

CITOLOGIA TESTICULAR DE GRAXAIM-DO-CAMPO (*Lycalopex gymnocercus*)

KAREN CRISTINE DE ALBUQUERQUE FERREIRA PEREIRA¹; FABIANE DE HOLLEBEN CAMOZZATO FADRIQUE²; CARINE DAHL CORCINI³; RAQUELI TERESINHA FRANÇA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – karencafperreira@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fadriquefabiane@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - raquelifranca@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A citologia testicular realizada através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) possui como vantagens ser um procedimento minimamente invasivo, rápido, barato, menos doloroso do que a biópsia (SANTOS *et al.*, 2010) e não gera efeitos adversos na espermatogênese (James *et al.*, 1979). Além disso, permite múltiplas amostras de diferentes áreas do testículo, tornando-a muito mais representativa (ARIDOGAN *et al.*, 2003). Pode ser utilizada para avaliação da espermatogênese, baseada na presença e quantificação de células germinativas e células de sertoli em cães e gatos domésticos (SANTOS *et al.*, 2010; LEME *et al.*, 2018)

Estudos com espécies de canídeos silvestres como o Graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), uma das encontradas no Rio Grande do Sul, ainda não foram realizados. O Graxaim-do-campo é uma espécie bastante comum no Estado, ocupam principalmente campos de cima da serra e pampas, estando ausentes apenas em regiões densamente florestadas (WEBER; ROMAN; CÁCERES, 2013). São onívoros e sua alimentação varia geograficamente (LUCHERINI; VIDAL, 2008). Seu período de atividade pode ser tanto noturno quanto diurno, geralmente forrageando sozinho ou em pares (WEBER; ROMAN; CÁCERES, 2013). Seu período reprodutivo vai de julho a outubro; e os filhotes começam a nascer na primavera, entre setembro/outubro até dezembro (LUCHERINI; VIDAL, 2008).

Apesar de estar classificada como menos preocupante quanto ao risco de extinção (LUCHERINI, 2016), é uma das espécies que apresentam maior número de vítimas de atropelamento nas estradas do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA; SILVA, 2012; PASSOS *et al.*, 2021). Além disso, canídeos silvestres por serem espécies topo de cadeia alimentar, na sua ausência, podem causar um desequilíbrio no ecossistema (DUARTE, 2007). Com isso, o estudo sobre características reprodutivas da espécie, torna-se fundamental para a sua preservação.

O objetivo do trabalho foi identificar as células espermatogênicas e quantificar o índice espermático (SI) e o índice de células de Sertoli (SEI) de graxains-do-campo vítimas de atropelamento, através da citologia aspirativa por agulha fina.

2. METODOLOGIA

Entre o período de 23 de maio a 8 de agosto de 2023, foram encontrados quatro graxains-do-campo, machos, jovens/adultos, mortos vítimas de atropelamento na BR-293, no município do Capão do Leão/RS. Os animais tiveram uma ficha de cadastro preenchida, onde foram coletados dados individuais para determinação aproximada da idade e do tempo de morte. Foram coletados os testículos e realizado a citologia através da PAAF.

Após a coleta do material foram realizadas as lâminas pelo método de *squash*, coradas com coloração rápida do tipo Romanowsky e analisada em microscópio. As células foram classificadas em células de Leydig, Células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos primários, espermatídes iniciais, espermatídes tardias e espermatozóides. A avaliação citológica foi realizada contando 500 células por lâmina para determinação do índice espermático (número de espermatozóides por 100 células espermatogênicas) e do índice de células de Sertoli (número de células de Sertoli por 100 células espermatogênicas), conforme a metodologia utilizada por Santos *et al.* (2010).

Todas as amostras foram coletadas após a concessão da autorização do SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) sob nº 87773-1 e CEUA/UFPEL (Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas) sob nº 70/23.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar dos animais terem vindo à óbito em um intervalo estimado de 12 a 24 horas, as células estavam bem preservadas, possibilitando a identificação das mesmas com precisão. Das diferentes células encontradas, a de Leydig, caracterizada por núcleo arredondado com presença de nucléolo e citoplasma abundante com grande quantidade de vacúolos, foi a única não identificada na avaliação citológica, como observou Leme *et al.* (2018), em felinos domésticos. Segundo o mesmo autor, a ausência nas lâminas de PAAF podem ocorrer por essas células sofrerem danos durante a aspiração ou realização do esfregaço ou por serem fortemente ligadas ao interstício. Já as células de Sertoli foram facilmente diferenciadas sendo células grandes, maiores que os espermatócitos primários, como descrito em cães por Santos *et al.* (2010). Seu citoplasma era dificilmente observado, o núcleo grande e arredondado, ligeiramente granulado, apresentando um nucléolo de coloração mais escura (DAHLBOM *et al.*, 1997). Das células espermatogênicas, a espermatogônia foi visualizada poucas vezes, mas segundo Santos *et al.* (2010), são difíceis de encontrar nas lâminas pois são escassas comparadas a outras mais diferenciadas como os espermatócitos e espermatídes. Assim como em cães, também apresenta no núcleo uma condensação de cromatina de formato semilunar. Os espermatócitos primários foram facilmente observados e diferenciados, sendo as maiores células espermatogênicas, cujo o núcleo possui um tamanho pouco menor do que o das células de Sertoli, apresenta um padrão de cromatina em forma de cordão e ocasionalmente, apresentou-se multinucleada, como visto por Santos *et al.* (2010). As espermatídes foram as células mais encontradas nos animais avaliados, possuindo um tamanho menor que as anteriores, a espermatíde inicial apresentou um núcleo arredondado e a espermatíde tardia um núcleo mais alongado e condensado. Sendo as espermatídes iniciais frequentemente multinucleadas (SANTOS *et al.*, 2010). E os espermatozóides foram facilmente identificados.

As contagens celulares estão descritas na tabela 1, e foram divididas em três grupos: espermatozóides maduros (Z), células espermatogênicas (S) e células de Sertoli (SE), e através desses valores foram calculados os índices, espermático (SI) e de células de Sertoli (SEI).

Tabela 1. Quantificação de células testiculares através da citologia realizada por aspiração com agulha fina em quatro espécimes de Graxaim-do-campo.

Animal	Mês	Nº de Z	Nº de S	Nº SE	SI	SEI
1	Maio	14	404	96	3,46	23,76
2	Junho	6	442	58	1,35	13,12
3	Julho	58	467	33	12,41	7,06
4	Agosto	125	445	55	28,08	12,35

As células foram agrupadas em espermatozóides maduros (Z), células espermatogênicas (S), células de Sertoli (SE), índice espermático (SI) e índice de células de Sertoli (SEI).

A quantificação do SEI ajuda a simplificar a interpretação dos resultados da citologia e a estimar o potencial de células germinativas (FORESTA; VAROTTO, 1992). Os resultados demonstraram um valor superior aos encontrados em cães, cujo a média foi de 4,21 (SANTOS *et al.*, 2010), no entanto apresentou bastante variação entre os indivíduos, podendo estas, ter ou não relação com o período reprodutivo desses animais.

O SI define o produto final do testículo, demonstrando a eficácia da etapa final de maturação e espermiogênese (PAPIC *et al.*, 1988), e os valores podem ser relacionados com os meses em que esses animais foram encontrados de acordo com o período reprodutivo. A partir de julho é possível ver o aumento desse índice, sendo que em agosto o mesmo foi ainda maior. Segundo Lucherini e Vidal (2008), a massa e dimensão dos testículos desses indivíduos variam de acordo com a época, sendo que eles atingem o seu máximo no mês de agosto, o que pode indicar o valor ainda maior desse índice no animal encontrado nesse mesmo mês. Além disso, o valor do animal encontrado no mês de agosto, foi similar aos valores demonstrados em cães por Santos *et al.* (2010), no entanto, ainda não é possível definir um valor de referência para essa espécie.

4. CONCLUSÕES

A morfologia das células de graxains-do-campo analisadas, foram bastante semelhantes as encontradas em cães domésticos, no entanto houve grande diferença nos índices espermático e de células de Sertoli encontrados nessas duas espécies, o que pode estar relacionado com a época reprodutiva desses animais, com isso, é importante a continuação do estudo para maior compreensão sobre as características reprodutivas e estabelecimento de valores de referência para a espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIDOGAN, L. A.; BAYAZIT, Y.; YAMAN, M.; ERSOZ, C.; DORAN, S. Comparison of fine-needle aspiration and open biopsy of testis in sperm retrieval and histopathologic diagnosis. **Andrologia**, v. 35, p. 121-125, 2003.

DAHLBOM, M.; MAKINEN, A.; SUOMINENT, J. Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in dog infertility. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 506-512, 1997.

DUARTE, F. H. **Helmintofauna em *Cerdocyon thous* LINNAEUS, 1766 (CARNIVORA, CANIDAE) na região de Juiz de Fora, Minas Gerais.** 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

FORESTA, C.; VAROTTO, A. Assessment of cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the oligospermic subject. **Fertil Steril**, v. 58, p. 1028-1033, 1992.

JAMES, R. W.; HEYWOOD, R.; FOWLER, D. J. Serial percutaneous testicular biopsy in the beagle dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 20, p. 219-228, 1979.

LEME, D. P.; VISACRE, E.; CASTRO, V. B.; LOPES, M. D. Testicular cytology by fine needle aspiration in domestic cats. **Theriogenology**, v. 106, p. 46-52, 2018.

LUCHERINI, M. 2016. *Lycalopex gymnocercus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T6928A85371194. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T6928A85371194.en>. Accessed on 14 August 2023.

LUCHERINI, M.; VIDAL, E. M. L. ***Lycalopex gymnocercus* (Carnivora: Canidae).** *Mammalian Species*, v. 820, p. 1-9. 2008.

OLIVEIRA, D. S.; SILVA, V. M. Vertebrados silvestres atropelados na BR-158, RS, Brasil. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 4, p. 229-235, 2012.

PAPIC, Z.; KATONA, G.; SKRABALO, Z. The cytologic identification and quantification of testicular cell types. **Acta Cytol**, v. 32, p. 697-706, 1988.

PASSOS *et al.* Atropelamento de animais silvestres na rodovia BR-158, RS, Brasil. In: **XXVI SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, Cruz Alta, 2021, Ciência e inovação em um mundo em transformação, Cruz Alta: Pró-reitoria de pós-graduação, pesquisa e extensão, 2021.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; CANIATTI, M. Cytologic study of normal canine testis. **Theriogenology**, v. 73, p. 208-214, 2010.

WEBER, M. M.; ROMAN, C.; CÁCERES, N. C. **Mamíferos do Rio Grande do Sul.** Santa Maria: Editora UFSM. 2013. 556p.