

VIVIANE LEWICKI BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DO
PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DO LOBO GUARÁ
(*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) ADULTO.**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B624a
2003
Bittencourt, Viviane Lewicki, 1975-
Avaliação morfofuncional do testículo e do processo
espermatogênico do Lobo Guará (*Chrysocyon brachyurus*,
Illiger, 1811) adulto / Viviane Lewicki Bittencourt. –
Viçosa : UFV, 2003.
56 p. :

Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa

1. *Chrysocyon brachyurus* - Reprodução. 2. *Chrysocyon
brachyurus* - Espermatogênese. 3. Lobo Guará –
Reprodução. 4. Canídeos. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 19. ed. 636.088

CDD 20. ed. 636.088

VIVIANE LEWICKI BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DO
PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DO LOBO GUARÁ
(*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) ADULTO.**

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

APROVADA: 14 de abril de 2003

Prof. Cláudio César Fonseca
(Conselheiro)

Prof. Antônio Carlos Santana e Castro

Prof. Sérgio Luiz Pinto da Matta

Prof. Deiler Sampaio Costa

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

Os bons acontecimentos em nossas vidas, muitas das vezes, procedem a situações confusas, complicadas e estressantes. São poucas as pessoas que seguram nossas mãos nestes momentos difíceis. Uma forma de reconhecimento e agradecimento pela ajuda, força, companheirismo e amizade é dedicar este trabalho a todos que sempre estiveram presentes, nos bons e maus momentos (e agora ótimos).

Quero dedicar, também, aos meus pais e minha irmã, ao meu orientador e aos animais que, de alguma forma, contribuíram com um pedacinho deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Stela e Álvaro, e minha irmã Giselle por terem me ajudado a chegar até aqui e por acreditarem no meu futuro.

Ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e confiança.

À CAPES, instituição financiadora, pelo auxílio financeiro, mesmo que tardio.

Ao meu orientador, Tarcizio Antonio Rego de Paula, pelos ensinamentos, pela oportunidade, pela confiança e respeito

Aos professores Marco Túlio, Cláudio e Sérgio pela ajuda e amizade.

Ao meu amigo Prof. Tarcízio e sua família Regina, Rebeca, Tarcizinho, Dindim, Juju, Creusa, Teobaldo e Mustache pelo carinho, pela amizade e pela força, que praticamente me acolheram como um membro da família. Não existem palavras e nem espaço para tudo que gostaria de agradecer e elogiar.

À Cida pelos deliciosos almoços. Teve bom!

Ao Luciano e Nilza, companheiros de trabalho no setor, pela ajuda, diversão, cumplicidade e quebra-galhos. Não esquecendo de todos os estagiários e monitores que me acompanharam na alegria e mau humor. Valeu galera!

À Rose e Luziana por sempre correrem atrás de nós para que tudo fique perfeito. Em especial a Rose por nos ajudar a resolver algum problema e romper algumas barreiras, além do incentivo, do sorriso e da frase acolhedora “Sem problema!”. Parabéns pelo excelente trabalho.

Aos professores do Departamento de Veterinária pela orientação e ajuda sempre que precisei.

À super Maninha que, mesmo apertada de trabalho, arranja um tempinho para pegar qualquer material que precisamos e trocar algumas palavras de carinho.

Aos funcionários da esterilização (Didi, Divina e Sônia), da clínica e cirurgia de grandes (Celinho, Luis Paulo e Cláudio), da clínica e cirurgia de pequenos (Camilo, Cláudio, Paulo e Toninho), da Patologia (Cláudio e Adão), da limpeza (D. Izabel e S. Nicole), da preventiva (S. Lulu, S. Ademir e Dagoberto), do laboratório clínico (Lucinda e Luis Márcio), da secretaria (Geraldinho, Cléia e Heloísa), S. João e S. Ponte por sempre me considerarem um membro da equipe.

Às minhas grandes amigas e irmãs Waneska, Lenise e Dri que sempre estiveram ao meu lado, seja chamando a atenção ou acolhendo, que ajudaram a enfrentar as dificuldades, as alegrias, as dores, as verdades e muito mais. Que Deus não tire essa amizade! Amo todas vocês

À Ana Paula e Rodolfo pelas conversas bastantes proveitosas e pelo aconchego da casa.

À Waleska e Etelvina que, além da amizade, me deram a oportunidade de ser uma profissional. E, claro, também ao Gabriel, que acompanhou tudo bem de perto.

Aos meus colegas de turma de mestrado Marilú, Juliana, Luis Gustavo, Daniel, Richard, Shirley e Mario pelo companherismo e união durante este tempo.

À Alene, companheira de casa, pelo incentivo, pela força e por ter entendido os momentos de estress.

À alguém que me possibilitou descobrir alguns sentimentos e que minha capacidade é muito maior do que pensava.

BIOGRAFIA

VIVIANE LEWICKI BITTENCOURT, filha de Stela Maria Lewicki Bittencourt e Álvaro César Mattos Bittencourt, graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, em 1999. Ainda em 1999, especializou-se em clínica e cirurgia de pequenos animais na mesma instituição, no curso de pós-graduação *lactu sensu*. No ano de 2001, retornou à mesma instituição para realizar o curso de mestrado do programa de Pós-graduação do Departamento de Medicina Veterinária, área de concentração em Morfologia.

CONTEÚDO

	Página
1.0-INTRODUÇÃO	1
1.1- Os Testículos	1
1.1.1- O compartimento intertubular e as células de Leydig	3
1.1.2- O compartimento tubular e as células de sustentação	4
1.2- A biópsia testicular	6
1.3- O lobo guará	7
1.3.1- Biologia	8
1.3.2- Hábitos alimentares	8
1.3.3- Organização social	9
1.3.4- Reprodução	10
2.0- OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	10
3.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
4.0-BIOMETRIA MACRO E MICROSCÓPICAS DOS COMPONENTES TESTICULARES EM LOBO GUARÁ (<i>Chrysocyon brachyurus</i>, Illiger, 1811) ADULTO	15
Resumo	15
4.1) Introdução	16
4.2) Material e Métodos	17
4.3) Resultados e Discussão	19
4.4) Referências Bibliográficas	24
5.0- A POPULAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E ÍNDICES INDICATIVOS DA PRODUÇÃO ESPERMÁTICA EM LOBO GUARÁ (<i>Chrysocyon brachyurus</i>, Illiger, 1811) ADULTO	27
Resumo	27
5.1) Introdução	28
5.2) Material e Métodos	29
5.3) Resultados e Discussão	31
5.4) Referências Bibliográficas	36

6.0- O CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA EM LOBO GUARÁ (<i>Chrysocyon brachyurus</i>, Illiger, 1811) ADULTO	40
Resumo	40
6.1) Introdução	41
6.2) Material e Métodos	42
6.3) Resultados e Discussão	44
6.4) Referências Bibliográficas	52
7.0- CONCLUSÕES GERAIS	57

RESUMO

BITTENCOURT, Viviane Lewicki, M.S.; Universidade Federal de Viçosa; abril de 2003; **Avaliação Morfofuncional do Testículo e do Processo Espermatogênico do Lobo-guará** (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) Adulto. Orientador: Tarcízio A. Rego de Paula. Conselheiros: Cláudio César Fonseca e Eduardo Paulino da Costa.

O estudo do processo espermatogênico torna-se extremamente relevante, subsidiando informações básicas para o desenvolvimento de tecnologias em reprodução assistida. O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é o maior canídeo das Américas, mas está entre as espécies ameaçadas de extinção segundo o IBAMA. Pouco se sabe a respeito de sua morfofisiologia testicular, incluindo a sua espermatogênese. Foram estudados no presente experimento quatro lobos-guarás adultos provenientes de cativeiro. Estimou-se que cerca de 0,04% da massa corporal é alocada em testículo, o índice gonadossomático e, cerca de 0,03% da massa corporal alocada em túbulos seminíferos, o índice tubulossomático. O rendimento meiótico foi em torno de 1,9 células, o que equivale a uma perda de 53% do processo meiótico e o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,6 células. Cada célula de Sertoli é capaz de sustentar cerca de 7,6 espermátides arredondadas. A duração total do ciclo do epitélio seminífero desta espécie foi calculada em 8,99 dias e, como aproximadamente 4,5 ciclos são necessários para o processo espermatogênico, então 40,45 dias são consumidos na produção de espermatozóides, a partir de uma espermatogônia do tipo A. O lobo-guará produz aproximadamente vinte e nove milhões de espermatozóides por grama de testículo por dia, sendo classificado entre as espécies de alta eficiência espermatogênica.

ABSTRACT

BITTENCOURT, Viviane Lewicki, M.S.; Universidade Federal de Viçosa; April 2003; **Morfofuncional Evaluation of the Testis and the Espermatogenic Process in Adult Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811)**. Adviser: Tarcízio A. Rego de Paula. Committee members: Cláudio César Fonseca e Eduardo Paulino da Costa.

The study of spermatogenic process is extremely important, subsiding with basic information the development and sedimentation of technologies in attended reproduction. Although the maned wolf is the biggest dog of Americas, much little are know regarding its testicular morfofisiology, including spermatogenesis. In this study it was stimated that in the maned wolf about 12,0 primary spermatocytes are produced from spermatogonia of the type A. To the meiotic yield was around 1,9 cells, what is equivalent to a loss of 53% in the meiotic process; the general yield of spermatogenesis was 22,6 cells. Each Sertoli cell is capable to support about 7,6 rounded spermatids. The total duration of seminiferous epithelium cycle was about 8,99 days; 4,5 cycles are necessary to the spermatogenesis process so 40,45 days were necessary from spermatogonia of the type A till spermatozoa. The maned wolf, with approximately twenty nine million spermatozoa per gram of testicle per day, is classified in the highest spermatogenic efficiency species.

1.0- INTRODUÇÃO

1.1- Os Testículos

A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros depende da capacidade dos testículos em produzir grande número de espermatozóides viáveis e concentrações adequadas de andrógenos para libido e maturação dos órgãos reprodutivos (GIER & MARION, 1970).

Os testículos ou gônadas masculinas, cuja forma é elipsóide (DYCE et al., 1990), estão alojados externamente ao abdômen, dentro de uma estrutura em forma de bolsa, derivada da pele e fâscias musculares da parede abdominal, denominada de escroto (ASHDOWN & HANCOCK, 1988; DYCE et al., 1990; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). A posição dentro do escroto e a direção do eixo longitudinal dos testículos varia de acordo com as espécies (ASHDOWN & HANCOCK, 1988), apresentando-se vertical em ruminantes, horizontais em caninos e eqüinos, inclinados em suínos e felinos. Essas diferenças estão relacionadas com a posição do escroto no corpo do animal, sendo caudal ao abdômen nos ruminantes, perineal nos suínos e felinos, e em posição intermediária às espécies já citadas nos eqüinos e caninos. Cada testículo fica suspenso separadamente pelo funículo espermático, um feixe de estruturas que inclui o ducto deferente, vasos e nervos, envoltos por um revestimento duplo de peritônio (DYCE et al., 1990).

O parênquima testicular, de coloração acastanhado, é mantido, sob pressão moderada (DYCE et al., 1990), envolto em uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea (DYCE et al., 1990; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999), de forma que

qualquer incisão nesta cápsula ocasiona em protusão do mesmo (DYCE et al., 1990). A cápsula emite septos e trabéculas que dividem o parênquima em lóbulos, confluindo para um espessamento visível denominado de mediastino testicular (DYCE et al., 1990; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999), que pode estar localizado na porção central ou periférica, próximo ao epidídimo (GIER & MARION, 1970; DYCE et al., 1990). O parênquima testicular é constituído de túbulos seminíferos e tecido intersticial. Do tecido intersticial fazem parte aglomerados de células intersticiais ou de Leydig, sustentados por uma rede de tecido conjuntivo, por onde passam vasos sanguíneos e linfáticos. A maior parte do parênquima é constituída pelos contorcidos túbulos seminíferos, nos quais ocorre o processo espermatogênico estando, ambas as extremidades, voltadas para o mediastino. O epitélio dos túbulos consiste de células espermatogênicas e células de sustentação ou de Sertoli, que apresentam propriedades tanto de nutrição como produção de hormônios. A membrana basal contém células contráteis mióides (ASHDOWN & HANCOCK, 1988; DYCE et al., 1990; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Os testículos apresentam tanto função endócrina quanto função exócrina (ASHDOWN & HANCOCK, 1988; DYCE et al., 1990), essas duas, governadas pelos hormônios gonadotróficos hipofisários. O hormônio folículo estimulante (FSH) está relacionada com o início da atividade dos túbulos seminíferos e o hormônio luteinizante (LH) controla a atividade endócrina das células de Leydig. Tais células são fonte da testosterona, que sustenta a ação do FSH sobre a espermatogênese e é responsável pelas características sexuais secundárias, assim como o desenvolvimento e integridade funcional do sistema reprodutivo masculino (ASHDOWN & HANCOCK, 1988). A atividade endócrina é mantida com a temperatura corporal, porém, para uma produção eficiente de gametas, é necessário uma temperatura um pouco inferior. Em decorrência disto, os testículos se desenvolvem no interior do abdômen e migram para o escroto pelo canal inguinal, a fim de alcançarem temperaturas condizentes com a espermatogênese (DYCE et al., 1990; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

1.1.1- O compartimento intertubular e as células de Leydig

O compartimento intertubular dos testículos corresponde ao tecido intersticial ou estroma das demais glândulas. É constituído de tecido conectivo fibroso, o qual suporta vasos sanguíneos e linfáticos, além das células que compõem o referido tecido, tais como fibroblastos, células reticulares, macrófagos, mastócitos e linfócitos (HOOKER, 1970).

O principal componente celular do compartimento intertubular é a célula intersticial de Leydig (HOOKER, 1970), cujas formas variam de irregular a poliédrica. Tais células constituem grupos localizados entre os túbulos seminíferos e são responsáveis pela síntese e armazenamento da testosterona. A testosterona, por sua vez, é importante para promover o comportamento sexual normal, o processo espermatogênico, em associação com FSH e LH, manter a função das glândulas acessórias (DELLMANN & WROBEL, 1982) e as características sexuais secundárias (DELLMANN & WROBEL, 1982; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Desta forma, a densidade populacional das células de Leydig varia de acordo com a espécie e idade (DELLMANN & WROBEL, 1982).

As células de Leydig iniciam a secreção da testosterona ainda na vida fetal, para a diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculinos, estimulados pelo hormônio gonadotrófico materno que, ao atravessar a placenta, atinge o sangue fetal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Em ratos, gonadotrofinas placentárias ou hipofisárias maternas exercem influência direta sobre as células de Leydig, aumentando-as em número e tamanho. O número dessas células varia de espécie para espécie, sendo abundante no gato e porco, em menor número em homens e ratos e escasso em algumas espécies de aves (HOOKER, 1970).

1.1.2- O compartimento tubular e as células de sustentação

É no compartimento tubular ou túbulo seminífero que ocorre a produção de espermatozóide em um processo denominado espermatogênese. Este compartimento tubular é constituído por um epitélio estratificado composto por dois diferentes tipos celulares que são as células de sustentação, ou células de Sertoli, e as células que constituem a linhagem espermatogênica (DELLMANN & WROBEL, 1982; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). As células da linhagem espermatogênica dispõem-se em quatro a oito camadas que ocupam o espaço entre a lâmina basal e a luz do túbulo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

A espermatogênese é subdividida em três fases:

- Espermatocitogênica;
- Meiótica;
- Espermio gênica (DELLMANN & WROBEL, 1982).

A célula tronco espermatogênica é a espermatogônia, uma célula diplóide (DELLMANN & WROBEL, 1982), adjacente à membrana basal (GARNER & HAFEZ, 1988), que passa por um processo de multiplicação mitótica denominado de espermatocitogênese. O número de divisões mitóticas é dependente da espécie mas, em geral, podem ser distinguidos três tipos de espermatogônias com diferenças morfológicas sutis: tipo A, tipo intermediária e tipo B. A divisão mitótica de uma espermatogônia tronco tipo A resulta numa célula a qual inicia o processo espermatogênico e outra nova célula-fonte que permanece quiescente até que os descendentes da outra célula filha originem os espermátócitos primários. Estes espermátócitos primários são oriundos da última divisão mitótica da espermatogônia B (DELLMANN & WROBEL, 1982).

Os espermátócitos primários entram na primeira fase da divisão meiótica, resultando nos espermátócitos secundários e, em seguida, passam para a segunda divisão da meiose resultando nas espermátides arredondadas (DELLMANN & WROBEL, 1982; GARNER & HAFEZ, 1988).

As então formadas espermátides arredondadas passam por diversas transformações nucleares e citoplasmáticas diferenciando-se em espermatozoides, processo este denominado de espermio gênese (GARNER & HAFEZ, 1988; DELLMANN & WROBEL,

1982). O conjunto de células espermatogênicas originado de uma espermatogônia B se mantém unido por pontes citoplasmáticas, sendo interrompidas na liberação dos espermatozóides para a luz dos túbulos seminíferos (DELLMANN & WROBEL, 1982).

O compartimento tubular é constituído também por células piramidais, alongadas, com contorno irregular, cujas bases largas apoiam sobre a membrana basal, denominadas de células de sustentação ou células de Sertoli. Tais células não se dividem com frequência, mas são mais resistentes às agressões adversas ao testículo. Estas células exercem funções nutritiva, protetora e de sustentação para as células espermatogênicas. São ainda responsáveis pela fagocitose dos espermatozóides em degeneração e corpos residuais destacados das espermátides, liberam os espermatozóides para a luz do túbulo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990; GARNER & HAFEZ, 1988; DELLMANN & WROBEL, 1982) e participam da sincronização do processo espermatogênico. Estas células são contíguas e apresentam reentrâncias citoplasmáticas onde se alojam as células da linhagem espermatogênica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990), formando junções intercelulares acima das espermatogônias. Assim, subdividi o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal, contendo as espermatogônias e os espermatócitos primários em pré-leptóteno, e o adluminal, contendo as formas mais avançadas dos espermatócitos e as espermátides. A principal ação destas junções entre as células adjacentes é a formação de uma barreira de difusão fisiológica no interior dos túbulos, a barreira hemato-testicular, que garante um ambiente constante no compartimento luminal, sem interferências externas. Além disso, é responsável, também, pela manutenção de concentrações específicas de enzimas inibidoras, hormônios gonadotróficos e da proteína ligadora de andrógeno, a ABP (GARNER & HAFEZ, 1988; DELLMANN & WROBEL, 1982). Esta proteína ABP é secretada e liberada pelas células de Sertoli e se liga com muita afinidade à testosterona, garantindo concentrações elevadas deste hormônio no túbulo seminífero (GARNER & HAFEZ, 1988; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

1.2- A biópsia testicular

A biópsia testicular é muito utilizada, em humanos, para diagnóstico de azospermia obstrutiva ou não obstrutiva e para classificação de oligospermia, auxiliando na prescrição de um protocolo de tratamento e no prognóstico (THRELFALL & LOPATE, 1993). Da mesma forma, é recomendada para diagnóstico de azospermia em cães e demais espécies domésticas (FINCO, 1974; ATTIA et al., 2000), podendo fornecer informação adicional sobre o estado espermatogênico de animais inférteis, assim como a etiologia, o tratamento e o prognóstico (LOPATE et al., 1989). Porém, tal técnica é utilizada com receio devido à possibilidade do ato cirúrgico ocasionar lesões no parênquima testicular que possam afetar a qualidade espermática e fertilidade, por invadir a barreira hemato-testicular (HEDGER, 1997).

ATTIA et al. (2000) concluíram que a biópsia testicular pode induzir a formação de anticorpos antiespermatozóides, mas não o suficiente para interferir na produção e na motilidade destes de forma negativa. Em seu experimento detectaram uma queda na produção espermática durante duas semanas após a realização da biópsia, associada a uma produção dos referidos anticorpos, mas a associação do aparecimento de anticorpos e a queda na porcentagem de espermatozóides normais não foram clinicamente significativas. Após este período, a produção espermática retornou aos níveis normais e a quantidade de anticorpos começou a declinar. Assim, as alterações testiculares que ocorrem após o procedimento cirúrgico não aparentam ter um efeito de longa duração na produção espermática.

O efeito da biópsia sobre a motilidade espermática e a porcentagem de espermatozóides anormais é bastante variável. Segundo SYKES et al. (1949) uma única biópsia, unilateral, não causaria alterações nestes parâmetros. Porém, sucessivas biópsias, mesmo no testículo contralateral, acarretariam em efeito adverso, diminuindo a motilidade e aumentando a porcentagem de espermatozóides com defeitos morfológicos.

1.3- O lobo-guará

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Fig. 1) representa a maior espécie de canídeo da América do Sul, ocorrendo do nordeste do Brasil (exceto áreas costeiras) ao norte da Argentina, Paraguai, leste e oeste da Bolívia até o Peru (FLETCHALL, 2000). Estes animais habitam, preferencialmente, áreas abertas e semi-abertas, especificamente áreas de várzeas, matas arbustivas e baixadas com capoeirões (DIETZ, 1984).

De acordo com a região, é conhecido por boroche (Bolívia), aguará guazú (Paraguai e Argentina) e lobo de crina (Bolívia e Peru) (DIETZ, 1984, FLETCHALL, 2000). Acredita-se que os lobos-guarás se desenvolveram nos planaltos centrais do Brasil, durante a era pleistocena, de um ancestral canídeo (FLETCHALL, 2000) e foram morfologicamente adaptados para habitar o cerrado (DIETZ, 1984). O seu nome científico, *Chrysocyon brachyurus*, significa cão dourado de cauda pequena, onde *Chrysocyon* é cachorro dourado e *brachyurus* é cauda curta (WIELOCH et al., 1997).



Figura 1: Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de aproximadamente 3 anos de idade mantido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa

1.3.1- Biologia

Os lobos-guarás são atípicos em sua aparência, possuem patas longas (75 a 90 cm de altura de cernelha), permitindo-os se locomover e observar acima da vegetação alta do cerrado (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000; WIELOCH et al., 1997) e 1,30 cm de comprimento do corpo (WIELOCH et al., 1997). A pelagem é vermelho-ferrugem no corpo, com focinho e região distal dos membros marrom escuro ou preto. A região ventral do pescoço, as partes internas das orelhas e ponta da cauda são de coloração branca. Os pelos da região dorsal do pescoço e dos ombros são maiores do que no restante do corpo e se eriçam durante encontros agonísticos, o que justifica a denominação de lobo de crina (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000). De acordo com DIETZ (1984), alguns autores especularam que os membros longos destes animais foram uma adaptação para melhor visualização e locomoção através da vegetação alta e não para corridas velozes.

Apesar do tamanho é um animal medroso e geralmente foge de locais habitados pelo homem (DIETZ, 1984, WIELOCH et al., 1997). Porém, a redução das áreas naturais tornou-o mais próximo do homem, podendo ser visto nas sedes das fazendas atraídos pela presença de animais domésticos, preferencialmente galinheiros (DIETZ, 1984).

1.3.2- Hábitos alimentares

Os lobos-guarás são onívoros e se alimentam oportunamente de uma dieta diversificada. As mudanças sazonais na disponibilidade de comida resultam em mudanças nos componentes da dieta. Alimenta-se basicamente de frutas da região, pequenos mamíferos (roedores, tatus), répteis e ovos de aves (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000). Apreciam uma fruta típica do cerrado, grande, pesada, de polpa amarela e sabor adocicado denominada popularmente como lobeira (*Solanum lycocarpum*), que produz o ano todo (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000; WIELOCH et al., 1997).

1.3.3- Organização social

Os lobos-guarás tem hábitos noturnos e crepusculares, ocupam uma área média de 30 km². São animais facultativamente monogâmicos, podendo casais dividir a mesma área, mas raramente são vistos juntos, exceto durante a estação de reprodução (abril a junho) (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000; WIELOCH et al., 1997). Normalmente são animais predominantemente solitários que mantém a individualidade e limites dos territórios (DIETZ, 1984).

Os territórios são demarcados por locais específicos de defecação e urina (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000; WIELOCH et al., 1997), freqüentemente próximo aos locais de descanso, aos esconderijos, trilhas e em superfícies elevadas como rochas e cupinzeiros. Estas demarcações informam a presença de um lobo-guará na área enfatizando a posse da mesma aos demais animais (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000). Em alguns casos, os limites territoriais são barreiras físicas como estradas, sulcos, cordilheiras e córregos (DIETZ, 1984). Territórios de animais de mesmo sexo não se sobrepõem (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000).

Outra forma de comunicação comum é a voz, emitindo um rugido-latido, prolongado e profundo, como sinalização de sua presença dentro do território (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000; WIELOCH et al., 1997), semelhante ao uivo de um cão doméstico de raça grande (DIETZ, 1984). A área familiar é a mesma por toda a vida, sendo ocupada por animais nômades periféricos, quando da morte ou abandono do seu habitante (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000). Os lobos-guarás são mais ativos durante a noite, enquanto durante o dia descansam a maior parte do tempo sobre gramas e arbustos próximos a nascentes de pequenos córregos ou em locais de vegetação densa. Logo após o entardecer, deixam seus locais de descanso e se locomovem pelos seus territórios em busca de alimento pelos campos e cerrados abertos (DIETZ, 1984; WIELOCH et al., 1997).

1.3.4- Reprodução

As fêmeas de lobo-guará são monoestrais, ciclam uma vez ao ano e o estro dura em torno de 5 dias. De uma gestação de 63 – 67 dias, nascem de 2 a 5 filhotes (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000), na maioria das vezes durante a estação seca. As fêmeas escondem alimentos na toca antes de parir. Utilizam, para fazer seu ninho, locais como afloramento de rochas, pontos baixos nos capinzais e cupinzeiros abandonados (FLETCHALL, 2000). Os filhotes apresentam pelagem negra e ponta da cauda branca, são amamentados por aproximadamente dois meses, sendo a dieta complementada por alimentos regurgitados por ambos os pais (FLETCHALL, 2000; WIELOCH et al., 1997).

Poucos trabalhos são observados na literatura sobre fisiologia reprodutiva em lobos-guarás, principalmente no macho. Em fêmeas, WASSER et al. (1995) e GROSS et al. (1991), avaliaram o ciclo reprodutivo a partir de dosagens de hormônios fecais, observando um surgimento de estrógeno seguido de aumento sustentado dos níveis de progesterona, durante o cio.

2.0- Objetivos e justificativa

Poucos relatos sobre a reprodução do lobo-guará em vida livre ou em cativeiro são disponibilizados na literatura, principalmente em relação aos aspectos básicos da morfologia reprodutiva. O desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida em espécies da fauna brasileira que se encontram ameaçadas de extinção, como o lobo-guará, é essencial para garantir a sobrevivência e proliferação destes animais. A utilização de biotécnicas reprodutivas, associadas à preservação do seu habitat natural, pode possibilitar um aumento do número de indivíduos, auxiliando a sobrevivência da espécie. Tais protocolos de reprodução assistida em machos focam inicialmente a coleta e conservação criogênica de sêmen. Para isto, torna-se necessário um conhecimento básico do testículo e do processo espermatogênico. Neste sentido o presente trabalho objetiva subsidiar alguns dados do processo espermatogênico tais como:

- a) determinar a morfometria macro e microscópica dos testículos, incluindo proporções volumétricas entre seus componentes e diâmetro dos túbulos e altura do epitélio seminífero;
- b) calcular o comprimento do túbulo seminífero, total e por grama de testículo;
- c) calcular o índice gonadossomático e tubulossomático;
- d) descrever a morfologia das células da linhagem espermatogênica e das células de Sertoli, utilizando microscopia de luz, com a descrição dos estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero de acordo com o método da morfologia tubular e cálculo de suas frequências relativas;
- e) determinar a população celular dos túbulos seminíferos ao longo do estágio 1 do ciclo e cálculo do rendimento intrínseco da espermatogênese;
- f) determinar as relações quantitativas entre células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli;
- g) calcular a duração do ciclo do epitélio seminífero.

3.0- Referências Bibliográficas

- ASHDOWN, R. R.; HANCOCK, J. L. Anatomia funcional da reprodução masculina, In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*, editora Manole, 4 ed., cap. 2, p. 7 – 31, São Paulo, 1988.
- ATTIA, K. A., ZAKI, A. A., EILTS, B. E., PACCAMONT, D. L., HOSGOOD, G., DIETRICH, M. A., HOROHOV, D. W., BLOWIN, D. C. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. *Theriogenology*, n. 53, p. 1355-1363, 2000.
- DELLMANN, H., WROBEL, K. Sistema reprodutor masculino, In: DELLMANN, H., BROWN, E. M. *Histologia Veterinária*, Guanabara Koogan S. A., cap. 12, p. 232 – 253, Rio de Janeiro, 1982.
- DIETZ, J. M. Ecology and Social Organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*), *Smithsonian Contribution to Zoology*, n. 392, 50 p., ed. Smithsonian Institution Press, Washington, 1984.
- DYCE, K. M., SACK, W. O. WENSING, C. J. G. O aparelho urogenital In: DYCE, K. M., SACK, W. O. WENSING, C. J. G, *Tratado de Anatomia Veterinária*, ed. Guanabara, Rio de Janeiro, cap. 5, p. 110 –139, 1990.
- FINCO, D. R. Biopsy of the testicle. *Vet. Clin. of North American*, n. 2, v. 4, p. 377 – 381, 1974.
- FLETCHALL, N. B. História Natural. In: FLETCHALL, N. B.; RODDEN, M.; TAYLOR, S. *Manual de Manejo do Lobo Guará (Chrysocyon brachyurus)*, cap. 1, 87 p., 2000.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides, In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*, editora Manole, ed. 4, cap. 9, p. 187 – 211, São Paulo, 1988.

- GIER, H. T.; MARION, G. B. Development of mammalian testis, In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDERMARK, N. L. *The testis*, vol. 1, ed. Academic Press, cap. 1, p. 2 – 45, Londres, 1970.
- GROSS, T. S.; THARNISH, T.; RODDEN, M. Fecal steroid analyses as an assessment of reproductive function in the maned wolf (*Crysocyon brachyurus*). *Am. Assoc. of Zoo Vet.* p. 387 – 389, 1991.
- HEDGER, M. P. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev. of Repr.* n. 2, p. 38-47, 1997.
- HOOKER, C. W. The intertubular tissue of the testis In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. *The testis Development, anatomy and physiology*, vol., 1, cap. 8, ed. Academic press, 1970, New York, p. 483 – 550.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor masculino, In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*, editora Guanabara, ed. 7, cap. 21, p. 323 – 334, Rio de Janeiro, 1999.
- LOPATE, C., THRELFALL, W. R., ROSOL, T. J. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology*, n. 4, v. 32, 1989.
- SYKES, J. F., WRENN, T. R., MOORE, L. A., UNDERWOOD, P. C., SWEETMAN, W. J. The effects of testis biopsy on semen characteristics of bulls. *J. Dairy Ja.*, n. 32, p. 327-333, 1949.
- THRELFALL, W. R., LOPATE, C. Testicular biopsy. In. MC KINNON, A. O., VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Lea & Febiger. Philadelphia, London, cap. 104, p. 943-949, 1993.

WASSER, S. K., VELLOSO, A. L., RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. *J. Wild. Manage*, v. 59, n. 4, p. 889 - 894, 1995.

WIELOCH, D. R., VEADO, B. V., FURTADO, D. B. *Cadernos da Fundação Zoológica Botânica I - Animais do Zoológico*, Fundação ZooBotânica de Belo Horizonte, Serviço de educação ambiental, Belo Horizonte, p. 235, 1997.

4.0 - BIOMETRIA MACRO E MICROSCÓPICAS DOS COMPONENTES TESTICULARES EM LOBO-GUARÁ

(*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) ADULTO

Resumo

Os parâmetros de biometria macro e microscópicas testicular são de suma importância no desenvolvimento de protocolos para reprodução assistida nas diferentes espécies. Foram estudados no presente experimento quatro lobos-guarás adultos provenientes de cativeiro, que pesaram em média 31,5 kg, com massa testicular média de 6,3 g, apresentando assim índice gonadossomático de 0,04%. O volume médio de túbulos seminíferos por testículo foi de 4,81 ml, o que representou cerca de 79,3% do parênquima testicular. Em relação a massa corporal, cerca de 0,03% desta é alocada em túbulos seminíferos, constituindo o índice tubulossomático. O lobo-guará apresentou cerca de 18 metros de túbulo seminífero por grama de testículo. O diâmetro do epitélio seminífero foi em média 227,3 µm. Os valores registrados neste estudo encontram-se dentro da amplitude observada para as demais espécies domésticas e selvagens já estudadas.

Palavras chaves: lobo-guará, testículo, biometria testicular, túbulo seminífero, biópsia testicular.

4.1) Introdução

O lobo-guará (*Crysocion brachyurus*) é incluído entre as espécies animais da fauna brasileira ameaçadas de extinção, segundo a lista oficial publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2003). Dentre os principais fatores, a destruição de seu habitat, a caça predatória, e os atropelamentos registrados em rodovias, são os mais implicados na redução de sua população (CARVALHO, 1976; DIETZ, 1984). Este carnívoro, de cor vermelho dourado e patas enegrecidas, pode chegar a uma altura de 80 cm e 1,30 m de comprimento do corpo (WIELOCH et al., 1997). Apesar do tamanho é um animal medroso e, geralmente, foge de locais habitados pelo homem (DIETZ, 1984, WIELOCH et al., 1997).

Poucos relatos sobre a reprodução do lobo-guará em vida livre ou em cativeiro são disponibilizados na literatura, principalmente em relação aos aspectos básicos da morfologia reprodutiva.

A biometria testicular associada ao conhecimento da proporção volumétrica dos componentes testiculares e a quantificação da população celular no epitélio seminífero é fundamental à determinação da taxa de produção espermática, que é um parâmetro essencial para o desenvolvimento e aplicação de técnicas de reprodução assistida, as quais podem contribuir enormemente para a preservação de espécies ameaçadas (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; COUROT et al., 1970; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; FRANÇA, 1991; GUIÃO LEITE, 2002).

4.2) Material e métodos

Foram utilizados fragmentos testiculares obtidos através de biópsia de três lobos guará, com idade de quatro, sete e dez anos mantidos pela Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais e de um lobo-guará de três anos de idade mantido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa.

Para o procedimento cirúrgico e mensuração dos testículos, cada animal foi contido quimicamente, com auxílio de dardos anestésicos, e mantido sob anestesia geral utilizando associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso) e xilazina (1 mg/kg de peso). Depois de anestesiados, os animais foram pesados e, através de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos bem como mensuradas suas dimensões externas de comprimento, largura e espessura com o uso de um paquímetro. Estas dimensões testiculares externas foram utilizadas na fórmula $4/3\pi (ABC)$, onde A representa metade do comprimento, B metade da largura e C metade da espessura, para o cálculo do volume testicular, conforme GUIÃO LEITE (2002).

Após a mensuração dos testículos, foram feitas tricotomia e antissepsia local do escroto. A pele e a túnica fibrosa foram incisionadas e, com o uso de um “punch” de pele de 4 mm de diâmetro, obteve-se um fragmento o qual foi imediatamente imerso em solução fixadora de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, à temperatura ambiente sendo, posteriormente, armazenado sob refrigeração, no mesmo tampão, até o processamento histológico. Os fragmentos removidos com o “punch” apresentavam forma cilíndrica e, para a inclusão, foram orientados de forma que fossem obtidos cortes histológicos paralelos à sua base. A albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele foram suturadas individualmente, com pontos simples separados, utilizando fio absorvível sintético poliglactina 910 (Vicril®, 3-0 – Ethicon). No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatório (Flunixin Meglumine, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/kg de peso) e antibiótico (penicilina, 20.000 UI/kg de peso).

Todos os fragmentos foram processados para estudos em microscopia de luz e, para tal, foram desidratados em bateria de álcoois de concentrações crescentes (70^o, 80^o, 90^o e 100^o GL) por uma hora cada, infiltrados em dois banhos de resina plástica à base de

glicol metacrilato (Historesin, *Leica Instruments*) e incluídos, na mesma resina, a qual foi adicionado catalisador (dimetil sulfóxido).

A albugínea do fragmento foi removida e incluída separadamente orientada perpendicularmente à superfície de corte. Foram obtidos cortes de quatro micrômetros (4 μ m) de espessura em micrótomo rotativo (Reichert - Jung Modelo 2045 Multicut) dotado de navalha de vidro. Estes cortes foram obtidos de forma seriada com intervalos de 40 μ m, montados sobre lâmina de vidro e corados com Azul de Toluidina–Borato de Sódio a 1%, no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

A estimativa do volume ocupado pela albugínea testicular foi calculada a partir da mensuração, com auxílio de uma ocular micrométrica 10X e objetiva de 10X em microscópio óptico (Olympus CX 40), da espessura média da albugínea em cortes histológicos perpendiculares. Para tal, foi subtraído do volume calculado para o testículo, o volume calculado através das dimensões testiculares, descontados o valor médio da albugínea testicular.

O volume calculado para o testículo dos animais foi considerado como peso, visto que a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é aproximadamente 1,0 (PAULA, 1999). Inferindo-se ao peso corporal o peso de ambos os testículos, foi calculado o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de massa corporal alocado em testículos.

Para cálculo da proporção volumétrica ocupada pelo túbulo seminífero e espaço intertubular, foram obtidas 25 imagens aleatórias dos cortes histológicos, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL - 984P). Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 14 polegadas, com aumento final de aproximadamente 1000 vezes. Uma grátula composta por 441 intersecções, foi aplicada sobre as imagens. Estas intersecções foram computadas como pontos coincidentes ao túbulo seminífero e espaço intertubular. Assim, para cada animal foram computados um total de 11.025 pontos no parênquima testicular. Com a proporção volumétrica do túbulo seminífero e espaço intertubular no volume testicular, foi possível o cálculo do volume total de cada um destes componentes testiculares.

Sobre o valor calculado para o índice gonadossomático, foi inferido o percentual ocupado pelo túbulo seminífero, para a estimativa do percentual do peso corporal alocado em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático (ITS).

Para a estimativa do diâmetro médio dos túbulos seminíferos foram mensuradas 20 secções transversais de túbulos com o contorno mais circular possível. Para tanto, as medidas foram feitas com auxílio de uma ocular micrométrica 10X e objetiva de 10X em microscópio óptico. O comprimento do túbulo seminífero foi calculado com base na fórmula de volume de um cilindro, onde o seu comprimento representa o volume dividido pela área da base. Assim, o volume total de túbulos seminíferos dividido pelo valor calculado da área de sua secção transversal ($\pi (\text{diâmetro médio}/2)^2$), correspondeu ao comprimento total de túbulo seminífero por testículo.

Os dados são apresentados em valores médios e respectivos desvios padrão. Quando necessário, alguns dados foram comparados com nível de significância de 5% quanto a diferenças entre as médias, através do programa Microsoft Excel.

4.3) Resultados e discussão

Os animais apresentaram peso corporal médio de 31,5 kg (Tab. 1), semelhante ao descrito por FLETCHALL (2000) para animais em cativeiro. Segundo SHELDON (1992) animais de vida livre atingem em média de 20 a 23kg. O peso dos testículos foi estimado a partir das dimensões testiculares, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os antímeros direito e esquerdo (Tab. 1). A média deste parâmetro em lobo-guará oscilou entre 6,29 a 6,39 g. A relação entre testículo e peso corporal nas diferentes espécies não está relacionada com o tamanho e localização do testículo, forma do corpo ou modo de locomoção (terrestre, aquático ou aéreo), porém, mamíferos de menor porte tendem a alocar maior proporção de massa corporal em testículos, que os de maior porte (KENAGY & TROMBULAK, 1986). O lobo-guará apresenta cerca de 0,04% do peso corporal alocado em testículo, ou seja, índice gonadossomático (Tab. 1) menor do que 0,1% computado em cães SRD (PAULA, 1992) e 0,07% em gatos domésticos (GODINHO, 1999), porém muito próximo aos 0,03% observado no puma (GUIÃO LEITE, 2002), outro

carnívoro de massa corporal semelhante (Tab. 4). De maneira geral os carnívoros apresentam baixo investimento de massa corporal em testículos (KENAGY & TROMBULAK, 1986).

Tabela 1 – Biometria macro e microscópica do testículo de lobo-guará adulto.

Parâmetro	n	Média ± Desvio padrão
Massa corporal (Kg)	4	31,5 ± 3,39
Massa testicular direita (g)	4	6,29 ± 3,18 *
Massa testicular esquerda (g)	4	6,39 ± 2,85 *
Índice gonadossomático (%)	4	0,04 ± 0,02
Índice tubulossomático (%)	4	0,03 ± 0,01

*valores estatisticamente semelhantes $p > 0,05$

O tamanho relativo dos testículos correlaciona-se funcionalmente com o sistema de acasalamento (DIXSON, 1993) e desta forma, espécies de mamíferos onde uma fêmea cruza com vários machos durante o período fértil do ciclo ovariano, apresentam maiores índices gonadossomáticos em relação às espécies onde um único macho é responsável pela cópula. Isto se deve ao fato de, no primeiro caso, haver necessidade de maior produção espermática, uma vez que a competição pela fertilização ocorre no interior do trato genital feminino. Assim, o menor índice gonadossomático observado para o lobo-guará e para a onça parda em relação ao gato e cão doméstico parece ser reflexo de suas maiores massas corporais e do seu comportamento reprodutivo no qual raramente uma fêmea copula com mais de um macho durante o cio (DIETZ, 1984; FLETCHALL, 2000).

Para os cálculos quantitativos de produção espermática, torna-se necessário a compartimentalização do testículo em seus diferentes componentes funcionais e estruturais. A estimativa da proporção volumétrica testicular destes componentes inicia-se com o cálculo do volume ocupado pelo parênquima testicular, que representa o volume total do testículo descontado o percentual da albugínea e mediastino testiculares. Na maioria dos animais domésticos estes ocupam entre 10 a 15% (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Como nos lobos-guarás do presente estudo utilizou-se apenas fragmentos obtidos através de biópsia testicular, não foi possível o acesso a dados sobre o mediastino testicular sendo,

porém, possível estimar a espessura da albugínea testicular em cada animal e, por meio deste parâmetro, calcular seu volume médio, que variou de 0,59 a 0,64 ml, representando cerca de 11% do volume testicular (Tab. 2). Segundo OLAR et al. (1983), o volume ocupado pela albugínea testicular em cães é de cerca de 6,0%.

O túbulo seminífero é o principal componente do testículo nos mamíferos, exercendo grande influência sobre a massa testicular e a produção espermática (AMANN, 1970). Sua proporção volumétrica pode variar de 61 a 86% em animais domésticos de produção (FRANÇA & RUSSELL, 1998), enquanto que, em mamíferos, a menor proporção volumétrica foi observada em capivaras, onde apenas 50% do parênquima testicular é composto por túbulos seminíferos (PAULA, 1999). O volume médio de túbulos seminíferos observado em lobos-guarás foi de 4,81 ml por testículo, o que representou cerca de 79,3% do parênquima testicular (Tab. 2), sendo esta proporção volumétrica menor que os quase 90% observados no gato (GODINHO, 1999) e no cão (PAULA & CARDOSO, 1994) (Tab.4). Em relação à massa corporal, o lobo-guará apresenta cerca de 0,03 % desta alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático (Tab. 1), a onça parda apresenta cerca de 0,02% sendo no cão e gato domésticos este índice bem superior, respectivamente de 0,08 e 0,06% (PAULA, 1992; GODINHO, 1999) (Tab. 4).

Tabela 2. Proporção volumétrica e volume médio dos componentes testiculares em lobo-guará adulto.

Parâmetro	n	Média ± Desvio padrão
Túbulo seminífero (%)	4	79,33±7,3
Volume de túbulo seminífero (ml)	4	4,81±2,9
Espaço intertubular (%)	4	19,97±8,3
Volume de espaço intertubular (ml)	4	1,06±0,4
Albugínea (%)	4	11,18±1,1
Volume de Albugínea (ml)	4	0,67±0,2

O diâmetro do túbulo seminífero permanece relativamente constante nos animais não sazonais e sexualmente maduros (PAULA, 1999; GUIÃO LEITE, 2002), embora, o valor tipicamente observado nos animais domésticos de produção apresenta uma variação de 170 a 275 μ m (FRANÇA & RUSSELL, 1998). O lobo-guará apresenta diâmetro médio dos túbulos seminíferos de 227 μ m (Tab. 3), o mesmo valor registrado na onça parda, muito próximo ao observado no gato doméstico (GODINHO, 1999) e acima do registrado no cão (PAULA, 1992) (Tab. 4).

O comprimento total do túbulo seminífero é calculado a partir do volume total de túbulos seminíferos dividido por sua área de secção transversal. O lobo-guará apresenta em média 109 metros de túbulo seminífero por testículo (Tab. 3), parâmetro este diretamente relacionado ao tamanho do testículo. Porém, uma comparação entre diferentes espécies não é significativa visto a grande variação no tamanho testicular. Assim, o comprimento tubular por grama de testículo é um parâmetro mais acurado para a comparação interespecífica. O lobo-guará apresenta cerca de 18 metros de túbulo seminífero por grama de testículo (Tab. 3), mesmo valor observado em onça parda (GUIÃO LEITE, 2002) e próximo ao descrito para a maioria dos animais domésticos de produção (FRANÇA & RUSSELL, 1998). O gato doméstico apresenta cerca de 23m de túbulo por grama de testículo (GODINHO, 1999), denotando maior investimento na produção espermática em gatos domésticos, em relação a estas espécies silvestres, reafirmando diferenças quanto às estratégias reprodutivas (Tab. 4).

Tabela 3 – Diâmetro tubular médio e o comprimento do túbulo seminífero em lobo-guará adulto.

Parâmetro	n	Média \pm Desvio padrão
Diâmetro tubular (μ m)	4	227,35 \pm 53,3
Comprimento de túbulo seminífero* (m/g)	4	17,93 \pm 5,3
Comprimento total de túbulo seminífero** (m)	4	109,26 \pm 49,0

*Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo e ** por testículo.

Tabela 4 – Tabela comparativa de índice gonadosomático (IGS), índice tubulossomático (ITS), volume, diâmetro e comprimento de túbulo seminífero entre quatro espécies.

	IGS (%)	ITS (%)	Túbulo seminífero V(%)	Diâmetro do túbulo (μm)	Comprimento do túbulo (m/g)	Ref.
Lobo-guará	0,04	0,03	79,3	227,3	17,9	
Cão doméstico	0,10	0,08	88,2	175,0		1
Gato doméstico	0,07	0,06	90,0	223,0	23,0	2
Onça parda	0,03	0,02	78,0	227,3	18,2	3

1 – PAULA, 1994.

2 – GODINHO, 1999.

3 – GUIÃO LEITE, 2002.

4.4) Referências Bibliográficas

- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (ed.). *The testis*. New York: Academic Press, v. 1, Cap. 7, p.433-482, 1970.
- CARVALHO, C. T. Aspectos faunísticos do cerrado – o lobo-guará (Mammalia, Canidae). *Boletim técnico (Instituto Florestal)*, n. 21, p. 1 – 16, São Paulo, 1976.
- COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (ed.). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, cap. 6, p.339-432, 1970.
- DIETZ, J. M. Ecology and Social Organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*), *Smithsonian Contribution to Zoology*, n. 392, 50 p., ed. Smithsonian Institution Press, Washington, 1984.
- DIXSON, A. F. Sexual selection, sperm competition and the evolution of sperm length, *Folia primatol.*, v. 61, p. 221 – 227, 1993.
- FLETCHALL, N. B. História Natural. In: FLETCHALL, N. B.; RODDEN, M.; TAYLOR, S. *Manual de Manejo do Lobo Guará (Chrysocyon brachyurus)*, cap. 1, 87 p, 2000.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.
- FRANÇA, L. R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F., REGADERA, J. (ed). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*, Churchill Communications, cap. 16, p. 197-219, 1998.

- GODINHO, C. L. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 124p, Dissertação (Mestrado em Morfologia), 1999.
- GUERRA, M.O. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Rev. Bras. Biol.*, v.43, n.4, p.385-394, 1983.
- GUIÃO LEITE, F. L. *Análise morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta*, Viçosa: Departamento de veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV, 65p, Dissertação (Mestrado em Morfologia), 2002.
- IBAMA. lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. [On line] Disponível em : <http://www.ibama.gov.br>. Acessado em 26/03/2003.
- KENAGY, G. J.; TROMBULAK, S. C. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mamm.*, n. 67, v. 1, p. 1 – 22, 1986.
- 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, *Biol. Reprod.*, 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. (ed.). *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. Cap. 8, p. 203 - 227, 1977.
- PAULA, T. A. R.; CARDOSO, F. M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. *Análise histométrica, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 46, n. 1, p. 19 – 30, 1994.

- PAULA, T.A.R. *Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 62 p, Tese (Mestrado em Morfologia), 1992.
- PAULA, T.A.R. *Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (Hydrochoerus hydrochaeris)*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 84 p, Tese (Doutorado em Morfologia), 1999.
- ROOSEN-RUNGE, E.C., GIESEL, Jr. L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.*, v. 87, n.1, p.1-30, 1950.
- SHELDON, J.W. *Wild Dogs: The natural history of the nondomestic canidae*. Academic Press, Inc. , San Diego, CA, p. 69-75, 1992.
- WIELOCH, D. R., VEADO, B. V., FURTADO, D. B. *Cadernos da Fundação Zoo-Botânica I - Animais do Zoológico*, Fundação ZooBotânica de Belo Horizonte, Serviço de educação ambiental, Belo Horizonte, p. 235, 1997.

5.0- A POPULAÇÃO CELULAR DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E ÍNDICES INDICATIVOS DA PRODUÇÃO ESPERMÁTICA EM LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) ADULTO

Resumo

O estudo do processo espermatogênico torna-se extremamente relevante, subsidiando com informações básicas o desenvolvimento e sedimentação de tecnologias em reprodução assistida. Embora o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) seja o maior canídeo das Américas pouco se sabe a respeito de sua morfofisiologia testicular, incluindo a sua espermatogênese. Neste trabalho, estimou-se que a espessura média do epitélio seminífero de lobos-guarás foi de aproximadamente 75,7 μm e que cerca de 12,0 espermatócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A. O rendimento meiótico foi em torno de 1,9 células, o que equivale a uma perda de 53% durante a meiose o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,6 células. Cada célula de Sertoli é capaz de sustentar cerca de 7,6 espermatídes arredondadas.

Palavras chaves: Lobo-guará, testículo, epitélio seminífero, produção espermática, biópsia testicular

5.1) Introdução

O lobo-guará tem ampla distribuição, desde as terras baixas da Bolívia, adentrando o Paraguai e Norte da Argentina. No Brasil, habita as áreas de cerrados e campos do Centro-Oeste, Sudoeste e Sul do país (DIETZ, 1984; WASSER et al., 1995). Hoje sua população está restrita às áreas protegidas ou afastadas do Cerrado brasileiro e em algumas áreas na Bolívia e no Paraguai.

Este carnívoro, de cor vermelho dourado e patas enegrecidas, pode chegar a uma altura de 80 cm e 1,30 m de comprimento do corpo (WIELOCH et al., 1997). Apesar do tamanho é um animal medroso e, geralmente, foge de locais habitados pelo homem (DIETZ, 1984, WIELOCH et al., 1997). O lobo-guará é plenamente adaptado ao cerrado, habita preferencialmente, áreas abertas e semi-abertas, especificamente áreas de várzeas, matas arbustivas e baixadas com capoeirões (DIETZ, 1984). É um animal territorialista, ocupando uma área de 25 a 30 Km², dependendo da distribuição e abundância de recursos alimentares (KLEIMAN et al., 1973). Assim, o desenvolvimento agropecuário tem ameaçado o seu habitat reduzindo as áreas naturais no Brasil Central, que vêm sendo convertidas em áreas de cultivo e pastagem para criação de gado, reduzindo drasticamente a disponibilidade de abrigos para a reprodução, proteção e descanso, como também a oferta quali-quantitativa de alimentos (CARVALHO, 1976; DIETZ, 1984; WASSER et al., 1995).

Uma importante contribuição para a conservação de espécies ameaçadas é o conhecimento de sua biologia reprodutiva, principalmente em seus aspectos básicos, o que gera subsídios para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida. Neste sentido, o estudo quantitativo do processo espermatogênico é de suma importância.

No epitélio seminífero um rigoroso arquitetura é observado, à medida que as células da linhagem espermatogênica progridem das camadas mais basais para o lume tubular, uma seqüência de transformações é processada para a formação dos espermatozoides. A determinação da taxa de produção espermática nas diferentes espécies domésticas tem sido usada com o objetivo de melhorar o manejo e a exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (AMANN, 1970; AMANN & SCHANBACHER, 1983; FRANÇA, 1991). A quantificação e avaliação dos espermatozoides ejaculados permitem a análise da produção e correlação com achados

histológicos e biométricos testiculares em uma dada espécie, o que leva o desenvolvimento de técnicas de criopreservação de sêmen. Em espécies ameaçadas de extinção esta prática torna-se indispensável para a adequação de biotécnicas reprodutivas, importantes na preservação destas espécies, tais como formação de bancos de germoplasma e translocação de material genético entre indivíduos de vida livre e de cativeiro.

5.2) Material e Métodos

Foram utilizados fragmentos testiculares obtidos através de biopsia de três lobos-guarás, com idade de quatro, sete e acima de dez anos mantidos pela Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais e de um lobo-guará de três anos de idade mantido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa.

Para o procedimento cirúrgico e mensuração dos testículos, cada animal foi contido quimicamente, com auxílio de dardos anestésicos, e mantido sob anestesia geral utilizando associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso) e xilazina (1 mg/kg de peso).

Foram feitas tricotomia e antissepsia local do escroto, a pele e a túnica fibrosa foram incisionadas e, com o uso de um “punch” de pele de 4 mm de diâmetro, obteve-se um fragmento o qual foi imediatamente imerso em solução fixadora de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, à temperatura ambiente, por 24 horas, sendo, armazenado sob refrigeração, no mesmo tampão, até o processamento histológico. A albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele foram suturadas individualmente com pontos simples separados, utilizando fio absorvível sintético poliglactina 910 (Vicril®, 3-0 – Ethicon). No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatório (Flunixin Meglumine, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/kg de peso) e antibiótico (penicilina, 20.000 UI/kg de peso).

Todos os fragmentos foram processados para estudos em microscopia de luz e, para tal, foram desidratados em bateria de álcoois de concentrações crescentes (70⁰, 80⁰, 90⁰ e 100⁰ GL) por uma hora cada, infiltrados em dois banhos de resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, *Leica Instruments*) e incluídos, na mesma resina, por adição

do catalisador (dimetil sulfóxido). Foram obtidos cortes de quatro micrômetros (4 μm) de espessura em micrótomo rotativo (Reichert - Jung Modelo 2045 Multicut) dotado de navalha de vidro. Estes cortes foram obtidos de forma seriada com intervalos de 40μm, montados sobre lâmina de vidro e corados com Azul de Toluidina – Borato de Sódio a 1% , no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Para a estimativa da espessura média do epitélio seminífero, foram mensuradas, em 20 secções transversais de túbulos com contorno mais circular possível, as espessuras epiteliais desde o lume à túnica própria, em dois pontos contralaterais, sendo considerado o valor médio entre estes. Para tanto, as medidas foram feitas com auxílio de uma ocular micrométrica 10X e objetiva de 10X em microscópio óptico (Olympus CX 40).

As populações de células germinativas e de células de Sertoli foram estimadas a partir da contagem em quinze secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, considerando os seguintes tipos celulares:

- espermatogônias do tipo A,
- espermatócitos primários em paquíteno,
- espermátides arredondadas,
- células de Sertoli.

A contagem obtida para cada tipo celular foi corrigida para o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a fórmula de ABERCROMBIE (1946) modificada por AMANN (1962). Pelo fato da célula de Sertoli apresentar núcleo irregular, a correção do número das mesmas foi feito a partir do diâmetro nucleolar médio. Neste caso, somente núcleos com nucléolo evidente foram contados. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{DM}}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) foi obtido pela média das mensurações de 10 núcleos dos tipos celulares estudados, no estágio 1, em cada animal. No caso de células com núcleos ovóides ou ligeiramente alongados, como alguns tipos de espermatogônias, utilizou-se a média entre o maior e o menor diâmetro nuclear. As medidas nucleares foram feitas utilizando-se uma régua micrométrica acoplada à ocular 10X em microscópio de luz e com a objetiva de 100x.

A partir da população dos diferentes tipos celulares do epitélio seminífero, foram calculados o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, o rendimento meiótico, o rendimento geral da espermatogênese e o índice de célula de Sertoli.

5.3) Resultados e Discussão

O túbulo seminífero é o principal componente do testículo dos mamíferos, exercendo grande influência sobre a massa testicular (AMANN, 1970). Por sua vez a população celular do túbulo seminífero influencia diretamente seu diâmetro e a espessura epitelial, sendo estas mensurações classicamente utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (PAULA, 1999). A espessura do epitélio seminífero, por ser mais influenciada pelo peristaltismo tubular do que por variações metodológicas, é provavelmente melhor que o diâmetro tubular para avaliação da atividade espermatogênica (PAULA, 1992). Em lobos-guarás a altura média do epitélio seminífero foi de 75,7 μm (Tab. 1), encontrando-se dentro da amplitude citada para os animais domésticos (60 a 100 μm) (FRANÇA & RUSSELL, 1998), ligeiramente maior que o observado para o cão doméstico e onça parda (63 e 67 μm , respectivamente) (PAULA, 1992; GUIÃO LEITE, 2002), porém extremamente semelhante aos valores médios descritos para o gato doméstico (78 μm) (GODINHO, 1999). Ainda em lobos-guarás, comportamento semelhante foi observado para o diâmetro do túbulo seminífero (item 4.0).

O epitélio seminífero é composto de um mínimo de 4 camadas de células, as quais correspondem a diferentes gerações de células espermatogênicas em fases distintas no

processo espermatogênico. Podem ser observadas cerca de 8 diferentes combinações entre estas fases, denominadas estádios do ciclo do epitélio seminífero (GURAYA, 1987). Estes estádios se sucedem em uma dada área do epitélio seminífero com o passar do tempo. Assim, um ciclo do epitélio seminífero é a repetição de um mesmo estádio nesta área, e significa a passagem de uma fase mais basal de uma geração de células espermáticas, para uma fase mais desenvolvida, progredindo em direção à luz tubular e, conseqüentemente, liberando o espaço para uma nova geração (GUIÃO LEITE, 2002). Cerca de 4,5 ciclos são necessários para completar todo o processo espermatogênico (AMANN & SCHANBACHER, 1983).

Baseado em considerações funcionais, três fase distintas podem ser observadas durante o processo espermatogênico: a fase proliferativa, na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; a fase meiótica, na qual o material genético é recombinado e segregado e a fase espermiogênica, onde as espermátides se transformam em células estruturalmente equipadas para atingir e fertilizar o gameta feminino (RUSSELL et al., 1990). O cálculo populacional no estádio 1 do ciclo do epitélio seminífero permite a estimativa da eficiência destas fases, através da razão entre as diferentes gerações de células germinativas. Estas razões ou índices celulares referem-se ao coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, ao rendimento meiótico e ao rendimento geral da espermatogênese. Em lobo-guará, a população corrigida de espermatogônias do tipo A, espermátocitos primário em paquíteno, espermátides arredondadas e células de Sertoli no estádio 1 em corte transversais do túbulo seminífero estão descritas na Tabela 1. A população destes diferentes tipos celulares não permite uma comparação direta interespecífica, uma vez que existem diferenças metodológicas, principalmente na espessura do corte histológico avaliado. Assim, são os dados das razões populacionais que permitem a comparação entre diferentes espécies, uma vez que reflete numericamente a produção entre as diferentes fases do processo espermatogênico.

Tabela 1. Espessura do epitélio seminífero e a população celular corrigida no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero em lobos-guarás adultos.

Parâmetros	Média±desvio padrão
Espessura do epitélio seminífero	75,7±20,4
População de espermatogônias do tipo A	2,6±1,0
População de espermátócitos primários em paquíteno	30,6±7,7
População de espermátides arredondadas	57,6±15,7
População de células de Sertoli	7,7±3,5

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais é uma quantificação das perdas ou degenerações ocorridas durante a fase espermatogonial. Estas degenerações celulares referem-se a apoptoses, densidade dependentes, que visam a adequação da população de células germinativas à capacidade de suporte das células de Sertoli (DE ROOIJ & LOK, 1987; SHARPE, 1994). O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais é a razão entre a população de espermátócitos primários e a população de espermatogônias do tipo A no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. No lobo-guará cerca de 12,0 espermátócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A (Tab. 2), valor este maior que o observado para o gato doméstico (8,4) (GODINHO, 1999), onça parda (7,7) (GUIÃO LEITE, 2002), porém próximo ao relatado para o cão doméstico (13,7) (PAULA & CARDOSO, 1995) e para a amplitude observada deste coeficiente para os animais domésticos de produção (entre 14,6 a 24,8) (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

O rendimento meiótico refere-se à eficiência das divisões meióticas durante o processo espermatogênico. Embora teoricamente 4 espermátides possam ser produzidas a partir de um espermátócito primário, uma perda significativa é observada nesta fase, sendo que o período mais crítico para que isto ocorra é a metáfase, no fim da meiose (ROOSEN-RUNGE, 1973). Uma perda de 5 a 30% é observada ao final da meiose nos animais domésticos em geral (FRANÇA & RUSSELL, 1998). O cão e o gato domésticos apresentam uma perda de aproximadamente 25% durante a meiose (PAULA & CARDOSO 1995; GODINHO, 1999), mesmo valor observado para a onça parda que, também,

apresentou um rendimento meiótico de 25% (GUIÃO LEITE, 2002), enquanto o lobo-guará apresenta cerca de 1,9 espermátides produzidos por espermatócitos primários (Tab. 2), o que representa uma perda média de aproximadamente 53% do valor teórico esperado, sendo uma perda acentuada, próximo ao observado em capivaras (PAULA, 1999).

Em todos os mamíferos investigados somente cerca de 15% a 30% dos espermatozóides teoricamente esperados são produzidos (HUCKINS, 1978; FRANÇA & RUSSELL, 1998; SWERDLOFF et al., 1998), ou seja, as perdas celulares são um componente inerente ao processo espermatogênico. A quantificação mais palpável quanto à eficiência do processo espermatogênico é o rendimento geral da espermatogênese uma vez que representa o montante de espermatozóides produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A. Partindo-se do pressuposto que durante o processo espermiogênico não há perdas significativas (RUSSELL & CLERMONT, 1977), o número de espermátides arredondadas computadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero é considerado como a população de espermatozóides. Em lobos-guarás o rendimento geral da espermatogênese é de cerca de 22,6 espermatozóides por espermatogônias do tipo A (Tab. 2). O mesmo valor foi observado na onça parda (GUIÃO LEITE, 2002), próximo ainda ao observado em capivaras (21,1) (PAULA, 1999) e, apenas maior que no gato doméstico (16,3) (GODINHO, 1999) entre os animais domésticos (26,2 no cavalo a 74,2 no búfalo) (JONES & BERNDTSON, 1986; BILASPURI & GURAYA, 1980).

As células de Sertoli são células diplóides pertencentes ao epitélio seminífero, que apresentam função de sustentação física e fisiológica das células da linhagem espermatogênica (PAULA, 1999). Elas fornecem as condições necessárias para o desenvolvimento das diferentes gerações de células espermatogênicas e são responsáveis pela barreira hematotesticular a qual isola estas células do contato com os componentes do espaço intertubular. Assim, o número de células espermatogênicas presentes no epitélio seminífero é uma dependência direta da população e capacidade de suporte das células de Sertoli, que é relativamente fixa para cada espécie (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982). Uma vez que a população de células de Sertoli não aumenta após a puberdade (ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998), o índice de células de Sertoli, razão entre a população de células germinativas e de células de Sertoli, é o melhor indicativo da eficiência funcional destas células em uma dada espécie (RUSSELL &

PETERSON, 1984). Em lobos-guarás cada célula de Sertoli tem a capacidade de suportar cerca de 7,6 espermatídes arredondadas (Tab. 2), mesmo valor observado para a onça parda (GUIÃO LEITE, 2002) e acima dos 5,1 observados para o gato doméstico (GODINHO 1999), porém ligeiramente abaixo da amplitude observada nos demais animais domésticos (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Tabela 2- Rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em lobos-guarás adultos.

Parâmetros	Média±desvio padrão
Coefficiente de mitoses espermatogoniais	12,0 ± 0,5
Rendimento meiótico	1,9 ±0,05
Rendimento geral da espermatogênese	22,6 ± 0,3
Índice de células de Sertoli por espermatídes arredondadas	7,6 ± 1,0

5.4) Referências Bibliográficas

- AMANN, R.P., ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.*, v. 45, p. 774 - 781, 1962.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (ed.). *The testis*. New York: Academic Press, v. 1, Cap. 7, p.433 - 482, 1970.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction, *J. Anim. Sci. Suppl.*, v. 57, n. 2, p. 380 – 403, 1983.
- BILASPURI, G. S.; GURAYA, S. S. Quantitative studies of spermatogenesis in buffalo. *Reprod. Nutr.Dev.*, v. 20, p. 975 – 982, 1980.
- CARVALHO, C. T. Aspectos faunísticos do cerrado – o lobo-guará (Mammalia, Canidae). *Boletim técnico (Instituto Florestal)*, n. 21, p. 1 – 16, São Paulo, 1976.
- DE ROOIJ, D. G. & LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat. Rec.* n. 217, p. 131-136, 1987.
- DIETZ, J. M. Ecology and Social Organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*), *Smithsonian Contribution to Zoology*, n. 392, 50 p., ed. Smithsonian Institution Press, Washington, 1984.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

- FRANÇA, L. R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F., REGADERA, J. (ed). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*, Churchill Communications, cap. 16, p. 197 – 219, 1998.
- GODINHO, C. L. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 124p. Dissertação de tese (Mestrado em Morfologia), 1999.
- GUIÃO LEITE, F. L. Análise morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta. Viçosa: UFV, 65p. Dissertação de tese (Mestrado em Morfologia). Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Biológicas, 2002.
- GURAYA, S. S. Seminiferous epithelium, In: GURAYA, S. S., *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*, ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987.
- HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* n. 190, v. 4, p. 905-26, 1978.
- JONES, L. S.; BERNDTSON, W. E. A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion, *Biol. Reprod.*, v. 35, 1986.
- KLEIMAN, D. G.; EISENBERG, J. G. Comparisons of canid and felid social systems from an evolutionary perspective. *Animal Behaviour*, v. 21, p. 637 – 659, 1973.

- ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.*, v. 203, p. 485 - 492, 1982.
- ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L., LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v. 122, p. 787 - 794, 1988
- PAULA, T.A.R. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade. Belo Horizonte: UFMG, 62p. Dissertação de tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1992.
- PAULA, T.A.R. *Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (Hydrochoerus hydrochaeris)*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 84p. Tese (Doutorado em Morfologia), 1999.
- PAULA, T. A. R.; CARDOSO, F. M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. II. População celular dos túbulos seminíferos e rendimento espermatogênico, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 47, n. 4, p. 535 – 547, 1995.
- ROOSEN- RUNGE, E. C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 35, p. 339 - 348, 1973.
- RUSSELL, L.D., CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.*, v. 187, p. 347 - 366, 1977.
- RUSSELL, L. D., PETERSON, R. N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fert.*, v. 70, p. 635 - 641, 1984.

- RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA-HIKIM, A. P., CLEGG, E. D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida, 1990.
- SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In. KNOBIL, E., NEIL, J. D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2 ed. Raven Press, N.Y., 1994, p. 1363 - 1434
- STEINBERGER, A., STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol. Reprod.*, v. 4, p. 84 - 87, 1971.
- SWERDLOFF, R.S., LUE, Y., WANG, C. et al, Hormonal regulation of germ cell apoptosis. In: ZIRKIN, B.R. (ed.) *Germ cell development, division, disruption and death*. Springer-Veerlag, New York. Inc., 1998
- WASSER, S. K., VELLOSO, A. L., RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. *J. Wild. Manage*, v. 59, n. 4, p. 889 - 894, 1995.
- WIELOCH, D. R., VEADO, B. V., FURTADO, D. B. *Cadernos da Fundação Zoo-Botânica I - Animais do Zoológico*, Fundação ZooBotânica de Belo Horizonte, Serviço de educação ambiental, Belo Horizonte, p. 235, 1997.

6.0- O CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA EM LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) ADULTO.

Resumo

Neste estudo, a duração do ciclo do epitélio seminífero foi estimada em lobos-guarás adultos usando-se injeções intratesticulares de timidina triciada. A duração total do ciclo do epitélio seminífero desta espécie foi calculada em 8,99 dias e como aproximadamente 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que todo o processo espermatogênico seja completado, cerca de 40,45 dias são consumidos na produção de espermatozóides, a partir de uma espermatogônia do tipo A. A duração da espermiogênese foi calculada em 12,3 dias. Foram descritos os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, através do método da morfologia tubular, o qual se baseia na forma e posição do núcleo das espermátides e na ocorrência de divisões meióticas. Os valores observados no lobo-guará para a frequência relativa das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica foram respectivamente 3,5; 0,78 e 4,8 dias. O lobo-guará produz aproximadamente vinte e nove milhões de espermatozóides por grama de testículo por dia, sendo classificado entre as espécies de alta eficiência espermatogênica.

Palavras Chaves: Lobo-guará, testículo, duração do ciclo do epitélio seminífero, produção espermática diária, biópsia testicular, autoradiografia.

6.1) Introdução

O lobo-guará é o maior canídeo das Américas, apresenta coloração vermelho dourado e patas enegrecidas podendo chegar a uma altura de 80 cm e 1,30 m de comprimento do corpo (WIELOCH et al., 1997). Apesar do tamanho é um animal medroso e, geralmente, foge de locais habitados pelo homem (DIETZ, 1984, WIELOCH et al., 1997). Tem hábitos crepusculares e noturnos, permanecendo quieto durante o dia em locais de vegetação mais densa e, à tardinha, sai em busca de alimento pelos campos e cerrados abertos (WIELOCH et al., 1997).

Alimenta-se de vegetais, frutas silvestres, ovos e pequenos animais tais como roedores, lagartos, aves e invertebrados (DIETZ, 1984). O que mais aprecia é uma fruta típica da vegetação do cerrado, grande, pesada, de polpa amarela e sabor adocicado, denominada popularmente como fruta do lobo ou lobeira (WIELOCH et al., 1997).

As pernas longas facilitam a locomoção e a visualização sobre a grama alta, vegetação característica do Cerrado, mantendo o corpo acima da mesma, o que lhe proporciona melhor visão do local, maior agilidade ao andar e maior velocidade ao correr (WIELOCH et al., 1997). As grandes orelhas permitem uma audição aguçada e facilidade de localizar pequenos animais sob a vegetação (CARVALHO, 1976).

O desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida em espécies da fauna brasileira que se encontram ameaçadas de extinção, como o lobo-guará, é essencial para garantir a sobrevivência e proliferação destes animais. A utilização de técnicas reprodutivas, associadas à preservação do seu habitat natural, pode possibilitar um aumento do número de indivíduos, auxiliando a sobrevivência da espécie. Tais protocolos de reprodução assistida em machos focam inicialmente a coleta e conservação criogênica de sêmen. Para isto, torna-se necessário um conhecimento básico do testículo e do processo espermatogênico.

No epitélio seminífero um rigoroso arquitetura é observado, à medida que as células da linhagem espermatogênica progridem das camadas mais basais para o lume tubular, uma seqüência de transformações é processada para a formação dos espermatozoides. As diferentes fases por que passam a célula germinativa fazem com que

surjam uma série bem definida de associações celulares ou estádios. Estes estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. O aparecimento cíclico destes referidos estádios constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND & CLERMONT, 1952; SWIERSTRA, 1968; ORTAVANT et al., 1977; RUSSELL et al., 1991). Na quantificação da espermatogênese é fundamental o conhecimento do ciclo do epitélio seminífero, a caracterização dos estádios que o compõem e a determinação da frequência dos mesmos, os quais associados à biometria testicular fornecem a taxa de produção espermática (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; COUROT et al., 1970; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; FRANÇA, 1991).

6.2) Material e Métodos

Foram utilizados fragmentos testiculares obtidos através de biopsia de três lobos-guarás, com idade de 4, 7 e acima de 10 anos mantidos pela Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais e de um lobo-guará de 3 anos de idade mantido pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa.

Para o procedimento cirúrgico e mensuração dos testículos, cada animal foi contido quimicamente, com auxílio de dardos anestésicos, e mantido sob anestesia geral utilizando associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso) e xilazina (1 mg/kg de peso).

Foram feitas tricotomia e antissepsia local do escroto, a pele e a túnica fibrosa foram incisionadas e, com o uso de um punch de pele de 4 mm de diâmetro, obteve-se um fragmento o qual foi imediatamente imerso em solução fixadora de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, à temperatura ambiente, sendo, posteriormente, armazenado sob refrigeração, no mesmo tampão, até o processamento histológico. A albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele foram suturadas individualmente com pontos simples separados, utilizando fio absorvível sintético poliglactina 910 (Vicril®, 3-0 – Ethicon). No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatório (Flunixin Meglumine, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/kg de peso) e antibiótico (penicilina, 20.000 UI/kg de peso).

Todos os fragmentos foram processados para estudos em microscopia de luz e, para tal, foram desidratados em bateria de álcoois de concentrações crescentes (70^o, 80^o, 90^o e 100^o GL) por uma hora cada, infiltrados em dois banhos de resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, *Leica Instruments*) e incluídos, na mesma resina, por adição do catalisador (dimetil sulfóxido). Foram obtidos cortes de quatro micrômetros (4 µm) de espessura em micrótomo rotativo (Reichert - Jung Modelo 2045 Multicut) dotado de navalha de vidro. Estes cortes foram obtidos de forma seriada com intervalos de 40µm, montados sobre lâmina de vidro e corados com Azul de Toluidina – Borato de Sódio a 1% , no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Para determinar a duração do ciclo do epitélio seminífero, as células da linhagem espermatogênicas foram marcadas com solução de 0,1% de timidina tritiada ([metil-³H] timidina) (Amersham, Life Science, England), numa concentração radioativa de 1,0 mCi/ml. Para tal, dois dos animais deste estudo receberam injeções intratesticulares de 0,1 ml de solução de timidina tritiada, diretamente no terço médio do testículo direito. A timidina tritiada é incorporada no núcleo das células germinativas que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente espermatogônias e espermátócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno.

A biópsia para coleta do fragmento foi realizada 7 dias após a injeção de timidina. Para a identificação e acompanhamento da posição das células marcadas pela timidina no epitélio seminífero, foi executado o processamento autoradiográfico. Este processamento consistiu em cobrir algumas das lâminas histológicas não coradas com emulsão fotográfica Kodak NTB-2 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA), em câmara totalmente escura. Estas lâminas foram acondicionadas em caixa à prova de luz e armazenadas em geladeira a 4 °C por 60 dias, período considerado suficiente para a sensibilização dos grãos de prata da emulsão, através do radioisótopo (GUIÃO LEITE, 2002). As lâminas foram reveladas em câmara totalmente escura, com solução aquosa (1:1) de revelador Kodak D-19 durante 6 minutos, à temperatura de 15°C, lavadas em água destilada e fixadas no fixador Kodak F5 durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem e secagem à temperatura ambiente, foram coradas com solução de Azul de toluidina/Borato de sódio e cobertas com lamínulas de vidro para observação em microscópio óptico.

A duração de um ciclo do epitélio seminífero foi calculada através da observação do tipo celular marcado com o radioisótopo mais avançado no epitélio e a frequência dos estádios do ciclo percorrido neste tempo. Os diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero foram analisados segundo o método da morfologia tubular, no qual 8 estádios distintos são observados (PAULA, 1999; GUIÃO LEITE, 2002). A frequência relativa destes foi determinada através da identificação e contagem dos oito estádios, em secções transversais de túbulos seminíferos, em 200 campos aleatórios nas diferentes lâminas de cada animal.

Para o cálculo da produção espermática diária, inferiu-se sobre a população de espermátides arredondadas por grama de testículo, a duração de um ciclo do epitélio seminífero. Sendo que a população de espermátides arredondadas por grama de testículo foi calculada através da população média deste tipo celular por secção transversal de túbulo seminífero (item 5.0) ao longo do comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo (item 4.0).

6.3) Resultados e Discussão

A espermatogênese é definida como um complexo processo de diferenciação e multiplicação celular, no qual uma espermatogônia tronco é gradualmente transformada em uma altamente diferenciada célula haplóide, o espermatozóide (GURAYA, 1987). As diferentes etapas para que este processo seja completado englobam a multiplicação inicial das espermatogônias, conhecido como fase proliferativa, a segregação e recombinação de material genético durante a fase meiótica e a metamorfose observada na transformação de uma espermátide em espermatozóide, conhecida como fase espermiogênica (RUSSELL et al., 1990). Assim, cada vez que uma espermatogônia inicia este processo, um grupo de células é formado e passa a desenvolver-se sincronicamente através da espermatogênese; isto é possível devido à permanência de áreas de continuidade intercelular conhecidas como pontes citoplasmáticas. A presença destas pontes cria um sincício celular denominado geração ou clone espermático (GURAYA, 1987; RUSSELL et al., 1990).

Nos mamíferos, no mesmo ponto do epitélio seminífero, pode-se observar várias gerações concomitantes formando camadas concêntricas da base ao lume tubular, de forma

que a geração mais desenvolvida é liberada no lume ao mesmo tempo em que uma nova geração é formada em sua base (Fig. 1). Cerca de quatro a cinco camadas de gerações em fases distintas são observadas em um corte transversal do túbulo seminífero. Assim, uma geração recém formada necessitará de quatro a cinco etapas ao longo da espessura epitelial, para a sua liberação como espermatozóides no lume tubular. O período de tempo observado entre cada uma destas etapas é denominado ciclo do epitélio seminífero e desta forma, entre quatro e cinco ciclos são necessários para que uma geração complete todo o processo espermatogênico. Ao longo de um ciclo do epitélio seminífero, vários arranjos de desenvolvimento entre as diferentes gerações são observados (Fig. 1). Baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas, oito arranjos são diferenciados e denominados estádios do ciclo do epitélio seminífero (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; COUROT et al., 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; FRANÇA, 1991).

Este método é o mais utilizado para se classificar os estádios do ciclo, e foi designado como método da morfologia tubular por BERNDTSON (1977). Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseada nas características das espermátides, em particular na forma do núcleo e no desenvolvimento do acrossoma. Com este método, no qual os estádios são arbitrariamente definidos, o número de estádios para cada espécie é variado (RUSSELL et al., 1990).

Baseado no método da morfologia tubular foram identificados no lobo-guará, os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, esquematizados em colunas na figura 1 e diferenciados a seguir.

ESTÁDIO 1

Este estágio foi caracterizado pela presença de uma geração de espermátides, com núcleos arredondados e escuros, espermatogônias do tipo A e espermatócitos primários, na transição pré-leptóteno para leptóteno, próximo à membrana basal.

ESTÁDIO 2

No estágio 2, foram observadas espermátides com núcleos em fase de alongamento, espermatócitos primários em leptótenos, localizados próximos à lâmina basal e espermatócitos primários em paquíteno.

ESTÁDIO 3

Neste estágio, as espermátides já se encontram alongadas e formavam feixes compostos por poucos núcleos. Duas gerações de espermatócitos primários estavam presentes neste estágio: espermatócitos em zigóteno e diplóteno.

ESTÁDIO 4

A ocorrência de duas divisões meióticas foi o aspecto mais característico, espermatócitos em diplótenos formam espermatócitos secundários, os quais se dividem produzindo espermátides arredondadas. Feixes de espermátides alongadas e espermatócitos primários na transição zigóteno para paquíteno também foram observados.

ESTÁDIO 5

No estágio 5, duas gerações de espermátides estavam presentes, as espermátides arredondadas recém-formadas e as espermátides alongadas. Estas últimas arranjadas em feixes localizados nas criptas das células de Sertoli. Também foram observados espermatócitos primários na transição de zigóteno para paquíteno entre as espermátides arredondadas e o compartimento basal.

ESTÁDIO 6

Todos os tipos celulares observados no estágio anterior estavam presentes, com exceção dos espermatócitos em zigóteno. O aspecto característico deste estágio foi que os feixes de espermátides estavam, de maneira geral, mais próximos do lume tubular.

ESTÁDIO 7

Neste estágio, os feixes de espermátides alongadas apresentavam-se dissociados e localizados próximos ao lume tubular. Núcleos dos espermatócitos primários em paquíteno foram observados na região média do epitélio; espermatogônias do tipo B, também presentes neste estágio apresentavam nucléolos arredondados ou ovóides e com grande quantidade de heterocromatina.

ESTÁDIO 8

O aspecto mais característico deste estágio foi a localização das espermátides alongadas prontas para serem liberadas do epitélio seminífero. Corpos residuais eram pouco evidenciados e estavam situados na borda luminal do epitélio. Também estavam presentes espermatócitos em paquíteno, espermátides arredondadas, espermatogônias do tipo A e espermatócitos em pré-leptóteno foram observados próximos à lâmina basal.

A frequência relativa de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero de lobo-guará está representada na tabela 1 e na tabela 2 pode-se observar o agrupamento destes estádios nas fases pré-meiótica (estádios 1 ao 3), meiótica (estádio 4) e pós-meiótica (estádio 5 ao 8). A maioria dos animais domésticos apresenta maior frequência da fase pré-meiótica em relação à fase pós-meiótica (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Nos felídeos estudados (onça parda e gato doméstico) a frequência da fase pré-meiótica é equivalente ou superior à fase pós-meiótica (GUIÃO LEITE, 2002; GODINHO, 1999), Já nos canídeos estudados (coiote, cão doméstico) (KENNELLY, 1972; PAULA, 1992) assim como o lobo-guará, observa-se uma menor frequência da fase pré-meiótica em relação à fase pós-meiótica. Em relação à fase meiótica observa-se que os felinos estudados (GUIÃO LEITE, 2002; GODINHO, 1999), apresentam sua frequência duas vezes maior que a mesma observada para o lobo-guará e os demais canídeos estudados (KENNELLY, 1972; PAULA, 1992).

A duração do ciclo do epitélio seminífero e a frequência relativa de seus estádios são constantes biológicas espécies específicas, às qual estão sob o controle do genótipo da célula germinativa (FRANÇA et al., 1998), não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (CLERMONT, 1972; AMANN & SCHANBACHER, 1983). A timidina triciada utilizada é incorporada ao núcleo das células germinativas que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente espermatogônias e espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Portanto, coletou-se fragmentos testiculares aproximadamente 7 dias após a injeção de timidina em dois lobos-guarás, as células marcadas mais avançadas no epitélio seminífero destes animais, foram espermatócitos primários em paquíteno no estágio 6 do ciclo do epitélio seminífero (Fig. 2). Portanto em 7 dias houve uma progressão de cerca de 78% (frequência média dos estádios 1 ao 6) no ciclo do epitélio seminífero, conseqüentemente um ciclo corresponde em média $8,99 \pm 0,3$ dias.

Tabela 1- Frequência relativa e duração dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em lobo-guará adulto.

Estádios	Frequência (%)*	Duração (dias)
1	17 ± 6,0	1,56
2	12 ± 3,0	1,03
3	10 ± 1,0	0,94
4	9 ± 2,0	0,78
5	16 ± 2,0	1,4
6	15 ± 1,0	1,3
7	10 ± 1,0	0,9
8	13 ± 1,0	1,2

*média ± desvio padrão, n=4.

Tabela 2- Frequência relativa e duração das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica do ciclo do epitélio seminífero em lobos-guarás adultos.

	Fase pré-meiótica	Fase meiótica	Fase pós-meiótica
Frequência (%)*	39 ± 11	9,0 ± 2,0	54 ± 4,0
Duração (dias)	3,5	0,78	4,8

* média ± desvio padrão, n=4.

Figura 2- Estádio 6 do ciclo do epitélio seminífero de lobo-guará adulto, após uma semana da aplicação do radioisótopo, demonstrando marcação (setas) autoradiográfica em espermátocitos primários em paquíteno. Azul de toluidina (400X).

Em mamíferos de maneira geral, a duração mais curta do ciclo (6,7 dias) ocorre no roedor “bank vole” (*Cletheriomys glareolus*) (GROCOCK & CLARKE, 1976), enquanto a mais longa citada foi para o gambá (*Didelphis albiventris*, 17,3 dias) (QUEIROZ & NOGUEIRA, 1992). Entre animais domésticos de produção a duração média de um ciclo do epitélio seminífero encontra-se entre 8,6 e 14 dias (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Como aproximadamente 4,5 ciclos são requeridos para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos (AMANN & SCHANBACHER, 1983; FRANÇA & RUSSELL, 1998), a duração média do processo espermatogênico nos mamíferos doméstico de produção varia de 38,7 a 63 dias. O lobo-guará adulto apresenta cerca de 40,45 dias de duração total do processo espermatogênico, valor muito próximo ao observado para a onça parda e o gato doméstico (GUIÃO LEITE, 2002; GODINHO, 1999), porém, cerca de 30%

menor do que os valores observados para o coiote e o cão doméstico (KENNELLY, 1972; FOOTE et al., 1972).

A espermiogênese refere-se ao processo de transformação da espermatíde arredondada em espermatozóide. Como a espermatíde é formada no estágio 5 e liberada no estágio 8 do ciclo seguinte do epitélio seminífero, a sua duração média em lobos-guarás foi de 12,3 dias, menor do que os valores observados para os outros canídeos estudados (21,1 dias no cão e 19,9 dias no coiote) (KENNELLY, 1972; FOOTE et al., 1972).

A produção espermática diária por grama de testículo é o parâmetro mais efetivo e de fácil comparação entre as espécies, pois elimina a disparidade exercida pelo peso testicular e a duração da espermatogênese. A eficiência espermatogênica em mamíferos é dependente principalmente da duração da espermatogênese, da densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo, do número de gerações de espermatogônias e da eficiência do processo espermatogênico (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

A produção espermática representa a produção de espermatozoides por grama de testículo/dia. Partindo-se do pressuposto que durante o processo espermiogênico não há perdas significativas (RUSSELL & CLERMONT, 1977), o número de espermatídes arredondadas computadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero do lobo-guará foi considerado como a população de espermatozoides. A população de espermatídes arredondadas por secção transversal de 40m de túbulo seminífero em lobo-guará foi em média 57,6 células (item 5.0), e foi computado cerca de 17,93 metros de túbulo por grama de testículo (item 4.0). Assim um montante de $258,2 \times 10^6$ espermatozoides são produzidos por grama de testículo em lobo-guará, como este montante é produzido durante um ciclo do epitélio seminífero que dura cerca de 8,99 dias, cerca de $28,7 \times 10^6$ espermatozoides são produzidos por grama de testículo por dia em lobo-guará.

A análise da literatura permite agrupar a produção espermática diária por grama de testículo em três patamares: espécies com alta eficiência espermatogênica e que produzem cerca de vinte a trinta milhões de espermatozoides, incluindo-se aí animais domésticos como o suíno, equino, ovino e o coelho (FRANÇA & RUSSELL, 1998), o rato (ROBB et al., 1978), o macaco rhesus (AMANN et al., 1976) e a onça parda (GUIÃO LEITE, 2002); espécies com eficiência espermatogênica média, produzindo de dez a vinte milhões de espermatozoides, dentre as quais se encontram o bovino e o búfalo (FRANÇA &

RUSSELL, 1998), o gato doméstico (GODINHO, 1999) e a capivara (PAULA, 1999); e por último, espécies que produzem abaixo de dez milhões de espermatozoides como, por exemplo, o homem (AMANN, 1981) e o gambá (*Didelphis albiventris*) (QUEIROZ & NOGUEIRA, 1992). Conforme pode ser observado, lobo-guará, com produção diária de aproximadamente vinte e nove milhões de espermatozoides por grama de testículo $\times 10^6$, encontra-se entre as espécies de alta eficiência espermatogênica.

6.3) Referências Bibliográficas

AMANN, R. P., JOHNSON, L., THOMPSON JR, D. L. PICKETT, B. W. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal teserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. *Biol. Reprod.* n.15, p. 586-592, 1976.

AMANN, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* n. 2, p.37-58, 1981.

AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction, *J. Anim. Sci. Suppl.*, v. 57, n. 2, p. 380 – 403, 1983.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.*, n. 44, v. 5, p. 818 – 83, 1977.

CARVALHO, C. T. Aspectos faunísticos do cerrado – o lobo-guará (Mammalia, Canidae). *Boletim técnico (Instituto Florestal)*, n. 21, p. 1 – 16, São Paulo, 1976.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* n. 52, v. 1, p. 198-236, 1972.

- COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (ed.). *The testis*. New York: Academic Press, v.1, cap. 6, p. 339 - 432, 1970.
- DIETZ, J. M. Ecology and Social Organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*), *Smithsonian Contribution to Zoology*, n. 392, 50 p., ed. Smithsonian Institution Press, Washington, 1984.
- FOOTE, R. H.; SWIERSTRA, E. E.; HUNT, W. L. Spertogenesis in dog. *Anat. Rec.* v. 173, n. 3, p. 341-352, 1972.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.
- FRANÇA, L. R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F., REGADERA, J. (ed). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*, Churchill Communications, cap. 16, p. 197 – 219, 1998.
- FRANÇA, L. R., OGAWA, T., AVARBOCK, M. R., BRINSTER, R. L., RUSSELL, L. D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* n. 59, p. 1371-1377, 1998.
- GODINHO, C. L. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 124p. Dissertação (Mestrado em Morfologia), 1999.
- GROCOCK, C. A. & CLARK, J. R. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Cleterionomys glareolus*). *J. Reprod. Fertil.* n. 47, p. 133-135, 1976.

- GUERRA, M.O. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Rev. Bras. Biol.*, v.43, n.4, p.385-394, 1983.
- GUIÃO LEITE, F. L. Análise morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta, Viçosa: Departamento de veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV, 65p. Dissertação (Mestrado em Morfologia), 2002.
- GURAYA, S. S. Seminiferous epithelium, In: GURAYA, S. S., *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*, ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987.
- KENNELLY, J. J. Coyote reproduction. I. The duration of the spermatogenic cycle and epididymal sperm transport. *J. Reprod.Fert.* n . 31, p. 163-170, 1972.
- LEBLOND, C.P. & CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, n. 55, :p. 48-584, 1952.
- ORTAVANT, R., COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. (eds). *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. Cap. 8, p.203-227, 1977.
- PAULA, T.A.R. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade. Belo Horizonte: UFMG, 62p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1992.
- PAULA, T.A.R. *Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (Hydrochoerus hydrochaeris)*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia), 1999.

- QUEIROZ, G. F. & NOGUEIRA, J. C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Reprod. Fertil.* n. 4, p. 213-222, 1992.
- ROBB, G. E., AMANN, R. P., KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* n. 54, p. 103-107, 1978.
- ROOSEN-RUNGE, E.C., GIESEL, Jr. L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.*, v. 87, n.1, p.1-30, 1950.
- RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA-HIKIM, A. P., CLEGG, E. D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida, 1990.
- RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater, FL, Cache River Press, 286p. 1991.
- RUSSELL, L.D., CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.*, v. 187, p. 347 - 366, 1977.
- SWIERSTRA, E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat. Rec.*, v. 161, p.171-186, 1968.
- WIELOCH, D. R., VEADO, B. V., FURTADO, D. B. *Cadernos da Fundação Zoo-Botânica I - Animais do Zoológico*, Fundação ZooBotânica de Belo Horizonte, Serviço de educação ambiental, Belo Horizonte, p. 235, 1997.

7.0) CONCLUSÕES GERAIS

- 1 – O lobo-guará apresenta pequena alocação do peso corporal em massa testicular, sendo o índice gonadossomático (IGS) de 0,04%, sendo também observado em espécies que apresentam o comportamento reprodutivo monogâmico.
- 2 – Cerca de 79,3% do parênquima testicular corresponde à túbulos seminíferos, o que exprime um investimento de 0,03% da massa corporal, sendo este o índice tubolossomático, abaixo dos valores encontrados para carnívoros domésticos.
- 3 – As fases espermatogonial e de divisões meióticas são as que apresentam as maiores perdas celulares. Estas degenerações fazem com que o índice de células de Sertoli por espermatídes arredondadas (7,6:1,0), o coeficiente de mitoses espermatogoniais (12,0:1), o rendimento meiótico (1,9:1) e o rendimento geral da espermatogênese (22,6:1) sejam baixos ou próximos ao observados no cão doméstico.
- 4 - A composição celular dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, classificados pelo método da morfologia tubular, apresenta um padrão muito próximo do observado para a maioria das espécies investigadas.
- 5 – As frequências relativas das fases pré-meióticas, meiótica e pós-meiótica foram respectivamente 3,5; 0,78 e 4,8 dias.
- 6 – O lobo-guará produz aproximadamente vinte e nove milhões de espermatozóides por grama de testículo/dia, sendo classificado entre as espécies de alta eficiência espermatogênica, quando comparado com os valores encontrados para a maioria dos mamíferos investigados.
- 7 - A duração do ciclo do epitélio seminífero em lobo-guará (8,99 dias), bem como a duração total do processo espermatogênico (40,45 dias), estão abaixo quando comparados com o cão doméstico e o coiote.

ANEXO

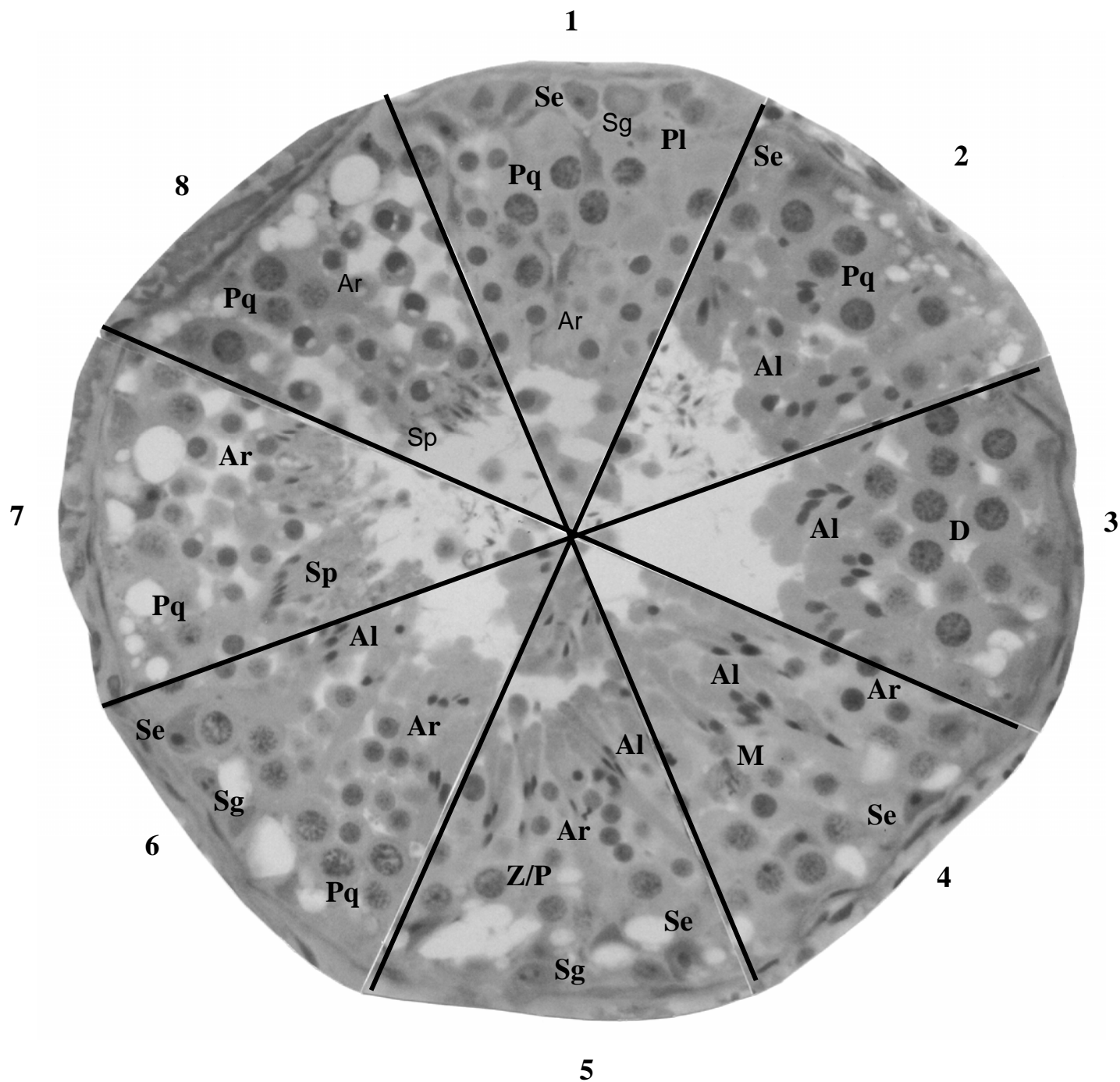


Figura 1- Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero do lobo-guará. Estádio 1 (1); estágio 2 (2); estágio 3 (3); estágio 4 (4); estágio 5 (5); estágio 6 (6); estágio 7 (7); estágio 8 (8). Célula de Sertoli (Se); espermatogônia (Sg); espermatócito primário na transição pré-leptótene/leptótene (Pl); espermatócito primário na transição zigótene/paquítene (Z/P); espermatócito primário em paquíteno (Pq); espermatócito primário em diplótene (D); placas metafásicas (M); espermátides arredondadas (Ar); espermátides alongadas (Al); espermatozóides (Sp). Azul de toluidina (400X).