pluviométricos Extremos. *Caminhos de Geografia*, n. 11(36), p. 52–67. 2010.

ERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal Animal Science*, n.5 (4), p.818-83. 1977.

BESTELMEYER, S.V. AND C. WESTBROOK. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) predation on pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus*) in central Brazil. *Mammalia*, n. 62, p. 591–595. 1998.

BESTELMEYER, S.V. “Solitary, reproductive and parental behavior of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*)”. Ph.D. dissertation. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA. 2000.

BRONSON, E.H., AND HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: E. Knobil and J. D. Neill. *Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press, (eds.), pp. 541-583. 1994.

BRONSON, F.H. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, n. 364 (1534), p. 3331-3340, 2009.

CALDEIRA, B. C.; PAULA, T. A. R. DE; MATTA, S. L. P. DA; BALARINI, M. K.; CAMPOS, P. K. A. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista Ceres*, n. 57(5), p. 569–575. 2010.

CARRETTA JÚNIOR, M. Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) adultas. Diss. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 61p, 2008.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S. L. P. The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Animal Reproduction Science*, n. 91, p. 173 – 179. 2006.

COSTA, G.M.J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R.G.; ALVARENGA, R.L.L.S.; FRANÇA, L.R. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar. *Theriogenology*, n. 70, p. 1136-1146. 2008.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. The testis. (ed) New York: Academic Press. v.1, cap. 6, p. 339-432. 1970.

DARDENTE, H.; LOMET, D.; ROBERT, V.; DECOURT, C.; BELTRAMO, M.; PELLICER-RUBIO, M.T. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, n. 86(1), p. 324–332. 2016.

DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Smithsonian Contributions to Zoology*, n.392, 1–51. 1984.

DIETZ, J.M. Mammalian species - *Chrysocyon brachyurus*. *The American Society of Mammalogists*, [S.l.], v. 234, p. 1-4, 1985.

DIETZ, J.M. Grass roots of the maned wolf. *Natural History*, n. 96 (3), p. 52, 1987.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WERSING, C.J.G. *Tratado de Anatomia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 834 p. 2004.

EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; RAYMOND, M.M.; GRAWSHAW JR, P.G.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular and Ecology*, n. 10, p. 65-79. 2001.

EWING, L.L.; ZIRKIN, B.B.; COCHRAN, R.C.; KROMANN, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, v. 105, p. 1135 - 1142, 1979.

FLETCHALL, N. B.; RODDEN, M.; TAYLOR, S. Manual do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus*. n. 1 (1). 1995.

FONSECA, G.A.B., A.B. RYLANDS, C.M.R. COSTA, R.B.M. MACHADO E Y.L.R. LEITE. Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. (Ed) Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 459 p.1994.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. e Martinez-Garcia. Male reproduction: A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, 197-219. 1998.

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 180p. 1991.

GREENE, H.W. Species richness in tropical predators. In: Almeda F, Pringle CM (eds) Tropical rainforests: diversity and conservation. Mere Calif Acad Sci, San Francisco, CA, pp 259-279. 1988.

GUERRA, M.O. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Revista Brasileira de Biologia*, n.4 (43), p.385-394. 1983.

HAZLERIGG D.G. AND SIMONNEAUX V. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 4th Edition. p. 1575–604. 2014.

HOOVER, C.W. The intertubular tissue of the testis. In: The testis Development: anatomy and physiology. Nova Yorque: Academic Press, 1, 483-550. 1970.

IUCN – The World Conservation Union. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs – 2004. Status Survey and Conservation Action Plan. Canid Specialist Group.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B.; PORTER, J. C.; PARKER, C. R.; PETTY, C. S. Serum Gonadotropin Levels in Aging Men, n. 59(4), p. 756–763. 2014.

JUNQUEIRA, L.C. AND CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO. J. Histologia básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, cap. 21, p. 323-334. 2008.

KANEKO, K.; AKIYA, Y.; SATO, H.; TANAKA, A.; AOKI, H.; MIYOSHI, M.; ABUKAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; KAWAKAMI, S. Seasonal influence on testicular function of male raccoons, *Procyon lotor*. Journal of Reproduction and Development, n. 51, p. 477-482, 2005.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. Developmental Biology, v. 203, p. 323–333. 1998.

KENAGY, G.J. AND TROMBULAK, S.C. Size and function of mammalian testes in relation to body size. Journal of Mammals, n. 67, p. 1-22, 1986.

KLINK, C.A., e MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. Conservation Biology, n. 19(3), p.707–713. 2005.

LEAL, M.C. AND FRANÇA, L.R. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. Biology of Reproduction, n. 74(4), p. 616–624. 2006.

LEBLOND, C.P., CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Annual New York Academic Science, v.55, p.548-584. 1952.

Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2016. Disponível <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6091-especie-6091>> Acesso em: 21 julh. 2018.

LION, M. B., EIZIRIK, E., GARDA, A. A., DA FONTOURA-RODRIGUES, M. L., RODRIGUES, F. H. G., MARINHO-FILHO, J. S Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. Genetica, n. 139(3), p. 369-381, 2011.

LYON, F.; STEARNS, M.J. Behavior and social organization. In: FLETCHALL, N.B.; RODDEN, M.; TAYLOR, S. Husbandry manual for the Maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. 1995.

MACHADO, R.B.; RAMOS, M.B. NETO, P.G.P.; PEREIRA, E.F.; CALDAS, GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF. p. 1–23. 2004.

MARSHALL, F.H.A. Sexual periodicity and the causes which determine it. Nature, n. 137 (3478), p. 1056–1057. 1936.

MELO, L.B.; SABATO, M. L.; MAGNI, E.V.; YOUNG, R.J.; COELHO, C.M. Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815): as revealed by GPS tracking collars. *Journal of Zoology*, n. 271 (1), p. 27-36, 2007.

MELO, L.F.B.; SÁBATO, M.A.L.; VAZ MAGNI, E.M.; YOUNG, R.J.; COELHO, C.M. First observations of nest attendance behavior by wild maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*. *Zoo Biology*: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association, n. 28(1), p. 69-74. 2009.

MERCHANT-LARRIOS, H.; MORENO-MENDOZA, N. Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Experimental Cell Research*, v. 244, p. 230-238. 1998.

MIRANDA, E. E. Natureza, conservação e cultura: ensaios sobre a relação do homem com a natureza no Brasil. São Paulo: Metalivros, 180p. 2003.

MUNSON, L.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; PACKER, C.; JANSSEN, D.; REIZISS, S.M.; WILDT, D.E. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 108, p. 11-15. 1996

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, n. 403(6772), p. 853–858. 2000.

NALLA, S.F. Dentição do *Chrysocyon brachyurus* (Illiger,1815) e sua relação com a dieta. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 46 p. 2017.

NEAL J, MURPHY B.D.; MOGER W.H.; OLIPHANT L.W. Reproduction in the male ferret: gonadal activity during the annual cycle; recrudescence and maturation. *Biology of Reproduction*, n. 17(3). p. 380-5. 1977.

O'BRIEN, M.K.; D.R. MCCULLOGH. Survival of black-tailed deer following relocation in Califórnia. *Journal of Wildlife Manage*, n. 49, p. 115-119. 1985.

OLAR, T.T., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biology of Reproduction*, v. 29, p. 1114-1120. 1983.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. Cap.8, p. 203-227. 1977.

PAQUET, PAUL C., AND ARLIN HACKMAN. Large carnivore conservation in the Rocky Mountains: a long-term strategy for maintaining free-ranging and self-sustaining populations of carnivores. World Wildlife Fundation. Canada, 1995.

PAULA, T.A.R. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 84p. 1999.

RASMUSSEN, J.L.ANDTILSON, R.L. Food Provisioning by Adult Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*) Ethology. n. 65:4, p. 346–352. 1984.

RODDEN, M.; RODRIGUES, F.H.G.; BESTELMEYER, S. Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MACDONALD, D.W. Canids: foxes, wolves, jackals and dogs: status Surveyand Conservation Action Plant. Gland, Switzerland, Cambridge, UK: IUCN/SSC Canid Specialist Group, p. 430. 2004.

RONDON, A.S.; RIBAS, J.A.S.; CAMARGO, L.M.; GERMINARO, A.; PERSONA, L.N.; SIMÕES, M.J.; FRANCO, P.C. Aspectos histológicos do testículo do lobinho do mato (*Cerdocyon thous*). Arquivos do Instituto Biológico, n. 67, p. 55-58. 2000.

ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL Jr., L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. American Journal of Anatomy, n.1 (87), p.1-30. 1950.

RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, Florida, 801 p. 1993.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Flórida. 286p. 1990.

RUSSELL, L.D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A.P. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. International Journal of Andrology, n. 17(2), p. 93-106. 1994.

RUSSELL, L.D. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (eds). The Leydig cell. Cache River Press. Vienna, IL, cap. 10, p. 218-222. 1996.

SCHÖN, J.; HOMBACH-KLONISCH, S.; KEHLEN, A.; BLOTTNER, S.; KLONISCH, T. Seasonal expression of INSL3 and Lgr8/Insl3 receptor transcripts indicates variable differentiation of Leydig cells in the roe deer testis. Biology of Reproduction, n. 71(4), p. 1079–1087. 2004.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen In: Reproduction of domestic animals. C., P.T. (Ed). New York: Academic Press, p. 221-249. 1991.

SHORT, R.V. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatrica*, New York (Supplement), 422:3-7. 1997.

SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MACDONALD, D.W. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. IUCN/SSC Canid Specialist Group 2004.

SILVEIRA, E.K.P. DA. Notes on the care and breeding of the maned wolf *Chrysocyon brachyurus* at Brasilia Zoo. *International Zoo Yearbook*, n. 8, p. 21–23. 1968.

NALLA, S.F. Dentição do *Chrysocyon brachyurus* (Illiger,1815) e sua relação com a dieta. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 46 p. 2017.

SWIERSTRA, E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anatomic Record*, v. 161, p.171-186, 1968

TEODORO, L.O.; MELO-JUNIOR, A.A.; SPERCOSKI, K.M.; MORAIS, R.N.; SOUZA, F.F. Seasonal Aspects of Reproductive Physiology in Captive Male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815). *Reproduction in Domestic Animal* 47 (Suppl. 6), 250–255. 2012.

TERBORGH, J. The role of felid predators in neotropical forests. *Vida Silvestre Neotropical*, n. 2, p. 3–5, 1990.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 July 2018 - valid from 4 October 2017.

TSUBOTA, T., HOWELL-SKALLA, L., NITTA, H., OSAWA, Y., MASON, J.I., MEIERS, P.G., BAHR, J.M. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 109, p. 21–27. 1997.

VIEIRA, E.M. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Journal Brazilian Associat.* v.48, p.270-272, 1996.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; GOODROWE, K.L.; PACKER, C.; PUSEY, A.E.; BROWN, J.L.; JOSLIN, P.; O'BRIEN, S.J. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion population. *Nature*, v. 329, p. 328-331. 1987.

WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology, or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, n. 2 (37), p. 161-184, 1992.

XIAOMING, W.; TEDFORD, R.H.; VALKENBURGH, B.V.; WAYNE, R.K. Ancestry evolutionary history, molecular systematics, and evolutionary ecology of Canidae. In: MACDONALDS, D.W.; SILLERO-ZUBIRI, C. (Ed.) *Biology and conservation of wild canids*. Oxford University Press, New York, 431p. 2004.

ZIRKIN, B.R. Spermatogenesis: Its regulation by testosterone and FSH. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, n. 9(4), p. 417–421. 1998.

ARTIGO 1

AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DA PORÇÃO TUBULAR DO TESTÍCULO DO LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*) NAS DIFERENTES ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DO ANO

RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é classificado como vulnerável a extinção de acordo com a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. A época reprodutiva do lobo-guará está compreendida entre abril e junho, sua gestação dura entre 63 e 67 dias e o nascimento dos filhotes ocorre entre junho e setembro. Em animais de regiões neotropicais a sazonalidade não havia sido descrita até recentemente, quando diferenças significativas na produção de espermatozoides ao longo do ano em lobos-guará foram descritas. Neste sentido, o estudo quantitativo dos componentes testiculares ao longo das estações climáticas torna-se essencial para o entendimento desse processo nessa espécie. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica do parênquima testicular do lobo-guará ao longo do ano. Foram avaliadas amostras testiculares de quatro indivíduos de lobos-guará para cada uma das diferentes estações climáticas do ano, estas amostras foram obtidas no acervo do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), Viçosa, Minas Gerais. O volume testicular foi obtido através do cálculo do volume do elipsoide, e após a confecção de lâminas histológicas os seguintes parâmetros foram obtidos e analisados: percentuais volumétricos de túbulo seminífero e tecido intertubular, volumes de túbulo seminífero e tecido intertubular, comprimento de túbulo seminífero e diâmetro de túbulo seminífero. O peso do testículo ($6,03 \pm 0,3g$), a proporção ($75,95 \pm 5,84\%$) e o volume ($4,58 \pm 0,47ml$) de túbulo seminífero mostraram-se maiores no outono, época de acasalamento, porém o volume de tecido intertubular não se alterou ao longo das diferentes estações. O diâmetro médio do túbulo seminífero na época acasalamento, também foi maior ($225,31 \pm 6,07 \mu m$) em relação ao período fora da época acasalamento. Neste sentido é possível concluir que há uma sazonalidade no constituinte produtor de espermatozoides do testículo de lobo-guará ao longo das diferentes estações climáticas do ano na região estudada.

Palavras-chave: Canídeo; Reprodução; Parênquima testicular; Sazonalidade.

MORPHFUNCTIONAL EVALUATION OF THE TUBULAR PORTION OF THE MANED WOLF (*Chrysocyon brachyurus*) TESTICLE IN THE DIFFERENT CLIMATE SEASONS OF THE YEAR

ABSTRACT

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) is classified as vulnerable to extinction according to the National List Species of Brazilian Fauna Threatened of Extinction. The reproductive season of the maned wolf is between April and June, its gestation lasts between 63 and 67 days and the birth of the cubs occurs between June and September. In animals from Neotropical regions, seasonality had not been described until recently, when significant differences in sperm production throughout the year in maned wolves were described. In this sense, the quantitative study of the testicular components throughout the climatic seasons becomes essential for the understanding of this process in this species. Thus, the objective of this work was to evaluate the dynamics of the testicular parenchyma of the maned wolf throughout the year. Testicular samples of four individuals of maned wolves were evaluated for each of the different climatic seasons of the year. These samples were obtained from the Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), Viçosa, Minas Gerais. Testicular volume was obtained by calculating the volume of the ellipsoid, and after the preparation of histological slides the following parameters were obtained and analyzed: volumetric percentages of seminiferous tubule and intertubular tissue, volumes of seminiferous tubule and intertubular tissue, seminiferous tubule length and diameter of seminiferous tubule. The weight of the testis (6.03 ± 0.3 g), the proportion ($75.95 \pm 5.84\%$) and the volume (4.58 ± 0.47 ml) of the seminiferous tubule were higher in the autumn, mating, but the volume of intertubular tissue did not change throughout the different seasons. The mean diameter of the seminiferous tubule at the mating season was also higher (225.31 ± 6.07 μm) relative to the off-season mating period. In this sense it is possible to conclude that there is a seasonality in the constituent producing spermatozoa of the wolf manure testicle throughout the different climatic seasons of the year in the studied region.

Keywords: Canid; Reproduction; Testicular parenchyma; Seasonality.

1. INTRODUÇÃO

A distribuição e abundância dos grandes carnívoros reduziram drasticamente com o decorrer da ocupação humana (Paquet e Hackman, 1995). A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética, pois quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética vários fatores se somam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a diminuição da fertilidade, maior susceptibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermiáticas e o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, afetando a espermatogênese, ovulação, morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien e MCCulloch, 1985; Wildt et al., 1987; Wildt et al., 1992; Munson et al., 1996; Eizirik et al., 2001).

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) representa a maior espécie de canídeo na América do Sul (Dietz, 1984). Esta espécie está listada no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e da Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção (CITES) (Cites-Listed Species, 2017), além de constar na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (2016) como vulnerável. Entre as principais causas do declínio da população desta espécie estão a redução e fragmentação drástica do seu ambiente, queimadas repetitivas de pastagens, atropelamentos em rodovias, redução da população de suas presas naturais e a forte pressão de caça (Dietz, 1987; Fonseca et al., 1994; Vieira, 1996; Klink e Machado, 2005).

São animais monogâmicos facultativos na maior parte da vida (Miranda, 2003). Sua época de acasalamento corresponde, no Brasil, à estação climática do outono, compreendida entre os meses de abril a junho. O nascimento dos filhotes é na estação climática do inverno que são os meses de julho, agosto e setembro. Já as estações climáticas da primavera (outubro a dezembro) e do verão (janeiro a março) correspondem ao período fora da época reprodutiva (Lyon e Stearns, 1995). Teodoro et al. (2012) identificaram, em lobos-guará, uma diminuição do volume ejaculado na época não reprodutiva da espécie, a concentração de espermatozoide e o número de espermatozoides vivos no ejaculado também seguiram esse padrão na época não reprodutiva, indicando que os machos da espécie possuem uma sazonalidade em sua produção de espermatozoides ao longo do ano.

As perdas contínuas e aceleradas da biodiversidade global têm desafiado o campo da biologia da conservação, que define os muitos fatores que influenciam ecossistemas e a sobrevivência das espécies. A fragmentação, exploração e poluição dos habitats naturais

têm resultado em perdas catastróficas de variabilidade genética causadas pela constrição subsequente de populações (Wildt et al., 1992). Visando o estabelecimento de técnicas em reprodução assistida para a manutenção da variabilidade genética de espécies em acelerado processo de extinção torna-se necessário o esclarecimento dos parâmetros básicos de sua reprodução. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica do parênquima testicular do lobo-guará ao longo do ano

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e animais de estudo

O projeto foi autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) com número 55154-1, e registro na Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) com o número 70/2016.

Foram utilizadas amostras testiculares de 16 lobos-guará adultos (*Chrysocyon brachyurus*) da região de Viçosa, Minas Gerais, que foram casuisticamente encaminhados e que vieram a óbito no Centro de Tiragem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV) durante seu período de atividades (2000 – 2011).

Os animais encaminhados ao CETAS-UFV e que vieram a óbito eram necropsiados, e durante o exame tanatológico vários dados e amostras eram registrados e coletados, entre eles as medidas dos animais e fragmentos de órgãos que eram mantidas em acervos para exames microscópicos e pesquisas futuras, como é o caso dos testículos dos animais deste estudo.

2.2. Análises microscópicas e morfometria

Os dados biométricos dos animais, como peso e mensurações dos testículos, foram obtidos a partir das fichas de registro e necropsopia dos animais. Os fragmentos testiculares usados nesta pesquisa foram provenientes de quatro indivíduos por estação climática, totalizando 16 amostras do acervo do CETAS-UFV. O material coletado foi fixado em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (Karnovsky, 1965), e conservados em álcool 70% até o momento da inclusão.

As amostras foram submetidas a banhos crescentes de álcoois para desidratação, posteriormente infiltradas e incluídas em resina de glicol metacrilato (Leica Historesin®).

Foram obtidos cortes com 3 μm de espessura, em intervalo de 15 μm , para montagem de lâminas histológicas, e estas foram coradas com solução de azul de toluidina / borato de sódio 1%.

O peso do testículo foi estimado através do cálculo do volume do elipsoide ($4/3\pi ABC$, onde A = metade da largura, B = metade da espessura e C = metade do comprimento) subtraídos da prega dupla de pele. O índice gonadossomático (IGS) foi calculado dividindo-se o peso de ambos os testículos pelo peso corporal e o resultado multiplicado por 100. Sobre o valor do índice gonadossomático foi inferido o valor percentual ocupado por túbulos seminíferos, obtendo-se assim o índice tubulossomático, ou seja, o percentual do peso corporal alocado em túbulos seminíferos.

Para as análises histológicas do parênquima testicular foram capturadas imagens digitais em fotomicroscópio de luz (Motic BA410) equipado com câmera digital Moticam Pro 252B. Para o cálculo da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, foram fotografados 10 campos aleatórios para cada uma das 16 amostras coletadas em aumento de 200 vezes. Em cada imagem foi sobreposta uma gráticula com 500 intersecções, totalizando 5000 pontos por amostra, onde foram computados os pontos sobre túbulo seminífero, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, citoplasma e núcleo de célula de Leydig. Com os valores das proporções volumétricas do parênquima testicular e do peso do testículo foi calculado o volume da porção tubular e intertubular do testículo.

As dimensões de diâmetro de túbulo foram mensuradas a partir de 10 túbulos seminíferos, os mais circulares possíveis, para cada uma das quatro estações. As mensurações foram realizadas através do programa Motic [®]. O comprimento total de túbulo seminífero foi calculado através da fórmula do volume do cilindro (volume = área da base x altura), e dividindo o comprimento total de túbulo pelo peso do testículo calculou-se o comprimento de túbulo por grama de testículo. Foram calculadas também correlações lineares entre constituintes do parênquima testicular.

Os resultados foram avaliados quanto à média, desvio padrão e o coeficiente de variação segundo a função estatística do programa Excel/Windows7. As médias dos parâmetros obtidos foram comparadas nas quatro estações climáticas do ano a partir do cálculo do intervalo de confiança a 0,05 % de significância.

3. RESULTADOS

O peso dos animais não sofreu variação dentro das estações climáticas do ano, o IGS da época de acasalamento (outono) apresentou o maior valor entre as estações, sendo semelhante apenas com o valor encontrado para a primavera. O índice tubulossomático foi semelhante entre as estações da primavera, verão e outono, apresentando um menor valor no inverno. Os valores para o peso corporal e testicular do animal, e os índices gonadossomático (IGS) e tubulossomático (ITS) estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Peso corporal médio de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), e índices gonadossomático (IGS) e tubulossomático (ITS) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Peso corporal (kg)	24,88±0,48 ^a (1,9)	24,75± 0,29 ^a (1,2)	24,38± 0,75 ^a (3,1)	24,50± 0,41 ^a (1,7)
Peso do testículo (g)	4,76±1,71 ^{ab} (35,9)	5,2±0,26 ^b (5,0)	6,03±0,30 ^a (5,0)	3,98±1,20 ^b (25,1)
IGS (%)	0,038±0,01 ^{ab} (26,3)	0,042±0,002 ^b (4,8)	0,050±0,002 ^a (4,0)	0,033±0,01 ^b (30,3)
ITS (%)	0,026±0,01 ^{ab} (38,5)	0,033±0,003 ^a (9,1)	0,038±0,002 ^a (5,3)	0,019±0,005 ^b (26,3)

Valores: Média ± desvio padrão. a,b: letras diferentes dentro de uma mesma linha são diferenças significativas, com $p < 0,05$ para intervalo de confiança. Entre parênteses coeficiente de variação.

No presente trabalho o peso do testículo do lobo-guará apresentou-se maior na época de acasalamento, época correspondente à estação climática do outono. No parênquima testicular o percentual volumétrico e o volume calculado de túbulo seminífero foram inferiores no inverno em relação aos valores observados no verão e outono, porém não houve variação em relação aos valores observados na primavera. O volume de tecido intertubular não sofreu alterações entre as estações climáticas do ano,

porém o percentual volumétrico deste compartimento testicular apresentou comportamento inverso em relação ao observado para a proporção volumétrica do compartimento tubular, sendo superiores no inverno em relação aos valores observados no verão e outono. Os valores para proporções volumétricas e volumes de túbulo seminífero e de intertúbulo estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Peso testicular, proporção volumétrica e volume de túbulo seminífero e de tecido intertubular no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Proporção volumétrica de túbulo seminífero (%)	66,29±9,44 ^{ab} (14,2)	78,49±7,07 ^a (9,0)	75,95±5,96 ^a (7,9)	60,00±3,34 ^b (5,7)
Volume de túbulo seminífero (ml)	3,27±1,55 ^{ab} (47,4)	4,08±0,38 ^a (9,3)	4,58±0,47 ^a (10,3)	2,41±0,83 ^b (34,4)
Proporção volumétrica de intertúbulo (%)	33,71±9,44 ^{ab} (28,0)	21,51±7,07 ^a (32,7)	24,06±5,96 ^a (24,8)	40,00±3,34 ^b (8,4)
Volume de intertúbulo (ml)	1,49±0,30 ^a (20,1)	1,12±0,37 ^a (33,0)	1,45±0,36 ^a (24,8)	1,57±0,38 ^a (24,2)

Valores: média ± desvio padrão. a,b: letras diferentes são diferenças significativa com $p < 0,05$ para intervalo de confiança. CV: coeficiente de variação percentual.

Durante a época de acasalamento identificamos um aumento da proporção tubular, mas também uma queda fora da época de acasalamento como ilustrado no gráfico da figura 1. O comportamento dos parâmetros peso testicular, peso da porção tubular e intertubular ao decorrer das estações climáticas pode ser observado na figura 1.

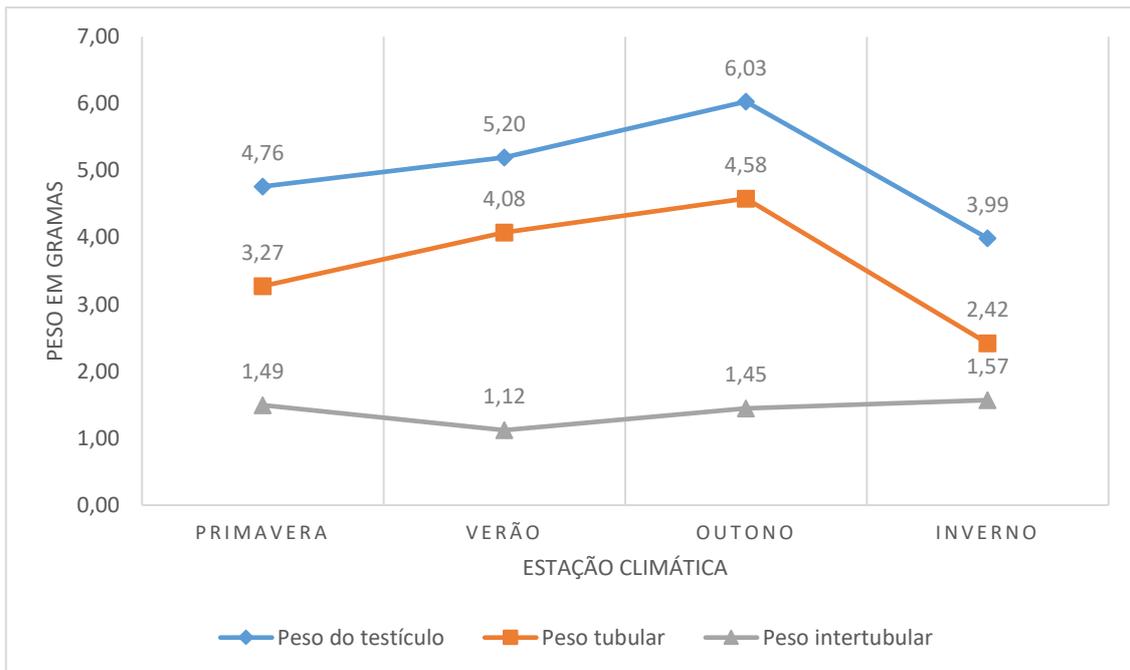


Figura 1: Peso do testículo e das porções tubular e intertubular do parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.

O diâmetro tubular encontrado no presente trabalho foi maior para a estação climática do outono em relação aos valores observados no verão e inverno, porém não foi observada diferença significativa em relação aos valores registrados na primavera. O comprimento total de túbulo seminífero foi menor no inverno do que em todas as outras estações climáticas do ano, porém seu comprimento por grama de testículo não sofreu alteração ao decorrer das estações climáticas. Os valores para o diâmetro médio de túbulo seminífero, comprimento total de túbulo seminífero e comprimento tubular por grama de testículo estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Diâmetro médio, comprimento total e comprimento por grama de testículo do túbulo seminífero de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata Mineira.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Diâmetro de túbulo seminífero (μm)	199,42 \pm 34,99 ^{ab} (17,5)	208,25 \pm 5,39 ^b (2,6)	225,31 \pm 6,07 ^a (2,7)	183,56 \pm 24,68 ^b (13,4)
Comprimento total de túbulo seminífero (m)	101,23 \pm 18,23 ^{ab} (18,0)	123,47 \pm 12,41 ^a (10,1)	118,16 \pm 9,57 ^a (8,1)	92,76 \pm 13,29 ^b (14,3)
Comprimento de túbulo por grama de testículo (m/g)	22,73 \pm 5,86 ^a (25,8)	23,82 \pm 2,94 ^a (12,3)	19,61 \pm 1,47 ^a (7,5)	24,29 \pm 4,74 ^a (19,5)

Valores: Média \pm desvio padrão. a,b: letras diferentes são diferenças significativa com $p < 0,05$ para intervalo de confiança. CV: coeficiente de variação percentual.

4. DISCUSSÃO

O peso médio dos animais não sofreu alteração durante as estações climáticas, pois os animais eram mantidos em cativeiro, não havendo nenhuma alteração drástica no peso e composição de suas dietas ao longo do ano.

Bittencourt et al. (2007), trabalhando com espermatogênese de lobos-guará, descreveram apenas valores médios anuais para os parâmetros estudados, sem levar em consideração a interferência da sazonalidade. Esses autores descreveram valores de 0,04% para o IGS e 0,03% para o ITS de lobos-guarás, valores estes idênticos à média anual do presente trabalho. Este apresentou um IGS maior na época de acasalamento (outono), sendo esse valor maior do que o encontrado por Bittencourt et al. (2007). Já o ITS do presente trabalho apresentou valores semelhantes entre as diferentes estações do ano, exceto para o inverno que apresentou o menor valor. Sendo o valor descrito por Bittencourt et al. (2007) semelhante ao valor encontrado para período compreendido fora da época reprodutiva no presente trabalho.

O compartimento tubular é diretamente responsável pela produção do gameta masculino (Clermont, 1972; Russell et al., 1993; França e Russell, 1998), sendo assim, o uso da morfometria tubular pode caracterizar quantitativamente a produção de

espermatozoides. Teodoro et al. (2012) identificaram uma queda na concentração de espermatozoides por ejaculado ($73,9 \times 10^6$ para $6,1 \times 10^6$), no volume do ejaculado (1,3ml para 0,4ml) e no percentual de células vivas no ejaculado (82% para 66%) em lobos-guará fora da época reprodutiva, neste sentido os dados apresentados no presente trabalho corroboram com a ideia de menor investimento produtivo de gametas fora da época reprodutiva em lobos-guará.

Para o peso testicular da espécie foi registrado, neste presente trabalho, um maior valor na época de acasalamento, correspondendo à estação climática do outono, valor semelhante ao descrito para o peso testicular médio anual por Bittencourt et al. (2007). Diferença no peso testicular entre as épocas reprodutivas e não reprodutivas foram também encontradas para outras espécies, como o cão guaxinim (*Nyctereutes procynoides*) (Qiang et al., 2003), o urso negro (*Ursus americanus*) (Tsubota et al., 1997), a raposa azul (*Alopex lagopus*) (Smith et al., 1985) e o veado vermelho (*Cervus elaphus*) (Reviere e Lincoln, 1978).

A mensuração dos parâmetros tubulares do testículo do lobo-guará demonstrou uma variação na proporção volumétrica e no volume de túbulo seminífero, sendo os valores para a época de acasalamento (outono) maiores em relação à época de nascimento dos filhotes (inverno) e da época não reprodutiva. Encontrou-se também uma proporção volumétrica de túbulo seminíferos no outono semelhante ao encontrado em estudo anterior da espermatogênese de lobo-guará, que indicou um valor médio anual de $79,33\% \pm 7,3$ (Bittencourt et al., 2007). O volume de tecido intertubular não apresentou variação significativa ao longo das estações climáticas, corroborando que o aumento do peso testicular registrado durante a época de acasalamento do lobo-guará é principalmente devido ao aumento no compartimento tubular do testículo, o que indica um maior investimento no tecido de produção de espermatozoides nesse período.

O diâmetro tubular apresentou forte correlação positiva com o peso testicular ($r=0,93$). Neste sentido, o diâmetro tubular registrado no outono apresentou-se maior em relação aos valores registrados no verão e no inverno, e semelhante ao observado na primavera. No outono foi identificado valores médios semelhantes aos encontrados como média anual por Bittencourt et al. (2007) ($227,35 \pm 53,30 \mu\text{m}$). O comportamento variável do diâmetro tubular também foi observado em várias espécies que apresentam sazonalidade reprodutiva, sendo seu valor sempre maior na época reprodutiva, como o cão guaxinim (*N. procynoides*) (Qiang et al., 2003), o urso negro (*U. americanus*) (Tsubota et al., 1997), o guaxinim (*Procyon lotor*) na América do Norte (Kaneko et al.,

2005), sendo que no Brasil variações no diâmetro do túbulo foram observadas no tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) por Torres et al. (1983). Nos animais domésticos, Santos et al. (2015) observaram que ovinos no Nordeste Brasileiro apresentaram maiores valores de diâmetro tubular no período chuvoso (verão), época onde foi observado maior produção espermática, em relação ao período seco (primavera).

Durante a época de nascimento dos filhotes (inverno) foi observada uma regressão do túbulo seminífero em alguns animais, onde se visualizava túbulos involuídos, que apresentavam apenas células de Sertoli e espermatogônias (Figura 2). Já durante a época de acasalamento (outono) os túbulos seminíferos em todos os animais apresentaram um epitélio produtivo (Figura 3). Variações semelhantes entre os epitélios dos túbulos ao longo do ano também foram observadas para o cão guaxinim (*N. procynoides*) (Qiang et al., 2003), o urso negro (*U. americanus*) (Tsubota et al., 1997) e a corça (*Capreolus capreolus*) (Blotther et al., 1996).

O comprimento total de túbulo seminífero do lobo-guará foi significativamente menor no período de inverno, acompanhando o comportamento observado para os demais parâmetros morfométricos do túbulo seminífero, como diâmetro tubular, volume tubular e o peso testicular. O comprimento tubular por grama de testículo não apresentou variação significativa ao longo das diferentes estações climáticas, corroborando que a redução do volume tubular é acompanhando pela redução do comprimento tubular, e consequente redução do parênquima produtivo de células gaméticas. Este comportamento está de acordo com o estudo de Teodoro et al. (2012) que identificaram uma redução na concentração de espermatozoides por ejaculado, no volume do ejaculado e no percentual de células vivas no ejaculado em lobos-guará fora da época reprodutiva, neste sentido, os dados apresentados no presente trabalho corroboram a ideia de menor investimento produtivo de gametas fora da época reprodutiva em lobos-guará. O mesmo parece ocorrer com outras espécies de canídeos, como foi observado por Minter e DeLiberto (2008) em trabalho com coiotes (*Canis latrans*) nos Estados Unidos.

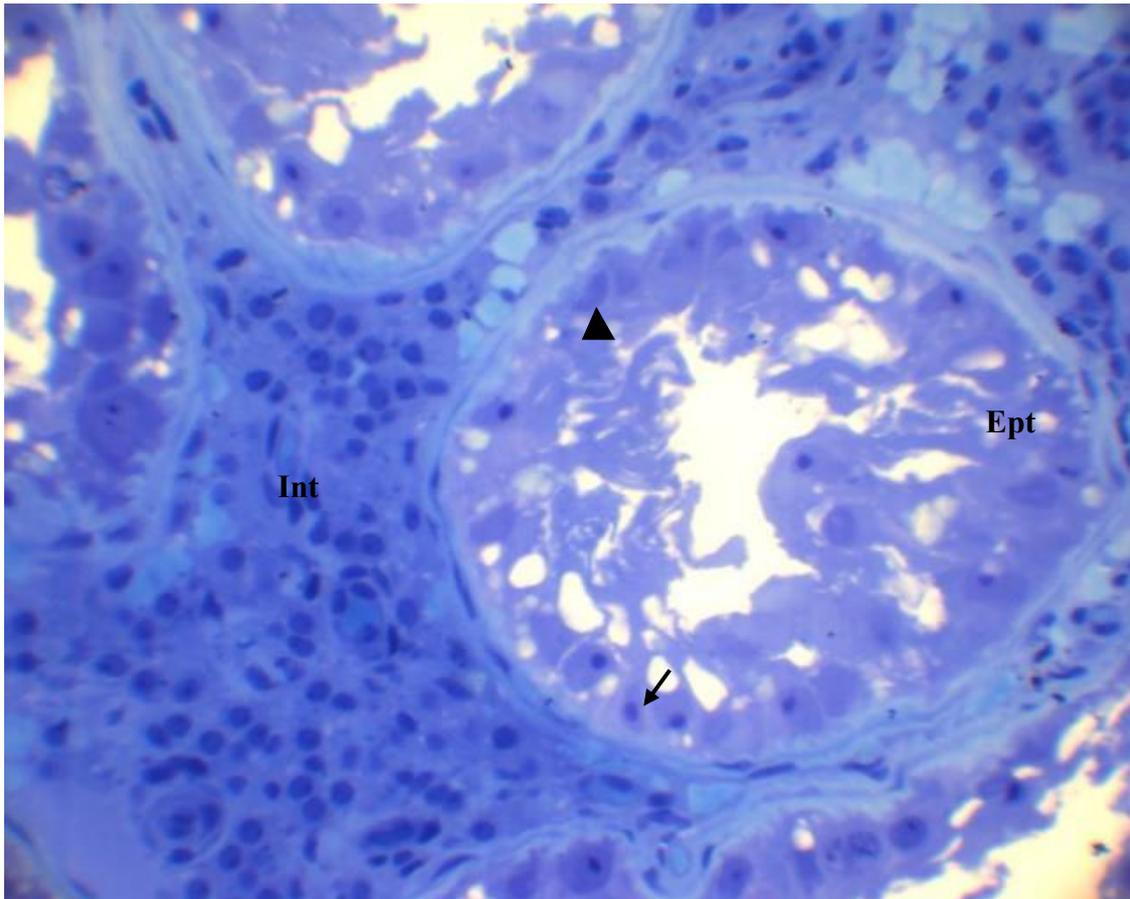


Figura 2: Túbulo seminífero de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em regressão durante a época de nascimento dos filhotes (inverno). Seta indica uma célula de Sertoli, e ponta da seta indica uma espermatogônia, Int. - Intertúbulo, Ept. - Epitélio tubular. Objetiva 40x.

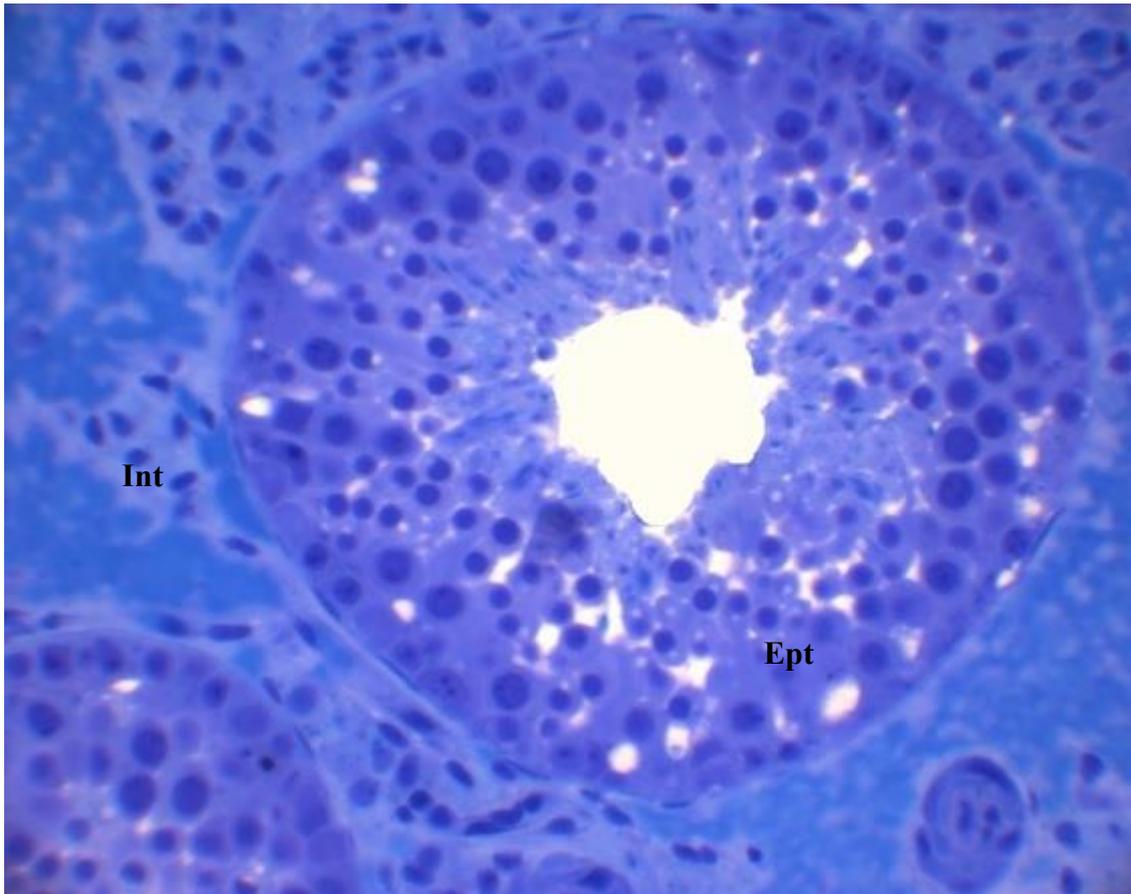


Figura 3: Túbulo seminífero de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) apresentando epitélio produtivo durante a época de acasalamento (outono), Int. - Intertúbulo, Ept. - Epitélio tubular. Objetiva 40x.

5. CONCLUSÃO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) apresenta características sazonais quanto ao peso testicular e constituintes tubulares do testículo ao longo das estações climáticas anuais na região da Zona da Mata Mineira. O peso testicular, o volume de túbulos seminíferos e o diâmetro dos túbulos seminíferos foram maiores na época de acasalamento da espécie, o que permite afirmar que, no contexto deste trabalho, o lobo-guará apresentou um maior investimento na produção de espermatozoides no outono, período correspondente à época de acasalamento, o que indica a ocorrência de uma sazonalidade reprodutiva.

6. REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, V.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; COSTA, D.S.; COSTA, E.P.; BENJAMIN, L.A. Biometria macro e microscópica dos componentes testiculares em lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. *Ceres*. 54, 329-340. 2007.
- BLOTTNER, S., HINGST, O., e MEYER, H.H. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 108(2), p. 299–305. 1996.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, n.1 (52), p.198-236. 1972.
- DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Smithsonian Contributions to Zoology*, n.392, p. 1–51. 1984.
- DIETZ, J. M. Grass roots of the maned wolf. *Natural History*, n. 96 (3), p. 52, 1987.
- EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; RAYMOND, M.M.; GRAWSHAW JR, P.G.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular and Ecology*, n. 10, p. 65-79. 2001.
- FONSECA, G.A.B., A.B. RYLANDS, C.M.R. COSTA, R.B.M. MACHADO E Y.L.R. LEITE. Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. (Ed) Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 459 p.1994.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. AND MARTINEZ-GARCIA. Male reproduction: A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219. 1998.
- KANEKO, K.; AKIYA, Y; SATO, H.; TANAKA, A.; AOKI, H.; MIYOSHI, M.; ABUKAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; KAWAKAMI, S. Seasonal influence on testicular function of male raccoons, *Procyon lotor*. *Journal of Reproduction and Development*. n. 51, p. 477-482, 2005.
- KARNOVSKY, M. J.A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy (abst.). *Journal of Cellular Biology* 27: 137-138. 1965.
- KLINK, C.A., AND MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, n. 19(3), p.707–713. 2005.

Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2016. Disponível <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6091-especie-6091> Acesso em: 21 julho. 2018.

LYON, F.; STEARNS, M.J. Behavior and social organization. In: FLETCHALL, N.B.; RODDEN, M.; TAYLOR, S. Husbandry manual for the Maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. 1995.

MINTER, L.J., AND DELIBERTO, T.J. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). *Theriogenology*, n. 69(8), p. 946–952. 2008.

MIRANDA, E.E. Natureza, conservação e cultura: ensaios sobre a relação do homem com a natureza no Brasil. São Paulo: Metalivros, 180p. 2003.

MUNSON, L.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; PACKER, C.; JANSSEN, D.; REIZISS, S.M.; WILDT, D.E. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*. n. 108, p. 11-15. 1996

O'BRIEN, M.K.; D.R. MCCULLOGH. Survival of black-tailed deer following relocation in Califórnia. *Journal of Wildlife Manage.* n. 49, p. 115-119. 1985.

PAQUET, P.C., AND ARLIN HACKMAN. Large carnivore conservation in the Rocky Mountains: a long-term strategy for maintaining free-ranging and self-sustaining populations of carnivores. *World Wildlife Fundation*. Canada, 1995.

QIANG, W., MURASE, T., e TSUBOTA, T. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in wild male raccoon dogs (*Nyctereutes procynoides*). *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, n. 65(10), p. 1087–1092. 2003.

REVIERS, M.T.H. AND LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 54, p. 209-213. 1978.

RUSSELL, L.D., GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell. *Cache River Press*, Clearwater, Florida, 801 p. 1993.

SANTOS, J.D.F., EUFRASIO, R.O., PINHEIRO, G.F.M., ALVES, F.R., CARVALHO, M.A.M., MACHADO JÚNIOR, A.A.N. Influência da estação do ano sobre a estrutura testicular em ovinos explorados no sul do Estado do Piauí. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n. 35(11), p. 933–939. 2015

SMITH, A.J., MONDAIN MONVAL, M., MOLLER, O.M. Seasonal variations of LH, prolactin, androstenedione, testosterone and testicular FSH binding in the male blue fox (*Alopex lagopus*). Journal of Reproduction and Fertility, n. 74, p.449-458. 1985.

TEODORO, L.O.; MELO-JUNIOR, A.A.; SPERCOSKI, K.M.; MORAIS, R.N.; SOUZA, F.F. Seasonal Aspects of Reproductive Physiology in Captive Male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815). Reproduction in Domestic Animal, n. 47 (Suppl. 6), p. 250–255. 2012.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 July 2018 - valid from 4 October 2017

TORRES, C.N., GODINHO, H.P., e MACHADO, A.B.M. Seasonal variation in spermatogenesis in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) from Southeastern Brazil. Animal Reproduction Science. n. 2 (6), p. 135-141, 1983.

TSUBOTA, T., HOWELL-SKALLA, L., NITTA, H., OSAWA, Y., MASON, J.I., MEIERS, P.G. BAHR, J.M. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. Journal of Reproduction and Fertility, n. 109, p. 21–27. 1997.

VIEIRA, E.M. Highway mortality of mammals in central Brazil. Journal Brazilian Associat, v.48, p.270-272, 1996.

WILDT, D.E., BUSH, M., GOODROWE, K.L., PACKER, C., PUSEY, A.E., BROWN, J.L., JOSLIN, P., O'BRIEN, S. J. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion population. Nature. v. 329, p. 328-331. 1987.

WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology, or, how to make an endangered species embryo. Theriogenology, n. 2 (37), p. 161-184, 1992.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DA CÉLULA DE LEYDIG DO TESTÍCULO DE LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*) NAS DIFERENTES ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DO ANO

RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é classificado como vulnerável a extinção de acordo com a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Sua época reprodutiva está compreendida entre os meses de abril e junho, sua gestação dura entre 63 e 67 dias e o nascimento dos filhotes ocorre entre junho e setembro. Em animais de regiões neotropicais a sazonalidade não havia sido descrita até recentemente, quando diferenças significativas na produção de espermatozoides ao longo do ano em lobos-guará foram registradas. Neste sentido, o estudo quantitativo dos componentes testiculares ao longo das estações climáticas torna-se essencial para o entendimento desse processo nessa espécie. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica da célula de Leydig do testicular do lobo-guará ao longo do ano. Foram avaliadas amostras testiculares de quatro indivíduos de lobos-guará para cada uma das diferentes estações climáticas do ano, estas amostras foram obtidas no acervo do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), Viçosa, Minas Gerais. O volume testicular foi obtido através do cálculo do volume do elipsoide, e posteriormente foram confeccionadas lâminas histológicas para obtenção e avaliação dos seguintes parâmetros: percentuais volumétricos de túbulo seminífero, tecido intertubular, citoplasma e núcleo de célula de Leydig, volumes de túbulo seminífero e tecido intertubular, diâmetro de núcleo e número de células de Leydig. O peso do testículo ($6,03 \pm 0,3g$), a proporção ($40,00 \pm 3,34\%$) e o volume ($1,57 \pm 0,38ml$) de intertúbulo foi maior no inverno, época de nascimento dos filhotes, o mesmo ocorre para o número de célula de Leydig totais ($9,44 \times 10^8 \pm 1,72 \times 10^8$), sendo o diâmetro e o volume do núcleo da célula o único componente que não teve variação ao longo do ano. Alguns fatores, podem influenciar na produção de testosterona pela célula de Leydig, entre eles está a concentração de suas organelas e principalmente de receptores na superfície da membrana plasmática da célula, sendo necessário a realização de estudos que possam avaliar a variação da densidade destes receptores na superfície da membrana plasmática das células de Leydig.

Palavras-chave: Canídeo; Reprodução; Células de Leydig; Sazonalidade.

MORPHFUNCTIONAL EVALUATION OF THE LEYDIG CELL OF THE MANED WOLF (*Chrysocyon brachyurus*) TESTICLE IN THE DIFFERENT CLIMATE SEASONS OF THE YEAR

ABSTRACT

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) is classified as vulnerable to extinction according to the National List Species of Brazilian Fauna Threatened of Extinction. Their reproductive season is comprised between April and June, their gestation lasts between 63 and 67 days and the birth of the puppies takes place between June and September. In animals from Neotropical regions seasonality had not been described until recently, when significant differences in sperm production throughout the year in maned wolves were recorded. In this sense, the quantitative study of the testicular components throughout the climatic seasons becomes essential for the understanding of this process in this species. Therefore, the objective of this work was to evaluate the dynamics of the Leydig cell of the testicular lobe of the maned wolf throughout the year. Testicular samples of four individuals of maned wolves were evaluated for each of the different climatic seasons of the year. These samples were obtained from the Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), Viçosa, Minas Gerais. The testicular volume was obtained by calculating the volume of the ellipsoid, and later histological slides were prepared to obtain and evaluate the following parameters: volumetric percentages of seminiferous tubule, intertubular tissue, cytoplasm and Leydig cell nucleus, seminiferous tubule volumes and tissue intertubular, core diameter and number of Leydig cells. The weight of the testis (6.03 ± 0.3 g), the proportion ($40.00 \pm 3.34\%$) and the volume (1.57 ± 0.38 ml) of intertubule was higher in winter, , the same occurs for the total Leydig cell number ($9.44 \times 10^8 \pm 1.72 \times 10^8$), the diameter and volume of the cell nucleus being the only component that did not change throughout the year. Some factors can influence the production of testosterone by the Leydig cell among them is the concentration of its organelles and mainly of receptors on the surface of the plasma membrane of the cell, being necessary to carry out studies that can evaluate the variation of the density of these receptors in the surface of the Leydig cell plasma membrane.

Keywords: Canid; Reproduction; Leydig cells; Seasonality.

1. INTRODUÇÃO

A distribuição e abundância dos grandes carnívoros reduziram drasticamente com o decorrer da ocupação humana (Paquet e Hackman, 1995). A conservação das espécies está intrinsecamente ligada à manutenção da variabilidade genética, pois quando uma população é isolada geograficamente e fica sujeita à uniformidade genética vários fatores se somam para desencadear o processo de extinção. Entre estes fatores estão a diminuição da fertilidade, maior susceptibilidade a doenças, o aumento de anormalidades espermiáticas e o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, afetando a espermatogênese, ovulação, morbidade e mortalidade perinatal (O'Brien e MCCulloch, 1985; Wildt et al., 1987; Wildt et al., 1992; Munson et al., 1996; Eizirik et al., 2001).

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) representa a maior espécie de canídeo na América do Sul (Dietz, 1984). Esta espécie está listada no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e da Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção (CITES) (Cites-Listed Species, 2017), além de constar na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (2016) como vulnerável. Entre as principais causas do declínio de sua população estão a redução e fragmentação drástica do seu ambiente, queimadas repetitivas de pastagens, atropelamentos em rodovias, redução da população de suas presas naturais e a forte pressão de caça (Dietz, 1987; Fonseca et al., 1994; Vieira, 1996; Klink e Machado, 2005).

Os lobos-guarás são animais monogâmicos facultativos na maior parte da vida (Miranda, 2003). Sua época de acasalamento corresponde, no Brasil, à estação climática do outono, compreendida entre os meses de abril e junho. O nascimento dos filhotes é na estação climática do inverno que são os meses de julho, agosto e setembro. Já as estações climáticas da primavera (outubro a dezembro) e do verão (janeiro a março) correspondem ao período fora da época reprodutiva (Lyon e Stearns, 1995).

Teodoro et al. (2012) identificaram, nessa espécie, uma diminuição do volume ejaculado na época não reprodutiva, a concentração de espermatozoide e o número de espermatozoides vivos no ejaculado também seguiram esse padrão na época não reprodutiva, indicando que os machos da espécie possuem uma sazonalidade em sua produção de espermatozoides ao longo do ano.

Para o funcionamento regular do testículo a secreção das células de Leydig são essenciais, a testosterona é parte importante no funcionamento e manutenção normal das células germinativas (Sharpe et al., 1994), e sua produção pode variar ao longo do ano de

forma sazonal (Fuentes et al., 1993; Hhombach-Klonisch et al., 2004; Maia et al., 2008). O esclarecimento dos parâmetros básicos da reprodução do lobo-guará e de suas variações sazonais são essenciais para se melhorar as técnicas de reprodução assistida desta espécie e outras em processo de extinção. Sendo assim, o objetivo deste trabalho avaliar a dinâmica da célula de Leydig do testicular do lobo-guará ao longo do ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e animais de estudo

O projeto foi autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) com número 55154-1, e registro na Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) com o número 70/2016.

Foram utilizadas amostras testiculares de 16 lobos-guará adultos (*Chrysocyon brachyurus*) da região de Viçosa, Minas Gerais, que foram casuisticamente encaminhados e que vieram a óbito no Centro de Tiragem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV) durante seu período de atividades (2000 – 2011).

Os animais que eram mantidos pelo CETAS-UFV e que vieram a óbito eram necropsiados, e durante o exame tanatológico vários dados, como as medidas dos animais, eram registrados e amostras, como por exemplo fragmentos de órgãos, eram coletados e mantidos em acervos para exames e pesquisas futuras, como é o caso dos testículos de lobos-guará usados neste estudo.

2.2. Análises microscópicas e morfométricas

Os dados biométricos dos animais e mensurações dos testículos foram obtidos a partir das fichas de registro e necropsopia. Utilizou-se fragmentos testiculares de quatro indivíduos por estação climática, totalizando 16 amostras do acervo do CETAS-UFV. O material coletado foi fixado em solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (Karnovsky, 1965), e conservados em álcool 70% até o momento da inclusão.

As amostras foram submetidas a banhos crescentes de álcoois para desidratação, posteriormente infiltradas e incluídas em resina de glicol metacrilato. Foram obtidos

cortes com 3 μm de espessura, em intervalo de 15 μm , para montagem de lâminas histológicas, e estas foram coradas com solução de azul de toluidina / borato de sódio 1%.

O peso do testículo foi obtido através do cálculo do volume do elipsoide ($4/3\pi ABC$, onde A = metade da largura, B = metade da espessura e C = metade do comprimento) subtraídos da prega dupla de pele. Para as análises histológica do parênquima testicular foram capturadas imagens digitais em fotomicroscópio de luz (Motic BA410) equipado com câmera digital Moticom Pro 252B. Para o cálculo da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foram fotografados 10 campos aleatórios para cada uma das 16 amostras coletadas, em aumento de 200 vezes. Em cada imagem foi sobreposta uma graticula com 500 intersecções, totalizando 5000 pontos por amostra, onde foram computados os pontos sobre túbulo seminífero, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, citoplasma e núcleo de Leydig. Com os valores das proporções volumétricas do parênquima testicular e do peso do testículo foi calculado o volume da porção tubular e intertubular do testículo.

Para estimar as dimensões volumétricas da célula de Leydig foram realizadas as mensurações do diâmetro do núcleo de dez células de Leydig por animal, a partir deste foi calculado o volume nuclear utilizando-se a fórmula $4/3\pi r^3$, onde r é o raio nuclear médio obtido. Através do cálculo da proporção volumétrica dos componentes do tecido intertubular foi calculada a relação entre o núcleo e o citoplasma das células de Leydig, correlacionado ainda a proporção volumétrica de uma célula de Leydig com o volume do núcleo encontrou-se o volume de uma única célula de Leydig. Dividindo a proporção volumétrica total de células de Leydig pelo volume de uma célula foi possível determinar o número total de células de Leydig.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho o peso do testículo do lobo-guará apresentou-se maior na época de acasalamento (outono); e o volume da porção tubular também foi maior nesta época, enquanto o volume da porção intertubular não sofreu alterações entre as estações climáticas do ano. Um maior valor para o peso testicular na época reprodutiva também foi descrito para o cão guaxinim (*Nyctereutes procynoides*) (Qiang et al., 2003) e raposa azul (*Alopex lagopus*) (Smith et al., 1985). Enquanto que, ao contrário do encontro para lobo-guará no presente trabalho, foi descrito em veado-vermelho (Reviere et al., 1978;

Schön et al, 2004) um menor volume da porção intertubular foi descrito para sua época reprodutiva.

O percentual volumétrico da porção intertubular do testículo, neste trabalho, apresentou maior valor na época de nascimento dos filhotes (inverno) em relação aos valores observados no verão e na época de acasalamento (outono). Os valores para o peso corporal e testicular, proporção volumétrica e volume de túbulo seminífero e de tecido intertubular no parênquima testicular de lobos-guará estão descritos na tabela 1

Tabela 1: Peso corporal e testicular, proporção volumétrica e volume de túbulo seminífero e de tecido intertubular no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata mineira.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Peso corporal (kg)	24,88±0,48 ^a (1,9)	24,75± 0,29 ^a (1,2)	24,38± 0,75 ^a (3,1)	24,50± 0,41 ^a (1,7)
Peso testicular (g)	4,76±1,71 ^{ab} (35,9)	5,2±0,26 ^b (5,0)	6,03±0,30 ^a (5,0)	3,98±1,20 ^b (25,1)
Proporção volumétrica túbulo seminífero (%)	66,29±9,44 ^{ab} (14,2)	78,49±7,07 ^a (9,0)	75,95±5,96 ^a (7,9)	60,00±3,34 ^b (5,7)
Volume de túbulo seminífero (ml)	3,27±1,55 ^{ab} (47,4)	4,08±0,38 ^a (9,3)	4,58±0,47 ^a (10,3)	2,41±0,83 ^b (34,4)
Proporção volumétrica intertúbulo (%)	33,71±9,44 ^{ab} (28,0)	21,51±7,07 ^a (32,7)	24,06±5,96 ^a (24,8)	40,00±3,34 ^b (8,4)
Volume de intertúbulo (ml)	1,49±0,30 ^a (20,1)	1,12±0,37 ^a (33,0)	1,45±0,36 ^a (24,8)	1,57±0,38 ^a (24,2)

Valores: média ± desvio padrão. a, b: letras diferentes são diferenças significativa com $p < 0,05$ para intervalo de confiança. Entre parênteses coeficiente de variação.

Neste trabalho a proporção volumétrica e o volume calculado do citoplasma das células de Leydig foram maiores na época de nascimento dos filhotes (inverno) e menores

na época de acasalamento (outono), sendo o contrário do que foi descrito por Johnson e Thompson (1987) em garanhões que tiveram um volume de citoplasma de células de Leydig maior na época reprodutiva.

Os parâmetros proporção volumétrica total de núcleo da célula de Leydig, proporção volumétrica total da célula de Leydig, volume total de núcleos de célula de Leydig e o volume total de células de Leydig no parênquima testicular, foram maiores na época de nascimento dos filhotes (inverno) e menores na época de acasalamento (outono). Torres et al. (1983) descreveram uma proporção maior de células de Leydig no verão (época de reprodução) para o tatu (*Dasyurus novemcinctus*).

Os valores das proporções volumétricas total de citoplasma de célula de Leydig, proporções volumétricas total núcleo de célula de Leydig e proporções volumétricas total de célula de Leydig, e os seus respectivos volumes, estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Proporção volumétrica de citoplasma de célula de Leydig, núcleo de célula de Leydig e célula de Leydig, e os seus respectivos volumes, no parênquima testicular de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata mineira.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Citoplasma células de Leydig (%)	3,53±1,18 ^a (33,4)	11,88±5,01 ^b (42,2)	1,78±0,22 ^a (12,4)	21,58±5,19 ^b (24,1)
Volume citoplasma de células de Leydig (ml)	0,16±0,07 ^a (43,8)	0,62±0,26 ^b (41,9)	0,11±0,02 ^a (18,2)	0,88±0,39 ^b (44,3)
Núcleo células de Leydig (%)	1,2±0,38 ^{bc} (31,7)	1,97±0,87 ^c (44,2)	0,74±0,12 ^b (16,2)	4,19±0,49 ^a (11,7)
Volume núcleo de células de Leydig (ml)	0,06±0,03 ^{bc} (50,0)	0,1±0,05 ^{ba} (50,0)	0,04±0,01 ^c (25,0)	0,17±0,06 ^a (35,3)
Células de Leydig no parênquima testicular (%)	4,73±1,43 ^a (30,2)	13,84±5,83 ^b (38,9)	2,51±0,31 ^c (12,4)	25,76±5,68 ^d (22,0)
Volume de células de Leydig (ml)	0,22±0,1 ^a (45,5)	0,72±0,3 ^b (41,7)	0,15±0,02 ^a (13,3)	1,05±0,42 ^b (40,0)

Valores: Média ± desvio padrão. a, b, c, d: letras diferentes são diferenças significativa com $p < 0,05$ para intervalo de confiança. Entre parênteses coeficiente de variação.

No presente trabalho o volume médio do núcleo de uma célula de Leydig e o diâmetro nuclear médio de uma célula Leydig não apresentaram alterações entre as quatro estações climáticas do ano. Já o volume de uma célula de Leydig foi maior na época de nascimento dos filhotes (inverno). Gorman (1976) também não descreve variações no diâmetro do núcleo de célula de Leydig ao longo do ano para o mangusto-de-java (*Herpestes javanicus*).

Foi identificado no presente estudo um maior número de células de Leydig na época de nascimento dos filhotes de lobo-guará (inverno), sendo a época de acasalamento (outono) o período com menor número de células de Leydig. Em outras espécies, como

damão-do-cabo (*Procapra capra*), um número de células de Leydig maior durante a época reprodutiva foi descrito em comparação a época não reprodutiva (Neaves, 1973).

Os valores para o volume de uma célula de Leydig, diâmetro médio do núcleo de célula de Leydig, número total de células de Leydig e número de células de Leydig por grama de testículo de lobo-guará estão descritos na tabela 3. Embora o volume do núcleo de uma célula de Leydig não tenha sofrido alteração entre as estações do ano, o volume de citoplasma de uma célula de Leydig, ou seja, a relação núcleo-citoplasma, é significativamente menor na época de acasalamento (outono) do que na época de nascimento dos filhotes (inverno).

Maia et al. (2008) descreveram variações na concentração sérica de testosterona entre a época de acasalamento (outono) ($2184,7 \pm 355,1$ pg/ml), que apresentou um maior valor, e as outras estações do ano para o lobo-guará. Durante a época de nascimento dos filhotes (inverno), Melo et al. (2009) observaram que machos dessa espécie dispõem parte do seu tempo no ninho ou próximo dele, sendo que machos lobo-guará já foram também observados levando alimento para próximo dos filhotes no Criadouro Conservacionista da CBMM em Araxá (Paula, T.A.R. obs. pessoal).

O número total de receptores de LH e a concentração destes receptores por célula de Leydig pode se alterar durante o ano, como descrito para carneiros (Barenton e Pelletier, 1983) e vizcachas (Fuentes et al., 1993). Hhombach-Klonisch et al. (2004), utilizando a corça (*Capreolus capreolus*) como modelo de sazonalidade reprodutiva, descreveram uma variação em hormônios peptídeos importantes para a produção de testosterona durante as estações do ano, identificando um aumento antes da época reprodutiva e atingindo maior concentração no curto período de acasalamento desta espécie.

Tabela 3: Volume de uma célula, diâmetro médio do núcleo, número total e número por grama de testículo de células de Leydig em de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) nas diferentes estações climáticas do ano na Zona da Mata mineira.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Volume médio de núcleo (μm^3)	182,85±55,18 ^a (30,2)	222,46±49,05 ^a (22,1)	161,75±14,03 ^a (8,7)	200,6±82,07 ^a (40,9)
Volume de uma célula (μm^3)	753,87±246,38 ^b (32,7)	1694,49±371,68 ^a (21,9)	680,46±89,09 ^b (13,1)	1436,07±880,53 ^{a,b} (61,3)
Relação núcleo : citoplasma	1 : 3,36 ^a	1 : 6,60 ^b	1 : 3,35 ^a	1 : 5,72 ^b
Diâmetro de núcleo (μm)	6,95±0,76 ^a (10,9)	7,31±0,48 ^a (6,6)	6,7±0,19 ^a (2,8)	7,09±0,94 ^a (13,3)
Número de células total	3,1x10 ⁸ ±8,21x10 ⁷ ^{a,c} (26,5)	5,63x10 ⁸ ±1,87x10 ⁸ ^c (33,3)	2,77x10 ⁸ ±3,29x10 ⁷ ^a (11,8)	9,44x10 ⁸ ±1,72x10 ⁸ ^b (18,3)
Número de células por grama de testículo	7,06x10 ⁷ ±2,47x10 ⁷ ^{a,c} (35,0)	1,08x10 ⁸ ±3,55x10 ⁷ ^c (32,9)	4,6x10 ⁷ ±6,82x10 ⁶ ^a (14,8)	2,5x10 ⁸ ±6,53x10 ⁷ ^b (26,2)

Valores: Média ± desvio padrão. a, b, c: letras diferentes são diferenças significativa com $p < 0,05$ para intervalo de confiança. Entre parênteses coeficiente de variação.

4. CONCLUSÃO

Há uma variação sazonal nos valores volumétricos e numéricos das células de Leydig em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) ao longo do ano na região de estudo. Estas variações possivelmente estão relacionadas a uma modificação da eficiência de produção hormonal entre as épocas de acasalamento e nascimento dos filhotes, em resposta a adaptações comportamentais.

5. REFERÊNCIAS

BARENTON, B., AND PELLETIER, J. Seasonal changes in testicular gonadotropin receptors and steroid content in the ram. *Endocrinology*, n. 112(4), p. 1441–1446. 1983.

DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Smithsonian Contributions to Zoology*, n.392, 1–51. 1984.

DIETZ, J.M. Grass roots of the maned wolf. *Natural History*, n. 96 (3), p. 52, 1987.

EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; RAYMOND, M.M.; GRAWSHAW JR, P.G.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular and Ecology*, n. 10, p. 65-79. 2001.

FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; COSTA, C.M.R.; MACHADO R.B.M.; LEITE, Y.L.R. Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. (Ed) Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 459 p.1994.

FUENTES, L.B.; CALVO, J.C.; CHARREAU, E.H.; GUZMÁN. J.A. Seasonal Variations in Testicular LH, FSH, and PRL Receptors; in Vitro Testosterone Production; and Serum Testosterone Concentration in Adult Male Vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). *General and Comparative Endocrinology*. n. 2 (90), p. 133-141. 1993.

GORMAN, M.L. Seasonal changes in the reproductive pattern of feral *Herpestes auropunctatus* (Carnivora: Viverridae), in the Fijian Islands. *Journal of zoology*, n. 178, p. 237-246. 1976

HOMBACH-KLONISCH, S.; SCHÖ, J.; KEHLEN, A.; BLOTTNER, S.; KLONISCH, T. Seasonal Expression of INSL3 and Lgr8/Insl3 Receptor Transcripts Indicates Variable Differentiation of Leydig Cells in the Roe Deer Testis. *Biology of Reproduction*, n. 71, p. 1079–1087. 2004.

KARMIOVSKY, M. J.A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy (abst.). *Journal of Cellular Biology*, n. 27, p. 137-138. 1965

KLINK, C.A., AND MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, n. 19(3), p. 707–713. 2005.

Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2016. Disponível <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6091-especie-6091> Acesso em: 21 julho. 2018.

LYON, F.; STEARNS, M.J. Behavior and social organization. In: FLETCHALL, N.B.; RODDEN, M.; TAYLOR, S. Husbandry manual for the Maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. 1995.

MINTER, L.J., AND DELIBERTO, T.J. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). *Theriogenology*, n. 69(8), p. 946–952. 2008.

MIRANDA, E.E. Natureza, conservação e cultura: ensaios sobre a relação do homem com a natureza no Brasil. São Paulo: Metalivros, 180p. 2003.

MUNSON, L.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; PACKER, C.; JANSSEN, D.; REIZISS, S.M.; WILDT, D.E. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Journal of Reproduction and Fertility*. n. 108, p. 11-15. 1996

NEAVES, B. Changes in Testicular Levels Among Leydig Seasonally and in Plasma Rock Testosterone Hyrax. *Biology of Reproduction*, n. 8(4), p. 451–466. 1973.

O'BRIEN, M.K.; D.R. MCCULLOGH. Survival of black-tailed deer following relocation in Califórnia. *Journal of Wildlife Manage*, n. 49, p. 115-119. 1985.

PAQUET, PAUL C., AND ARLIN HACKMAN. Large carnivore conservation in the Rocky Mountains: a long-term strategy for maintaining free-ranging and self-sustaining populations of carnivores. *World Wildlife Fundation*. Canada, 1995.

QIANG, W.; MURASE, T.; TSUBOTA, T. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in wild male raccoon dogs (*Nyctereutes procynoides*). *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, n. 65(10), p. 1087–1092. 2003.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E. e NEIL, J. D. *The physiology of reproduction*, 2a ed. New York. Raven Press, 1363-1434. 1994.

SMITH, A.J.; MONDAIN MONVAL, M.; MOLLER, O. M. Seasonal variations of LH, prolactin, androstenedione, testosterone and testicular FSH binding in the male blue fox (*Alopex lagopus*). Journal of Reproduction and Fertility, n. 74, p.449-458. 1985.

TEODORO, L.O.; MELO-JUNIOR, A.A.; SPERCOSKI, K.M.; MORAIS, R.N.; SOUZA, F.F. Seasonal Aspects of Reproductive Physiology in Captive Male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815). Reproduction in Domestic Animal, n. 47 (Suppl. 6), p. 250–255. 2012.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 21 July 2018 - valid from 4 October 2017

TORRES, C.N.; GODINHO, H.P.; MACHADO, A.B.M. Seasonal variation in spermatogenesis in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) from Southeastern Brazil. Animal Reproduction Science, n. 2 (6), p. 135-141. 1983.

VIEIRA, E.M. Highway mortality of mammals in central Brazil. Journal Brazilian Associat. v. 48, p.270-272, 1996.

WILDT, D.E., BUSH, M., GOODROWE, K.L., PACKER, C., PUSEY, A.E., BROWN, J.L., JOSLIN, P., O'BRIEN, S. J. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion population. Nature. v. 329, p. 328-331. 1987.

WILDT, D. E.; MONFORT, S. L.; DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology , or, how to make an endangered species embryo. Theriogenology, Denver, v. 37, n. 2, p. 161-184, 1992.