GABRIELA SIQUEIRA MARTINS

**Sobre hormônios e lobos: marcos da história de vida do
lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sob a perspectiva
endócrino-reprodutiva.**

São Paulo
2020

GABRIELA SIQUEIRA MARTINS

Sobre hormônios e lobos: marcos da história de vida do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sob a perspectiva endócrino-reprodutiva.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3928 FMVZ	<p>Martins, Gabriela Siqueira Sobre hormônios e lobos: marcos da história de vida do lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) sob a perspectiva endócrino-reprodutiva / Gabriela Siqueira Martins. – 2020. 102 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.</p> <p>1. Lobo-guará. 2. Testosterona. 3. Estradiol. 4. HAM. 5. Sazonalidade reprodutiva. I. Título.</p>
-----------------	--

ERRATA

MARTINS, G. S. **Sobre hormônios e lobos**: marcos da história de vida do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sob a perspectiva endócrino-reprodutiva. 2020. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Página	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	103 f.	102 f.
ABSTRACT	103 f.	102 f.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desvendando etapas da história de vida do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*): correlatos hormonais do desenvolvimento reprodutivo", protocolada sob o CEUA nº 1289140318 (ID 006440), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira e equipe; Gabriela Siqueira Martins** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/04/2019.

We certify that the proposal "Unveiling stages of maned wolf's (*Chrysocyon brachyurus*) life history: hormonal correlates of reproductive development", utilizing 100 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 1289140318 (ID 006440), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira and team; Gabriela Siqueira Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/17/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2016** a **11/2019**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Espécies silvestres brasileiras**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 13 anos**

N: **100**

Linhagem: ***Chrysocyon brachyurus***

Peso: **5 a 30 kg**

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: Licenciamento (2004 a 2007) : 02001004146/03-09 SisBio (2007-2016): 11124, 11124-1, 11124-2, 11124-3, 11124-4, 11124-5, 11124-6, 11124-7, 11124-8, 11124-9, 11124-10. SisBio (Específica do projeto): 62300

Método de Captura: Os animais foram capturados durante as expedições de rotina da esqui de CENAP, ao longo de 12 anos. As capturas eram feitas através de armadilhas com iscas de frango e peixe. As armadilhas eram chegadas diariamente. Uma vez capturado o animal passava por contenção anestésica com a utilização de tiletamina-zolazepan (4mg/kg; Telazol), IM. Os animais passavam eram continuamente monitorados e passavam por exame físico e procedimento de coleta de amostras biológicas. Após os procedimentos a recuperação anestésica de cada animal era monitorada de perto, dentro da armadilha. Uma vez que o animal se apresentasse desperto e alerta a armadilha era aberta e o animal solto na mesma área da sua captura.

Local do experimento: Coleta das Amostras: Parque Nacional de Serra da Canastra- MG Processamento e análise das amostras: Laboratório de Dosagens Hormonais -FMVZ-USP

São Paulo, 17 de abril de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Gabriela Siqueira

Título: Sobre hormônios e lobos: marcos da história de vida do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sob a perspectiva endócrino-reprodutiva.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Ofereço, em memória da vó Rosita
que sempre torceu por mim.
Eis o final desta empreitada.
Eu te amo, vó.

Dedico, a quem me ensinou sobre resiliência e perseverança,
(**meu amigo**)
o lobo-guará.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais **Beatriz e Moacir**, que não hesitaram em fornecer todo apoio, suporte e incentivo do mundo sem nunca duvidar da minha capacidade ou do caminho que eu escolhi. Vocês são meu alicerce e meu porto seguro.

A minha irmã **Carolina**, que do seu jeitinho delicado me ensinou a nunca duvidar de mim e ao meu irmão **André** pelo apoio a distância. Eu amo vocês!

Agradeço a **vó Ruth** pelo carinho, dedicação e orações em meu favor. Ao **vô Fernando** por ser de longe o maior incentivador e entusiasta da minha carreira acadêmica (espero que esta tese encha você de orgulho, vô!). Vocês são o grande amor da minha vida.

Agradeço também às partes de meu coração que já partiram: **vô Manuel**, meu eterno anjo da guarda; e a **vó Rosita**, que acompanhou essa minha jornada quase que inteiramente, sempre cheia de carinho e orgulho. Obrigada por estarem comigo mesmo quando não estão. Eu amo vocês mais que ontem e menos que amanhã. Sempre.

Agradeço a toda **minha família**, tios, tias, primos e primas, quase-sobrinhos, agregados e afins (são muitos nomes e ai de mim se esquecesse de alguém). Muitos dos momentos mais prazerosos e das memórias mais queridas destes últimos quatro anos foram com vocês.

Agradeço ao **Murilo** pelos (quase) dez anos de parceria. Obrigada por me apoiar, me confortar e me dar puxões de orelha quando necessário. Por estar sempre ao meu lado nos altos e baixos. Eu amo você (mas você já sabe disso).

Agradeço aos meus amores peludos **Minhoca, Kraken, Brambris, Pépe, Cabeção, Robin e Fumaça**, meus silenciosos (às vezes nem tanto) companheiros durante as longas horas na frente do computador (e também os principais motivos para pausas).

Agradeço as velhas amigas “de fora” da academia (**Babu, Ana, Bella, Livia e Iaci**), que pacientemente me ouviram falar dos altos e baixos do meu trabalho e, mesmo sem compreenderem totalmente sempre me incentivaram.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Claudio Alvarenga de Oliveira** por me acolher de braços abertos e cheio de entusiasmo. Obrigada pelas longas conversas e por todo o incentivo. Por permitir que minha curiosidade acadêmica crescesse livre. O senhor será sempre um grande exemplo para mim.

Agradeço a minha grande amiga e colega doutoranda **Gisela**, uma das melhores surpresas que este doutorado me proporcionou. Gi, sem você esta tese não seria nem metade do que é. Obrigada por toda a parceria, pelas discussões científicas ou não, pelas risadas e piadas internas, pelo apoio técnico e emocional. Você me fez uma pesquisadora

e pessoa melhor. Só não te escrevo uma página inteira de agradecimentos porque não quero cansar os leitores.

Agradeço a toda equipe do **Laboratório de Dosagens Hormonais** da USP, em especial á **Priscila** que sempre me apoiou e ajudou com todo o carinho e paciência do mundo. Aprendi demais com você, Pri!

I would like to thank **Dr. Nucharin Songsasen** for the amazing 9 months at Smithsonian Conservation Biology Institute. Without your help and guidance this thesis wouldn't be possible. Thank you for all your patience and wiliness to help me and for everything you've taught me. I would also like to give a big shout out to Gamete Lab team: **Marcia, Jen, Julie, and Megan**. I miss you all.

Agradeço a toda a esquipe do **CENAP**, em especial a **Rose**, ao **Rogério** e ao **Ronaldo**, por confiarem em mim e na minha premissa e fornecerem todas as amostras que fizeram dessa pesquisa realidade.

Agradeço ao **Departamento de Reprodução Animal** da USP, em especial a **Harumi** pelo trabalho impecável.

Por fim agradeço aos órgãos de fomento que possibilitaram este trabalho: a **CAPES** pela bolsa de auxílio e a **Comissão Fulbright Brasil** pela bolsa de doutorado sanduíche.

Circle of Life

From the day we arrive on the planet
And blinking, step into the sun
There's more to be seen than can ever be seen
More to do than can ever be done

Some say eat or be eaten
Some say live and let live
But all are agreed as they join the stampede
You should never take more than you give

In the circle of life
It's the wheel of fortune
It's the leap of faith
It's the band of hope
'Til we find our place
On the path unwinding
In the circle, the circle of life

Some of us fall by the wayside
And some of us soar to the stars
And some of us sail through our troubles
And some have to live with the scars

There's far too much to take in here
More to find than can ever be found
But the sun rolling high through the sapphire sky
Keeps great and small on the endless round

In the circle of life
It's the wheel of fortune
It's the leap of faith
It's the band of hope
'Til we find our place
On the path unwinding
In the circle, the circle of life

It's the wheel of fortune
It's the leap of faith
It's the band of hope
'Til we find our place
On the path unwinding
In the circle, the circle of life

On the path unwinding, yeah
In the circle, the circle of life

(Elton John - The Lion King)

RESUMO

MARTINS G. S. **Sobre hormônios e lobos: marcos da história de vida do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sob a perspectiva endócrino-reprodutiva.** [About hormones and wolves: stages of the maned wolf's (*Chrysocyon brachyurus*) life history from an endocrine reproductive perspective]. 2020. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2020.

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é considerado uma espécie chave dentro do cerrado, sendo frequentemente citado como um excelente candidato a espécie-bandeira ou espécie guarda-chuva para a proteção deste bioma ameaçado. Independentemente deste fato, atualmente as populações naturais de lobos-guará encontram-se em delicado período de declínio, sendo classificada como “Quase Ameaçada” mundialmente. Em cativeiro, baixas taxas de concepção e alta mortalidade de filhotes impedem o estabelecimento de populações autossustentáveis. Em termos gerais, esta tese visou contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva do lobo-guará como parte do esforço conjunto para conservação desta espécie. O primeiro manuscrito deste documento foi estruturado como uma revisão do conhecimento atual acerca da biologia reprodutiva da espécie. Nele foram revistados os aspectos clássicos da biologia da espécie tal qual o solitarismo, a monogamia e a sazonalidade reprodutiva, como também discutidas características recém-descobertas como a presença de ovulação induzida. Ao fim desta revisão, destacamos as principais lacunas de conhecimento acerca da história de vida da espécie, entre elas: a idade a puberdade; a senescência reprodutiva; e a ainda rara caracterização da função gonadal sob condições naturais. Os manuscritos seguintes cuidaram de endereçar estas questões pelo viés endócrino-reprodutivo através da técnica de ensaio imunoenzimático. Para tanto foram utilizadas amostras de soro de lobos-guará de vida livre de diferentes idades (3 meses a 12 anos) provenientes de um banco de recursos genéticos. O segundo manuscrito teve por foco a caracterização perfis de testosterona e estradiol em diferentes categorias etárias afim de delimitar a janela da maturidade sexual para a espécie. Ademais, também foi objeto de avaliação o comportamento destes hormônios sazonalmente e o possível - e até então inédito - efeito dos padrões de chuva regionais sobre o estabelecimento e duração da estação

reprodutiva. Os resultados obtidos sugerem que, em concordância com dados observacionais, a puberdade ocorre entre o primeiro e o terceiro anos de vida. Adicionalmente, nossos resultados também reafirmaram o padrão endócrino-reprodutivo sazonal centrado nos dias curtos de outono característico da espécie. Contudo, a ocorrência de um segundo período de elevação nas contrações hormonais durante a primavera sugere que o início da estação chuvosa (setembro-outubro) possa atuar como um gatilho para o início precoce da atividade reprodutiva. Os dois momentos de alta hormonal encontrados em épocas diferentes do ano, podem implicar na possibilidade poliestria além de serem uma possível consequência da ocorrência de ovulação induzida nas fêmeas desta espécie. Por fim, no terceiro manuscrito apresentamos o primeiro relato da mensuração de hormônio anti-Mülleriano (HAM) em um canídeo selvagem, assim como discutimos a validade da sua utilização como marcador da função ovariana. Aqui, encontramos diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações séricas de fêmeas imaturas e maduras, reafirmando a janela de puberdade do manuscrito anterior. Nas fêmeas maduras, diferenças sazonais nas concentrações de HAM foram identificadas, com fêmeas dentro de estação reprodutiva apresentando concentrações mais elevadas do que aquelas fora de estação reprodutiva. Enfim, embora o HAM seja um reconhecido marcador da senescência ovariana, não foi detectada queda em suas concentrações associada ao envelhecimento de modo que a caracterização da senescência reprodutiva continua em aberto para a espécie. Em conclusão, consideramos que ao mesmo tempo que esta tese contribuiu para seu propósito de elucidar parte história de vida do lobo-guará, ela provou que este ainda é um território carente de exploração: a partir de nossas análises conseguimos prover informações importantes a respeito da puberdade e da sazonalidade reprodutiva da espécie, além de provarmos o potencial do HAM como marcador da função ovariana. Ao mesmo tempo dúvidas importantes foram levantadas acerca da influência de fatores ambientais sobre a reprodução de populações selvagens, da possível ocorrência de poliestria ou ainda da flexibilização da estação reprodutiva.

Palavras-chave: lobo-guará, testosterona, estradiol, HAM, puberdade, sazonalidade reprodutiva, senescência.

ABSTRACT

MARTINS G. S. **About hormones and wolves: stages of the maned wolf's (*Chrysocyon brachyurus*) life history from an endocrine-reproductive perspective.**

[Sobre hormônios e lobos: marcos da história de vida do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) sob a perspectiva endócrino-reprodutiva]. 2020. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2020.

The maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) is considered a key species within its main habitat, the cerrado, and is often cited as an excellent flagship or umbrella species candidate for the protection of this threatened biome. Regardless of that fact, currently the natural populations of maned wolves are in a delicate period of decline, being classified as "Near threatened" worldwide. In captivity, low conception rates and high infant mortality prevent the establishment of self-sustaining populations. Overall, this thesis aimed to contribute to a better understanding of the maned wolf's reproductive physiology as part of the joint efforts to conserve this species. The first manuscript was structured as a review of current knowledge about the species' reproductive biology. For that, classic aspects of the species' biology such as its solitary habits, monogamy and reproductive seasonality were revisited. We also discussed recently discovered characteristics like the occurrence of induced ovulation. At the end of this very review, main gaps in knowledge about the species' life history were highlighted, including age and puberty, reproductive senescence, and the (still rare) characterization of gonadal function under natural conditions. The following manuscripts aimed to address such issues through an endocrine-reproductive perspective using enzyme immunoassays. For this purpose, banked serum samples of free-living maned wolves of different ages (3 months to 12 years) were used. The second manuscript is focused on the characterization of testosterone and estradiol profiles in different age categories in order to delimit sexual maturity window for the species. In addition, we also evaluated the seasonal fluctuations of these hormones and the possible (and until now unprecedented) effect of regional rainfall patterns on the establishment and duration of the reproductive season. Our results suggest that, in agreement with observational data, puberty occurs between the first and third years. Additionally, our results also reaffirmed the species' typical seasonal

endocrine-reproductive pattern centered on the short autumn days. However, a second period of increase in hormonal contractions was observed during the spring, suggesting that the beginning of the rainy season (September- October) may act as a trigger for the early onset of reproductive activity. The two moments of high hormone found at different times of the year, may also imply the possibility of polyestrous, being a possible consequence of the occurrence of induced ovulation in this species. Finally, in the third manuscript we present the first report of the measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) in a wild canid, as well as examined the validity of its use as a marker of ovarian function. In this study, we found a significant difference ($p < 0.05$) between the serum concentrations of immature and mature females, reaffirming the puberty window of the previous manuscript. In mature females, seasonal differences in AMH concentrations were identified, with females within the breeding season showing higher concentrations than those outside the breeding season. Finally, although AMH is often used as marker of ovarian senescence, no drop in its concentrations was detected associated with aging in our samples, so that the characterization of reproductive senescence remains open for the species. In conclusion, while this thesis contributed to its purpose of elucidating part of the maned wolf's life history, it also proved that this is still a territory in need of exploration: from our analysis we were able to provide important information about the puberty and the reproductive seasonality of the species, in addition to proving the potential of AMH as a marker of ovarian function. At the same time, important questions about the influence of environmental factors on the reproduction of wild populations, the possible occurrence of polioestrus or even the flexibilization of reproductive seasons were raised.

Key-words: Maned wolf, AMH, oestradiol, testosterone, puberty, reproductive seasonality, senescence.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I.

- Tabela 1.** Características seminais de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) adultos de acordo com origem (cativeiro e vida-livre), período (dentro e fora de estação reprodutiva) e metodologia de coleta seminal (EEJ – Eletroejaculação; MD – Manipulação digital). 24
- Tabela 2.** Características seminais de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) submetidos a eletroejaculação, de acordo com origem (vida livre ou cativeiro) e idade. Adaptado de Songsasen et al. 2014. 24

Capítulo II.

- Tabela 1.** Resultados dos modelos lineares mistos testando a influência das variáveis preditoras (categoria etária, status reprodutivo e período do ano) sobre os níveis de testosterona sérica (log-transformados) em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) machos. 51
- Tabela 2.** Resultados dos modelos lineares mistos testando a influência das variáveis preditoras (categoria etária, status reprodutivo e período do ano) sobre os níveis de estradiol sérico (log-transformados) em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) fêmeas 55
- Apêndice A.** Correlação dos postos pluviométricos utilizados para aquisição de dados meteorológicos da região do Parque Nacional de Serra da Canastra (Fonte: Agência Nacional de Águas, Sistema Nacional de Recursos Hídricos). 73
- Apêndice B.** Comparação de modelos de variação de estradiol e testosterona em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de vida livre, com todos os modelos candidatos (AICc < 2,0) e modelo nulo. 74

Capítulo III.

- Apêndice A.** Dados de leitura de ensaio imunoenzimático para dosagem de HAM (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) fêmeas. 97
- Apêndice B.** Médias ($\pm$ EPM) e variações das concentrações circulantes de HAM de acordo com status de maturidade (Imaturas: ≤ 1 ano, Maduras: < 1 ano) e sazonalidade (ER: estação reprodutiva; ENR: estação não reprodutiva) de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) fêmeas..... 99

LISTA DE FIGURAS

Introdução.

- Figura 1. a)** Distribuição atual do lobo- guará (*Chrysocyon brachyurus*); e **b)** extensão do desmatamento de seu habitat principal, o cerrado brasileiro (Fonte: IUCN,2018; Ministério do Meio Ambiente, 2010) 3
- Figura 2.** Exemplar de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) adulto (Fonte: Rogério Cunha de Paula, em Cunha de Paula et al. 2013). 3

Capítulo I.

- Figura 1.** Variação sazonal de testosterona sérica em machos de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) *ex situ*. Redesenhado de Maia et al.2008. 17
- Figura 2.** Variação sazonal de progesterona sérica em fêmeas de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) *ex situ*. Redesenhado de Maia et al.2008. 17
- Figura 3.** Perfis longitudinais de progestágenos fecais em **a)** fêmeas pareadas; e **b)** fêmeas sozinhas. Adaptado de Songsasen et al. 2014..... 20

Capítulo II.

- Figura 1.** Climograma da região do Parque Nacional da Serra da Canastra (MG- Brasil) baseado em séries meteorológicas históricas (1988-2018): barras listradas simbolizam a precipitação média mensal (mm); linha simboliza o limiar do superávit hídrico, isto é, o dobro da temperatura média máxima mensal (°C). 47
- Figura 2.** Variação da concentração de testosterona sérica em lobos-guará machos de acordo com **a)** categoria etária; **b)** status reprodutivo (ENR= estação não reprodutiva e ER= estação reprodutiva); e **c)** época do ano. 52
- Figura 3.** Variação média anual das concentrações de testosterona e estradiol de lobos-guará de vida livre em relação ao índice pluviométrico médio da região do Parque Nacional da Serra da Canastra (MG– Brasil). Em sombreado, destaca-se a estação seca..... 53
- Figura 4.** Variação da concentração de estradiol sérico em lobos-guará fêmeas de acordo com **a)** categoria etária; **b)** status reprodutivo (ENR= estação não reprodutiva e ER= estação reprodutiva); e **c)** época do ano..... 56

Capítulo III.

- Figura 1.** Concentrações médias de HAM entre fêmeas de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) imaturas (≤ 1 ano de idade) e maduras (>1 ano de idade). O asterisco na coluna indica diferença significativa entre médias ($p < 0,05$) 81

- Figura 2.** Regressão linear de idade (meses) em relação às concentrações de hormônio anti-Mülleriano (HAM) (ng/ml) para 29 fêmeas de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Dados transformados em raiz quadrada. 82
- Figura 3.** Concentrações médias de hormônio anti-Mülleriano (HAM) entre fêmeas adultas de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) durante a estação reprodutiva (ER) e a estação não reprodutiva (ENR). O asterisco na coluna indica diferença significativa entre médias ($p<0,05$)..... 83
- Figura 4.** Média ($\pm$ EPM) das concentrações de (a) hormônio anti-Mülleriano (HAM) ($n=23$) de lobas-guará (*Chrysocyon brachyurus*) adultas ao longo do ano. A linha tracejada indica valores basais médios, calculados de acordo com Brown et al. (1999). 84
- Figura 5.** Comparação entre as concentrações médias (ng/ml) de hormônio anti-Mülleriano (linha preta) e estradiol (linhas cinza) de lobas-guará (*Chrysocyon brachyurus*) adultas ao longo do ano. Em cinza, a linha cheia indica a concentração média de E2 dentro do mesmo conjunto de amostras ($n=23$) usadas para dosar HAM ao passo que a linha tracejada indica a concentração média de E2 em relação a um conjunto de amostras estendido ($n=50$) (dados extraídos de Martins et al. 2018b). 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
AMH	<i>Anti-Müllerian hormone</i>
ANA	Instituto Nacional das Aguas
BRG	Banco de recursos genéticos
CENAP	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros
cm	Centímetro
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio-padrão
E2	Estradiol
EEJ	Eletroejaculação
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent assay</i>
ENR	Estação não-reprodutiva
EP	Erro padrão
EPM	Erro padrão da média
ER	Estação reprodutiva
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HAM	Hormônio anti-Mülleriano
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
kg	Quilograma
LH	Hormônio luteinizante
MD	Manipulação digital
ml	Mililitro

mm	Milímetro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
ng	nanograma
NT	<i>Near threatened</i>
pc	Picograma
PNSC	Parque Nacional de Serra da Canastra

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
História de vida, conservação e reprodução.....	1
O lobo-guará como espécie de estudo	2
Monitoramento endócrino da função reprodutiva	5
Objetivos.....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO I.....	11
RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
DESCRIÇÃO GERAL DA ESPÉCIE	13
PUBERDADE	14
SAZONALIDADE REPRODUTIVA	15
ESTAGIOS DO CICLO ESTRAL E GESTAÇÃO	17
Ovulação induzida.....	19
CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E FATORES QUE AS AFETAM.....	21
COMPORTAMENTO REPRODUTIVO	24
Pareamento, corte e cópula	24
Cuidado parental e aloparental	25
OBSTÁCULOS À CONSERVAÇÃO IN-SITU E EX-SITU.....	26
BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS.....	29
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO II.....	41
RESUMO.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	55
O uso de amostras de BRGs em estudos endócrinos	55
Puberdade e maturidade sexual	55

Influência de fatores ambientais sobre a função reprodutiva	57
O papel da ovulação induzida no timing reprodutivo.....	61
CONCLUSÃO.....	62
AGRADECIMENTOS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICE A.....	70
APÊNDICE B.....	71
CAPÍTULO III.....	72
RESUMO.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS	76
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES.....	87
AGRADECIMENTOS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE A.....	95
APÊNDICE B.....	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

INTRODUÇÃO GERAL

História de vida, conservação e reprodução

O termo 'história de vida' refere-se aos padrões de desenvolvimento vivenciados por um organismo durante a sua jornada desde o nascimento até a morte. Estes padrões são moldados pela seleção natural e basicamente refletem como os membros de uma determinada espécie distribuem seus limitados recursos entre crescimento, sobrevivência e produção de descendentes (Ricklefs, 1990; Jack et al. 2014). Ainda que, em termos de indivíduo, o ciclo de vida possa variar amplamente (a morte pode ocorrer minutos ou anos após o nascimento), o conhecimento dos padrões espécie-específicos da história de vida, em particular aqueles que envolvem a função reprodutiva, é considerado um dos alicerces para desenvolvimento de estratégias de conservação bem sucedidas (Jack et al. 2014). Nos mamíferos selvagens, por exemplo, a caracterização de algumas variáveis temporais da história de vida reprodutiva (i.e.: idade na maturidade sexual e a senescência reprodutiva), são essenciais nas avaliações de alterações demográficas, de viabilidade reprodutiva e do desempenho geral de populações - tanto sob pressões de exploração quanto em resposta a influências ambientais (Labrada-Martagón et al. 2014). Este tipo de conhecimento pode ainda representar uma verdadeira revolução na elaboração de estratégias de manejo em cativeiro, otimizando a capacidade e vida reprodutiva de cada indivíduo (Morris, 1972; Polanowski et al. 2014).

Contudo, apesar da indiscutível relevância, a grande maioria das espécies selvagens ainda sofre com lacunas destes conhecimentos básicos de sua história de vida. De fato, estima-se que mecanismos reprodutivos são bem compreendidos em apenas 0,25% das mais de 40.000 espécies de vertebrados existentes no mundo (Wildt et al. 2003). Aproximadamente 280 destas espécies são carnívoros selvagens - um grupo extremamente suscetível às mudanças ambientais, perseguido pelos humanos e que, a despeito do carisma, sofre com uma base de dados reprodutivos surpreendentemente limitada dada a diversidade insondável de mecanismos e padrões reprodutivos presentes na ordem (Comizzoli et al. 2009). De particular interesse é a família dos canídeos, grupo especialmente diverso tanto em termos de tamanho (peso varia de 1 a 80 kg), hábitos alimentares (de onívoros a carnívoro estrito), preferências de habitat (de desertos a campos de gelo e florestas tropicais) (Geffen et al. 1996), quanto em relação às características da história de vida (Gittleman

1986). O foco deste estudo será em uma das espécies mais distintas dentro desta família, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

O lobo-guará como espécie de estudo

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) destaca-se dentre os membros da família *Canidae* não apenas por sua aparência distinta dos morfotipos usualmente observados (que remetem a lobos ou raposas) (Sillero-Zubiri, 2014), mas também por possuir características comportamentais (são animais predominantemente solitários, inclusive ao caçar), alimentares (dieta baseada principalmente em pequenos roedores e frutas) e reprodutivas pouco usuais para grandes canídeos (Dietz, 1984). Natural da região central da América do Sul (desde o centro-sul do Estado do Maranhão até o Uruguai e do extremo leste do Peru até o Estado do Espírito Santo) (Pró-Carnívoros, 2003) (Figura 1a), a espécie é famosa pela compleição esguia, com patas compridas e finas, grandes orelhas e pelagem longa predominantemente castanho-avermelhada. No dorso possui uma área de pelos negros (crina), mesma tonalidade encontrada no focinho e nas partes médias de suas pernas. O interior das orelhas, peito e ponta da cauda são brancos (Dietz, 1984). Quando adultos, podem atingir até 90 cm de altura ao ombro e entre 95 e 115 cm de comprimento (mais 38 a 50 cm de cauda). O peso varia entre 20 e 30 kg (Rodrigues, 2002), o que lhe conferiu o posto de maior canídeo da América do Sul (Figura 2).

O principal bioma ocupado por estes animais, o cerrado, vem sofrendo intensa redução e fragmentação, sendo esta principal ameaça enfrentada pelas populações naturais atualmente (Rodrigues, 2002). No Brasil, o cerrado abrange cerca de 21% do território nacional (Klink & Machado, 2005; IUCN, 2018). A importância da biodiversidade abrigada por este ecossistema o coloca entre os 25 principais 'hotspots' ecológicos do mundo (Myers et al. 2000), porém não se reflete em medidas de conservação: calcula-se que nos últimos 50 anos, mais da metade da área do Cerrado tenha sido convertida em áreas de plantio agrícola e pastos. Como resultado da intensa ação antrópica, estima-se que apenas 20% da cobertura vegetal original tenha restado, dos quais apenas 1,9% estão sobre proteção e são manejadas como Unidades de Conservação (Klink & Machado, 2005) (Figura 1b).

Figura 1. a) Distribuição atual do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e **b)** extensão do desmatamento de seu habitat principal, o Cerrado brasileiro (Fonte: IUCN,2018; Ministério do Meio Ambiente, 2010).

Figura 2. Espécime de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) adulto (Fonte: Rogério Cunha de Paula, em Cunha de Paula *et al.* 2013).

E é exatamente nestes fragmentos remanescentes de vegetação natural que grande parcela das populações brasileiras de lobos-guará se concentra. Áreas que, em sua maioria, são demasiadamente pequenas e estão cercadas por ambientes alterados, como fazendas, ranchos, cidades e estradas (Lion et al. 2011). Os efeitos colaterais desta forte presença humana refletem-se em um alto índice de atropelamentos, caça, captura de filhotes para comércio ilegal e disseminação de doenças por contato com cães domésticos, elevando ainda mais a taxa mortalidade e afetando o fluxo gênico entre fragmentos e populações remanescentes (Young & Clarke, 2000; Rodrigues, 2002; Cunha de Paula et al., 2013). Estima-se que, com as taxas de desmatamento recentes (1,0 a 1,5% por ano), em 15 anos haverá uma redução de 20% na metapopulação de Lobos-guará do Brasil (Cunha de Paula et al. 2008; Cunha de Paula & Desbiez, 2014). De fato, algumas localidades já registram a perda de até um terço dos tamanhos populacionais originais sendo que apenas 39% da distribuição atual da espécie é considerada estável a longo prazo (Cunha de Paula et al. 2013).

Como consequência, atualmente o lobo-guará figura nas principais listas de espécies ameaçadas de extinção do mundo, sendo considerada 'Vulnerável' (ICMBio, 2014) no Brasil e 'Quase Ameaçada' (NT – “near threatened”) (IUCN, 2018) internacionalmente. Não bastasse a perda severa de seu habitat, a condição lobo-guará é ainda mais agravada por características biológicas e reprodutivas pouco favoráveis à expansão rápida de população tanto em natureza quanto em cativeiro: em primeiro lugar, a espécie possui natureza essencialmente solitária e territorialista, além da necessidade de áreas de vida amplas (em média 50-80 km²). Além disso, são animais monogâmicos facultativos, o que implica um maior grau de seletividade no que diz respeito à formação de casais, dificultando particularmente o pareamento *ex-situ* (Dietz, 1984; Pró-Carnívoros, 2003; Sperscoski, 2007; Cunha de Paula et al. 2013).

Ainda dentro dos parâmetros reprodutivos, a espécie possui marcada sazonalidade reprodutiva e a fêmea é monoéstrica, reduzindo a possibilidade de concepção à uma curta janela anual entre os meses abril e julho, no pico da estação reprodutiva (Dietz, 1984; Pró- Carnívoros, 2003; Sperscoski, 2007; Cunha de Paula et al. 2013). Adicionalmente, segundo estudo recente, existem fortes indícios de que as fêmeas da espécie apresentam ovulação induzida pela presença do macho, o que dificulta sobremaneira o uso de técnicas de reprodução assistida em cativeiro (Johnson et al. 2014). O tamanho médio da ninhada configura na última característica reprodutiva

agravante à expansão populacional: em vida livre, pode variar de 2 a 4 filhotes, um número considerado baixo para um canídeo de grande porte (Rodden et al.1996).

Assim, apesar de ser alvo de grandes medidas de conservação, não é surpreendente que o lobo-guará ainda se encontre sobre preocupante risco de extinção, não apenas pelo rápido avanço do desmatamento e seus efeitos colaterais, mas também pelos baixos índices de sucesso reprodutivo em cativeiro: a despeito dos esforços dos programas de reprodução nacionais, a população cativa de lobos-guará é considerada demograficamente instável, o que a torna altamente dependente do influxo de animais capturados em natureza. Os principais desafios encontrados em relação a reprodução *ex-situ* são os baixos índices de concepção e as altas taxas de mortalidade de filhotes até 1 ano de idade (Vanstreels & Pessutti, 2010; Songsasen & Rodden, 2010), reflexo, sobretudo da falta de conhecimento mais amplo a respeito da fisiologia, comportamento e história reprodutiva da espécie.

Monitoramento endócrino da função reprodutiva

Na maioria dos organismos, tanto o crescimento quanto o desenvolvimento são dependentes de regulação endócrina, de modo que os principais marcos de maturação (ou etapas da história de vida) são usualmente acompanhados por mudanças nos perfis hormonais do indivíduo (Finch & Rose, 1995). Não é surpreendente, portanto, que os hormônios estejam envolvidos e controlem praticamente todos os aspectos da reprodução, sejam eles comportamentais ou fisiológicos. Assim, o monitoramento da atividade endócrina é considerado um dos passos fundamentais para a caracterização da biologia reprodutiva de qualquer espécie (Graham, 2004; Schwarzenberger & Brown, 2013).

Sendo a reprodução é um componente pivotal da maioria dos planos de conservação de espécies ameaçadas (Wildt et al., 2010), gerar informações sobre aspectos básicos dos ciclos reprodutivos é uma parte necessária do esforço de conservação. O foco da esmagadora maioria dos trabalhos nesta área está no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, responsável por comandar a reprodução dos mamíferos. Os principais representantes da atividade deste eixo e, portanto, principais indicadores da função gonadal, são os progestágenos (p.ex.: progesterona), os andrógenos (p.ex. testosterona) e os estrógenos (p.ex. estradiol) (Schwarzenberger et al. 1996; Pukazhenthil & Wildt, 2004).

Por conta de sua circulação por todo o corpo, estes hormônios podem ser mensurados em uma variedade de matrizes biológicas, entre elas o sangue, a saliva, as fezes e a urina (Hodges et al. 2010). Dentre estas matrizes, o sangue - principal meio de transporte destas substâncias no corpo - continua sendo a mais informativa e amplamente utilizada no campo da endocrinologia reprodutiva, tendo vantagens em relação a outros substratos por requerer menor processamento (geralmente usa-se o soro) além de permitir acesso ao hormônio *in natura* (Kersey & Dehnhard, 2014; Brown, 2018). Ademais, este tipo de matriz não requer indexação das concentrações e oferece um retrato instantâneo do *status* hormonal do animal do momento da coleta (Brown, 2018).

Em contrapartida, quando aplicadas a espécies selvagens, o uso do sangue como substrato para análises endocrinológicas oferece uma série de entraves, sobretudo em função da exigência de captura e contenção (física ou química) do animal - o que pode afetar a sua fisiologia e, conseqüentemente, as observações endócrinas obtidas (Kersey & Dehnhard, 2014; Brown, 2018). Em cativeiro, a utilização de técnicas de condicionamento já se provou uma possível solução para esse tipo de situação (ao exemplo de Brown 2000) contudo, a coleta sequencial deste tipo de amostra em populações selvagens permanece um desafio difícil de ser superado. Por esta razão, abordagens não invasivas com base em análises fecais e urinárias têm sido priorizadas na maioria dos estudos visando avaliação da atividade endócrina (reprodutiva ou não) em animais de vida livre (Schwarzenberger, 2007).

Por fim, é importante enfatizar que raramente estudos endócrinos de espécies ameaçadas focam ou devem focar unicamente em hormônios. Os dados endócrinos são muito mais poderosos quando combinados com outras disciplinas ou medidas, tais como o meio ambiente, o comportamento, os dados reprodutivos, a nutrição, a ecologia e a medicina veterinária. Esses esforços interdisciplinares fornecem o contexto necessário para a interpretação e compreensão de eventos hormonais (p.ex., comportamentos estrais com medidas aumentadas de estrogênio) e são o que verdadeiramente terão relevância para elaboração de considerações de manejo e de conservação (Kersey & Dehnhard, 2014).

Objetivos

No geral, este documento visa contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva do lobo-guará como parte do esforço conjunto para conservação desta espécie-chave brasileira. Em uma nota mais específica, por meio da combinação de dados hormonais, ambientais e etários, pretendeu-se caracterizar melhor os estágios específicos da história de vida deste canídeo, debater sobre influência de fatores ambientais nos padrões reprodutivos em vida livre, e fornecer uma possível nova ferramenta endócrina no monitoramento da atividade ovariana da espécie. Estes objetivos serão abordados com detalhes nos capítulos que seguem:

O **Capítulo I** é dedicado à uma extensa revisão de literatura do conhecimento atual acerca da biologia reprodutiva do lobo-guará. Nele são abordados temas como a sazonalidade reprodutiva, o ciclo estral, a gestação, as características seminais e o comportamento reprodutivo e parental. Ademais, este capítulo também discorre sobre principais obstáculos à conservação da espécie, o crescente uso de biotecnologias reprodutivas e os principais temas a serem investigados no futuro.

O **Capítulo II** é focado na caracterização dos perfis de esteroides sexuais (i.e.: testosterona e estradiol) em uma população de vida livre de lobos-guará. Com base em amostras de soro proveniente de um banco de recursos genômicos, avaliamos as concentrações hormonais em diferentes categorias etárias a fim de delimitar a janela da maturidade sexual para a espécie. Nos adultos também foram objeto de avaliação o comportamento sazonal destes hormônios e o possível - e até então inédito - efeito dos padrões de chuva regionais sobre o estabelecimento e duração da estação reprodutiva.

Por fim, no **Capítulo III** apresentamos o primeiro relato da mensuração de hormônio anti-Mülleriano (HAM) em um canídeo selvagem assim como discutimos a validade da sua utilização como marcador da função ovariana. A partir de amostras de soro de fêmeas de lobo-guará de diferentes idades, analisamos o comportamento do HAM em função da idade, bem como a influência da maturidade e da estação reprodutiva sobre os níveis deste hormônio. Adicionalmente, foram comparados os valores de HAM e de estradiol tanto de maneira focal (i.e.: entre as mesmas amostras) quando temporal (i.e.: em relação aos meses).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, J.L. Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals. **Theriogenology**, v.109, p.2-13, 2018.
- BROWN, J.L. Reproductive endocrine monitoring of elephants: an essential tool for assisting captive management. **Zoo Biology**, v.19, p.347–67, 2000.
- COMIZZOLI, P.; CROSIER, A.E.; SONGSASEN, N.; et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44(2), p.47-52, 2009. CUNHA DE PAULA, R. et al. Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília DF, v.3, n.1, p.146-159, 2013.
- CUNHA DE PAULA, R.; DESBIEZ, A.L.J. Maned Wolf Population Viability. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014. Cap.2. p.15-34.
- CUNHA DE PAULA, R.; MEDICI, P.; MORATO, R.G. **Plano de Ação para a Conservação do Lobo-Guará: Análise de Viabilidade Populacional e Habitat (PHVA)**. Brasília: Ibama. 2008. 158 p.
- DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contribution to Zoology**, Washington DC, v.392, p. 1–51, 1984.
- FINCH, C.E.; ROSE, M.R. Hormones and the physiological architecture of life history evolution. **Quarterly Review Biology**, v.70, p.1–51, 1995.
- GEFFEN, E. et al. Size, life-history traits, and social organization in the Canidae: a reevaluation. **American Naturalist**, v.147(1), p.140-60, 1996.
- GITTLEMAN, J.E. Carnivore life history patterns: allometric, phylogenetic, and ecological associations. **American Naturalist**, v.127, p.744-71, 1986.
- GRAHAM, L.H. Non-Invasive Monitoring of Reproduction in Zoo and Wildlife Species. **ARBS Ann.Ver.Biomed.Sci.**, v.6, p.91-8, 2004.
- HODGES, K.; BROWN, J.; HEISTERMANN, M. Endocrine monitoring of reproduction and stress. In: Kleiman, D.G., Thompson, K.V., Baer, C.K. **Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management**, 2nd ed. Chucago: University of Chicago Press, 2010, II, pp. 447–468.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Lista de espécies terrestres e mamíferos aquáticos ameaçados** - Portaria MMA nº444, de 17 de dezembro de 2014. 13 p., 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/faunabrasileira/avaliacao-do->

risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2017.

- IUCN – International Union for Conservation of Nature. In: Cunha de Paula, R. & DeMatteo, K. 2015. ***Chrysocyon brachyurus***. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T4819A82316878. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>. Acesso em: 27/06/2017.
- JACK, K.M.; et al. Hormonal correlates of male life history stages in wild white-faced capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). **General and Comparative Endocrinology**, v.195, p. 58–67, 2014.
- JOHNSON, A.E.M. et al. Induction of ovarian activity and ovulation in an induced ovulator, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), using GnRH agonist and recombinant LH. **Theriogenology**, Milan, v.82, p. 71–79, 2014.
- KERSEY, D.C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, v.203, p.296–306, 2014.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p.707–713. 2005.
- LABRADA-MARTAGÓN, V.; ZENTENO-SAVÍN, T.; MANGEL, M. Linking physiological approaches to marine vertebrate conservation: using sex steroid hormone determinations in demographic assessments. **Conservation Physiology**, v.2, p.1-18,2014.
- LION, M.B.; et al. Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. **Genetica**, v.139, p. 369–381, 2011.
- MORRIS, P. A review of mammalian age determination methods. **Mammal Review**, v.2 (3), p.69-104, 1972.
- POLANOWSKI, A.M.; et al. Epigenetic estimation of age in humpback whales. **Molecular Ecology Resources**, v.14, p.976–987, 2014.
- PRÓ CARNÍVOROS. **Plano de manejo**: biologia comportamental e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no cerrado de Minas Gerais – MG. Proposta apresentada ao Fundo Nacional do Meio Ambiente – FNMA. 2003.
- PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E. Which reproductive technologies are most relevant to studying managing and conserving wildlife? **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.33–46, 2004.
- RICKLEFS, R.E. **Evolution of life histories**, 3 Ed. Em Ecology, New York, NY: W. H. Freeman,1990, p. 561.

- RODDEN, M. D. et al. Use of behavioral measures to assess reproductive status in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Zoo Biology**, San Francisco, v.15, p. 565 – 85, 1996.
- RODRIGUES, F.H.G. **Biologia e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF**. 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- SCHWARZENBERGER, F.; BROWN, J.L. Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria**, Austria, v.100, p.209-225, 2013.
- SCHWARZENBERGER, F. et al. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, n.1–4, p.515-526, 1996.
- SCHWARZENBERGER, F. The many uses of noninvasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, London, v.41, p.52–74, 2007.
- SILLERO-ZUBIRI, C. The Canidae Family: Setting the Scene for Maned Wolf Conservation. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton : CRC Press, 2014. Cap.1.p.3-14.
- SONGSASEN, N.; RODDEN, M. The role of the Species Survival Plan in Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* conservation. **International Zoo Yearbook**, London, v. 44, n.1, p.136-148, 2010.
- SPERCOSKI, K.M. **Monitoramento a longo prazo da excreção de corticoides fecais em lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) de cativeiro e vida livre: uma contribuição para o manejo e a conservação da espécie**. 2007, 68 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- VANSTREELS, R.E.T.; PESSUTTI, C. Analysis and discussion of Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* population trends in Brazilian institutions: lessons from the Brazilian studbook, 1969–2006. **International Zoo Yearbook**, London, v.44, p.121–135, 2010.
- WILDT, D.E. et al. Felids ex situ: Managed programs, research and species recovery. In: MACDONALD, D.; LOVERIDGE, A.J. **The biology and conservation of wild felids**. Oxford: Oxford University Press, 2010. cap.8, p.217-237.
- WILDT, D.E.; et al. Toward more effective reproductive science in conservation. In: HOLT, W.V.; PICKARD, A.; RODGER, J.C.; WILDT, D.E. **Reproductive sciences and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p.2-20.

CAPÍTULO I.

Estado-da-arte sobre a biologia reprodutiva do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*): particularidades, entraves à conservação e perspectivas futuras

Gabriela Siqueira Martins^{1*}, Claudio Alvarenga de Oliveira¹

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

* Autor para correspondência: gabi.smartins@outlook.com

RESUMO

O conhecimento atual da biologia reprodutiva dos lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) foi revisado, evidenciando aspectos pouco comuns à canídeos de grande porte como o solitarismo, a baixa qualidade seminal e a prevalência de ninhadas pequenas. O casal compartilha território, mas interage apenas durante o período reprodutivo e nos primeiros meses de vida da prole. A espécie possui marcada sazonalidade reprodutiva modulada pelo fotoperíodo e evidenciada pelo estabelecimento da atividade ovariana e aumento da produção espermática durante o outono. A fêmea é monoéstrica e seu ciclo estral se assemelha bastante ao da cadela, contudo, a espécie é uma das únicas entre os canídeos a apresentar ovulação induzida. O macho possui papel ativo na criação dos filhotes, ainda que não na mesma proporção que as fêmeas. Observações recentes relatam a participação de jovem fêmea de ninhada anterior na criação dos filhotes e a possível herança do território natal pela mesma. Apesar do avanço no estudo de sua fisiologia, programas de reprodução em cativeiro apresentam sucesso reprodutivo escasso, caracterizado por baixas taxas de concepção e alta mortalidade de filhotes. Atribui-se estes resultados não apenas às condições de manejo ineficientes, mas sobretudo a falta de conhecimento mais amplo a respeito da história de vida da espécie. Estudos futuros devem focar não apenas no aprofundamento do entendimento de aspectos da fisiologia básica tais como a puberdade, a modulação da função gonadal e o comportamento parental, como também adaptar as técnicas de reprodução existentes aos padrões já relatados para espécie, como por exemplo a ocorrência ovulação

induzida e a alta osmolaridade e baixa qualidade seminal.

Palavras-chaves: canídeos, reprodução, biologia, comportamento reprodutivo, ciclo estral, sêmen.

INTRODUÇÃO

Único representante de seu gênero, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) é considerado uma espécie-chave dentro de seu principal habitat, o cerrado, em face das inúmeras relações tróficas e ecológicas que mantem neste ambiente. Como grande parte dos carnívoros de grande porte, a espécie apresenta um imenso potencial conservacionista, sendo frequentemente citada como uma excelente candidata a espécie-bandeira ou espécie guarda-chuva para a proteção do seu bioma ameaçado (Rodrigues, 2002).

Contudo, a despeito de todo seu carisma, as populações naturais de lobo-guará têm enfrentado um delicado período de declínio, suscitado principalmente pela perda e fragmentação de habitat resultante da expansão agrícola e pecuária (Cunha de Paula et al. 2013). Como consequência, atualmente, o lobo-guará figura nas principais listas de espécies ameaçadas de extinção do mundo, sendo considerada 'Vulnerável' (ICMBio, 2014) no Brasil e 'Quase Ameaçada' (NT – “near threatened”) (Paula & DeMatteo, 2016) internacionalmente.

Estratégias de conservação bem-sucedidas, devem estar sempre estruturadas ao redor do conhecimento da história de vida da espécie, dentro da qual a compreensão de da fisiologia reprodutiva merece especial atenção. Compreender os processos reprodutivos sob condições naturais (*in situ*) fornece uma diretriz para os esforços de conservação *ex situ* ao passo que as populações cativas permitem uma avaliação mais refinada dos parâmetros reprodutivos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida. Esta via de mão dupla é vital para a manutenção de populações selvagens viáveis e saudáveis (Furtado et al. 2020, no prelo).

Dentro deste contexto, objetivamos aqui revisar e resumir o entendimento atual acerca da biologia reprodutiva do lobo-guará, com enfoque nos aspectos fisiológicos, endocrinológicos e comportamentais dos principais eventos reprodutivos da espécie. Parte das informações aqui contidas encontram-se descritas ou relacionadas em

formatos de difícil acesso tais como publicações locais dissertações e teses. Veremos que muitos dos parâmetros reprodutivos presentes neste canídeo, como por exemplo, a monogamia, a monoestria estacional, a ocorrência de ovulação induzida, e as pequenas ninhadas, são pouco favoráveis a rápida expansão populacional, agravando a condição de risco da espécie (Dietz, 1984; Johnson et al., 2014b). Também serão revisadas as influências ambientais sobre reprodução natural bem como o impacto das ações antrópicas sob a mesma. Por fim, serão discutidos os atuais esforços e avanços no estabelecimento de técnicas de reprodução assistida para recuperação da espécie bem como as atuais lacunas de conhecimento que os cerceiam.

DESCRIÇÃO GERAL DA ESPÉCIE

O lobo-guará destaca-se dentre os demais membros da família *Canidae* por possuir compleição esguia, patas compridas e finas e orelhas grandes, morfotipo que diverge do lupino ou vulpino comumente observados (Sillero-Zubiri, 2014). Tanto machos quanto fêmeas possuem pelagem longa, predominantemente castanho-avermelhada. No dorso há uma área de pelos negros (crina), mesma tonalidade encontrada no focinho e nas partes médias de suas pernas. O interior das orelhas, peito e ponta da cauda são brancos (Dietz, 1985). Quando adultos, atingem em média 90 cm de altura ao ombro, e entre 95 e 115 cm de comprimento (mais 38 a 50 cm de cauda). A alta estatura juntamente com um peso médio de 25 kg, conferiu à espécie o título de maior canídeo da América do Sul (Santos et al. 2014).

A distribuição, comportamento e padrões ecológicos do lobo-guará estão intimamente relacionados com os descampados e áreas vegetações abertas da região central da América do Sul (Dietz, 1985): as patas longas facilitam o deslocamento por entre a vegetação alta. Assim, a espécie pode ser encontrada em todo Paraguai, leste da Bolívia e norte da Argentina, porém, é na savana brasileira, mais conhecida como cerrado, que se encontra a maior parcela de sua população natural. Este bioma é tão representativo para na história natural da espécie que abriga aproximadamente de 90% de sua distribuição atual (Rodden et al., 2004; Cunha de Paula et al. 2013).

Ademais, o lobo-guará é considerado onívoro, de hábitos alimentares oportunistas e generalistas: sua dieta baseia-se em grande diversidade de frutos, pequenos vertebrados e até artrópodes, em proporções que variam e acabam se compensando sazonalmente (Dietz, 1984; Rodrigues, 2002; Cunha de Paula et al., 2013).

PUBERDADE

A puberdade é a etapa final de uma série de eventos que culminam no início da atividade reprodutiva, quando as gônadas se tornam completamente ativas (maduras) e o indivíduo efetivamente fértil (Robinson, 1977). Este processo é acompanhado pela ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, expresso pelo aumento da produção de testosterona em machos e de estradiol e progesterona nas fêmeas. Em termos gerais, fisiologicamente considera-se a aparição de espermatozoides em machos (o que pode ocorrer até 2 meses depois do aumento de testosterona) e a primeira ovulação ou o primeiro estro (no caso de ovuladores induzidos) nas fêmeas. Já em estudos de campo, estimativas são feitas com base na observação de cópula ou nascimento de filhotes, uma abordagem bastante conservativa posto que os marcos fisiológicos (i.e.: produção espermática, ovulação ou estro) podem ocorrer sem estas manifestações óbvias (Asa, 2012)

Apesar de ser um importante dado para estimativas demográficas e para o estabelecimento índice confiável de potencial reprodutivo (Clapham, 1992), não existem, até o momento, informações precisas em relação idade à puberdade para o lobo-guará. Em cativeiro, observações pontuais ao longo dos anos e registros do studybook da espécie dão conta de que ambos os sexos podem se reproduzir a partir de um ano de idade, embora isso seja considerado raro (Songsasen & Rodden, 2010, Holland et al.2014). Em vida livre, Cunha de Paula e Desbiez (2014) sugerem a idade a primeira reprodução para fêmeas (aqui definida como a idade média ao nascimento da primeira ninhada) como dois anos. Considerando-se um período gestacional de aproximadamente 65 dias, pode-se especular que o primeiro estro fértil ocorra com não mais de 22 meses de idade. Fêmeas jovens podem ainda atuar como ‘ajudantes’ na criação dos irmãos durante os dois primeiros anos de vida (papel este que será revisitado oportunamente) (Emmons et al. 2012), assim, não seria esperado que atinjam a puberdade antes disso. Essa posição no núcleo familiar também explicaria por que estas jovens deixam o seu território natal de maneira igualmente tardia (até 24 meses) (Songsasen et al.2014).

Para machos, as informações são ainda mais escassas. Levando em conta que, assim como a maioria dos mamíferos, o sexo masculino é o principal dispersor da espécie e que, afim de se evitar endogamia, a dispersão geralmente ocorre antes da maturidade sexual (Bowler & Benton, 2005), pode-se supor que a puberdade ocorra em algum

ponto durante ou até depois da idade de dispersão, entre 15 e 22 meses. Songsasen e colaboradores (2014) relatam produção espermática, ainda que modesta em comparação a um adulto, em um macho selvagem de dois anos de idade, o que reforça esta hipótese.

É importante ressaltar que, estas são estimativas particularmente conservativas posto que no caso dos machos, nem todos os indivíduos têm oportunidade de acasalar, muitas cópulas podem não ser documentadas e a produção espermática raramente foi avaliada em animais tão jovens (Asa, 2012). Já no caso das fêmeas, múltiplos ciclos podem preceder uma fertilização bem-sucedida e uma gestação a termo, um fenômeno conhecido como “esterilidade adolescente” (Spear, 2000).

SAZONALIDADE REPRODUTIVA

É sabido que diferentes condições ambientais podem influenciar os eventos e processos reprodutivos de uma espécie. Alguns destes fatores, tais como o fotoperíodo, a chuva e a disponibilidade de alimentos, atuam como gatilhos naturais para a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal responsável pela produção de hormônios sexuais (progestágenos, estrógenos e andrógenos) dando início a atividade reprodutiva. Em contrapartida, a alteração, natural ou não, destas condições (i.e.: escassez de alimento, mudança de fotoperíodo) podem, igualmente, inibir o funcionamento deste eixo, cessando esta atividade (Baker, 1938; Karsch et al. 1984).

Considerada monoéstrica sazonal, o lobo-guará possui uma estação reprodutiva curta e bem demarcada que dura em média três meses (Comizzolli et al. 2009). Em condições naturais, a ativação do eixo reprodutivo ocorre principalmente durante o outono, mais especificamente entre os meses de março a junho, assim como evidenciado por Maia e colaboradores (2008) nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Variação sazonal de testosterona sérica em machos de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) ex situ. Redesenhado de Maia et al.2008

Figura 2. Variação sazonal de progesterona sérica em fêmeas de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) ex situ. Redesenhado de Maia et al.2008

Posto que, quando translocadas através do equador, há uma diferença de exatos 6 meses no estabelecimento da estação reprodutiva de espécimes em cativeiro (Maia & Gouveia, 2002) - com a estação reprodutiva ocorrendo entre os meses de Outubro e Fevereiro e o pico de nascimentos entre Dezembro e Janeiro - o fotoperíodo parece ser o principal modulador da sazonalidade reprodutiva no lobo-guará. Tal característica é comum a maioria dos canídeos selvagens e provavelmente é herança de um processo evolutivo centrado na América do Norte, durante o qual ancestrais da família Canidae teriam sido expostos às mudanças sazonais no fotoperíodo (Kurtin, 1971; Asa & Valdespino, 1998)

Assim, ao passo que o número de horas luz/dia diminui ao final do verão, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal da espécie adquire sensibilidade e passa a ter atividade. Levando em conta uma gestação de aproximadamente 65 dias, a temporada de nascimentos em vida livre começa a partir de fevereiro e atinge seu pico durante o inverno, nos meses de junho e julho (Emmons et al., 2012).

ESTAGIOS DO CICLO ESTRAL E GESTAÇÃO

O ciclo estral da fêmea de lobo-guará, em sua monoestria, sazonalidade e longa fase luteal, assemelha-se em muitos pontos com o apresentado pela maior parte dos canídeos (incluindo a cadela) (Dietz, 1984; Wasser et al., 1995; Velloso et al., 1998; Songsasen et al.2006; Spercoski,2013): o proestro, fase de desenvolvimento folicular sob influência de gonadotrofinas, tem duração de 10,6 dias em média. A concentração de estrogênio durante este período aumenta de maneira gradual, atingindo pico seguido por queda aguda (de volta as concentrações basais) no dia em que a fêmea apresentar lordose ou no dia da cópula. Quando comportamentos sexuais em cativeiro foram associados aos perfis hormonais, laços copulatórios foram observadas desde dois dias antes até nove dias após do pico de estrógeno (Velloso et al.1998; Songsasen et al., 2006).

O estro pode durar de um a dez dias. Além de posição lordótica são características do período, o edemaciamento de vulva, sangramento, abordagens frequentes ao companheiro, inspeção ano-genital mútua e comportamento brincalhão (Rodden et al.1996, 2004). Os índices de progestágenos da fêmea de lobo-guará durante este período apresentam um aumento contínuo e gradual, forte indício da ocorrência de luteinização precoce das células da teca, de maneira semelhante ao observado em

cadelas.

A progesterona permanecerá elevada durante toda fase luteal, independentemente da ocorrência de prenhez ou não. Seja gestacional ou cíclico, o diestro nesta espécie terá duração similar, cerca de 65 dias, após os quais, se iniciará o processo de luteólise que culminará queda nas concentrações de progestágenos (Dietz, 1984; Velloso et al., 1998; Maia & Gouveia, 2002). As semelhanças entre gestação e pseudogestação se atem apenas a sua durabilidade uma vez que fêmeas gestantes produzirão níveis significativamente maiores de progesterona do que suas contrapartes não-prenhes (Velloso et al. 1998; Songsasen et al. 2006). Ao fim dessa fase, tem início o anestro sazonal, caracterizado por concentrações mínimas de hormônios gonadais decorrentes da quiescência ovariana.

As fases de ciclo aqui descritas foram observadas de maneira consistente somente em ocasiões em que as fêmeas em questão se encontravam pareadas. A observação de que fêmeas solitárias aparentemente não ovulavam foi inicialmente relatada por Velloso e colaboradores (1998) e posteriormente reforçada por Songsasen e colaboradores (2006). Ao serem confrontados os ciclos estrais entre fêmeas pareadas e solitárias (Figura 3), os níveis de progestágenos fecais encontrados naquelas solitárias permaneceram basais durante todo o período observacional, correspondente a um ciclo (~ 70 dias) ao passo que as fêmeas pareadas ciclaram normalmente (Songsasen et al. 2006). Este foram os primeiros indícios de que, apesar de possuir características comuns a maioria dos canídeos em relação ao seu ciclo estral, as fêmeas de lobo-guará possuem uma particularidade surpreendente: a ovulação induzida.

Figura 3. Perfis longitudinais de progestágenos fecais em fêmeas pareadas (a) e fêmeas sozinhas (b). Adaptado de Songsasen et al. 2014.

Ovulação induzida

A presença de ovulação induzida não é incomum entre caníformes e carnívoros de maneira geral, ocorrendo em grande parte dos mustelídeos, felídeos e ursídeos. Contudo, o registro de tal característica é relativamente inédito para canídeos, sendo,

até muito recentemente descrita em apenas uma única espécie: a Raposa-das-ilhas (*Urocyon littoralis*) (Asa et al. 2007).

A investigação desta condição no lobo-guará começou com a observação de que fêmeas alojadas sozinhas não ovulavam (Velloso et al. 1998; Songsasen et al. 2006) e foi confirmada em 2014, durante a tentativa de se desenvolver um protocolo de sincronização de indução ovulação em animais de cativeiro. Neste estudo foi observado que a presença do macho não apenas é necessária para desencadear a ovulação após tratamento com um análogo de GnRH, como também pode ter influência na manutenção da função luteal a longo prazo. Nas fêmeas alojadas sozinhas, apesar da resposta positiva ao tratamento com desorrelina (fato evidenciado pelos picos de estrógenos), a ovulação apenas ocorreu após administração de LH recombinante exógeno (Johnson et al. 2014b).

Apesar da ocorrência de ovulação induzida na Raposa-das-ilhas estar associada com estro induzido (isto é, a necessidade da presença do macho para o desencadeamento de atividade folicular plena e produção de estrógenos) (Asa et al. 2007), este não parece ser o caso do lobo-guará. O monitoramento hormonal não-invasivo nesta espécie, comprovou a presença de atividade folicular e estrogênica cíclica independente da presença de macho (Songsasen et al. 2006). Neste sentido o padrão reprodutivo do lobo-guará, com estro espontâneo e ovulação induzida, parece se aproximar muito mais daquele observado em felídeos, tal qual o gato doméstico.

Apesar de existirem diferentes pressões atuando na evolução da ovulação induzida nos carnívoros, dentro deste grupo a condição é mais frequentemente relatada em espécies que apresentam áreas de vida amplas, hábitos solitários e reprodução sazonal, características comuns ao lobo-guará. No restante da ordem Carnivora, no entanto, soma-se a estas características, um sistema de acasalamento poliândrico, que beneficiaria a fêmea com a possibilidade de selecionar o macho mais apto pós-cópula (e.g.: competição espermática) (Larivière & Ferguson, 2003). Isso não ocorre com o monogâmico lobo-guará, tornando-se motivo de especulação a vantagem evolutiva de tal condição, sobretudo para as fêmeas desta espécie.

A maior parte dos lobos-guará de vida livre acasala entre os meses de março e junho, contudo cópulas já foram registradas tão precocemente quanto setembro até tardiamente, em julho (Dietz, 1984; Emmons et al., 2012). Em cativeiro, fêmeas

separadas durante a estação reprodutiva também podem apresentar um cio tardio, quando reunidas aos seus parceiros (Songsasen et al.2014). Em contraste com outras espécies de canídeos , nos quais estro e ovulação espontâneos seguidos por longa fase luteal impedem a ocorrência de nova ovulação, uma estação reprodutiva ‘expansível’ com ovulação controlada, como observado para o tímido e solitário lobo-guará, traria obvias vantagens, sobretudo para fêmeas: o aumento da probabilidade de sucesso reprodutivo com o adicional de evitar-se os custos evolutivos associados ao desperdício de gametas femininos (Asa et al 2007, Johnson et al., 2014b).

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E FATORES QUE AS AFETAM

Em confluência com hormônios hipofisários, a testosterona possui papel fundamental no início, manutenção e controle da espermatogênese de modo que as oscilações sazonais deste hormônio se refletem na produção espermática. No auge da estação reprodutiva, machos apresentam um aumento significativo não apenas no volume testicular bem como em parâmetros como concentração espermática e volume seminal (Paula et al., 2002; Comizzoli et al., 2009; Songsasen & Rodden, 2010; Teodoro et al., 2012; Velloso et al.1998; Maia et al. 2008). Fora de estação, o declínio da qualidade seminal é tão acentuado que, em alguns casos, foi relatado azoospermia (Comizzoli et al., 2009), apesar de existirem evidências de produção espermática ao longo do ano todo (Paula et al., 2002; Teodoro et al., 2012).

O sêmen do lobo-guará possui coloração esbranquiçada e em alguns casos é descrito como ‘aguado’ (Teodoro et al.2012). O ejaculado, fracionado ou não (relatos contraditórios de Mascarenhas et al. 2007 e Teodoro et al.2012), possui volume médio de 1,79 ml. Considerando-se que canídeos de grande porte ejaculam em média mais do que 100 milhões de espermatozoides por vez, a espécie possui uma produção espermática modesta que dificilmente ultrapassa 70 milhões de espermatozoides por ejaculado (Tabela 1). Em adição concentração espermática modesta, parece ser característica comum ao sêmen da espécie uma alta proporção de espermatozoides morfollogicamente anormais. Usualmente, é comum associar tais padrões a uma baixa variabilidade genética o que, de fato, pode ser o caso do lobo-guará, uma vez que espécie passou por um evento de redução populacional drástica (efeito gargalo) há cerca de 15.000 anos (Prates 2008). Contudo, em uma análise de múltiplas pesquisas genéticas em populações naturais, Fontoura-Rodrigues & Eizirick (2014) apontaram para um nível substancial de diversidade gênica na espécie. O mesmo tema já havia

sido constatado por Rodrigues (2009), que ao avaliar três populações diferentes além de amostras de diversas regiões, encontrou um nível da variabilidade genética alto (H_e média = 0,75) em comparação a outras espécies de canídeos.

Além da estação reprodutiva, a qualidade seminal também pode ser influenciada pela idade do indivíduo. Amostras seminais de indivíduos fora da idade reprodutiva ótima (convencionada entre 3 e 8 anos de idade, Songsasen & Rodden, 2010), ou seja, imaturos ou em senescência apresentarão diferenças consideráveis em aspectos como volume e concentração seminal (Tabela 2), quando em comparação com adultos.

Tabela 1. Características seminais de lobos-guarás adultos de acordo com origem (cativeiro e vida-livre), período (dentro e fora de estação reprodutiva) e metodologia de coleta seminal (EEJ – Eletroejaculação; MD – Manipulação digital).

Origem (n)	Estação reprodutiva	Método de coleta	Volume (ml)	Concentração ($\times 10^6/\text{ml}$)	Motilidade (%)	Espermatozoides normais (%)	Fonte
<i>Cativeiro</i>							
(14)	Sim	EEJ	$2,0 \pm 0,6$	$43,4 \pm 18,2$	$59,8 \pm 4,9$	$28,1 \pm 4,4$	Johnson et al. 2014a
(9)	Sim	EEJ	$2,0 \pm 0,6$	$29,5 \pm 9,3$	$65,0 \pm 6,1$	$50,1 \pm 8,1$	Comizolli et al. 2009
(4-29)	-	EEJ	$1,8 \pm 0,5$	$62,6 \pm 18,6$	$63,6 \pm 2,9$	$39,6 \pm 8,8$	Songsasen et al.2014
(3)	Sim	EEJ	-	-	$30,0 \pm 20,0$	-	Nunes da Cunha et al.2008
(1)	Ano todo	MD	$4,2 \pm 2,7$	115,0	-	23,1	Mascarenhas et al.2007
(2)	-	MD	$0,5 - 3,0$	$42 \pm 11,3$	$40,4, \pm 30,3$	$28,7 \pm 11,5$	Carneiro et al. 2011
(1)	Sim	MD	-	238,0	-	-	Rego de Paula et al.2002
(1)	Não	MD	-	73,0	-	-	Rego de Paula et al.2002
(3)	Sim	MD	$1,3 \pm 1,2$	$73,9 \pm 87,2$	$76,1 \pm 23,9$	$36,5 \pm 24,0$	Teodoro et al.2012
(3)	Não	MD	$0,4 \pm 0,6$	$6,1 \pm 4,9$	$80,0 \pm 14,5$	$20,8 \pm 19,8$	Teodoro et al.2012
<i>Vida Livre</i>							
(2)	-	EEJ	$2,1 \pm 1,1$	$7,1 \pm 3,4$	$50,0 \pm 20,0$	$40,6 \pm 10,4$	Songsasen et al.2014

Tabela 2. Características seminais de lobos-guarás submetidos a eletroejaculação, de acordo com origem (vida livre ou cativeiro) e idade. Adaptado de Songsasen et al. 2014.

Origem (n)	Idade	Volume (ml)	Concentração ($\times 10^6/\text{ml}$)	Motilidade (%)	Espermatozoides normais (%)
Vida livre (1)	2 anos	0,09	1,2	-	-
Cativeiro (4-29)	3 - 8 anos	$1,8 \pm 0,5$	$62,6 \pm 18,6$	$63,6 \pm 2,9$	$39,6 \pm 8,8$
Cativeiro (10-26)	> 8 anos	$1,3 \pm 0,2$	$12,1 \pm 3,2$	$52,7 \pm 5,5$	$26,9 \pm 3,7$

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO

Pareamento, corte e cópula

O lobo-guará apresenta uma forma dispersa de organização social, isto é, possui hábitos essencialmente solitários, sendo observados aos pares somente durante a estação reprodutiva, e nos primeiros meses de vida da prole (Dietz, 1984; Pró- Carnívoros, 2003; Cunha de Paula et al., 2013). Sua estrutura social e comportamento são resultado - dentre outros fatores - de um processo de adaptação ao seu nicho ecológico: sendo um grande predador cuja dieta baseia-se majoritariamente em presas de tamanho limitado, a caça em matilha é desnecessária e, portanto, os indivíduos coexistem em baixas densidades, permanecendo solitários ou pareados (Kleiman, 1972).

Não raramente os eventos que levam a formação de um novo casal dentro do território incluem a morte ou dispersão da fêmea original e sua substituição por uma fêmea jovem (aparentada ou não) seguida pela dispersão do macho então residente (em uma espécie de mecanismo natural para evitar endogamia). Após um período de estabelecimento da territorialidade, onde a fêmea exibe intenso comportamento demarcação de propriedade e agressividade coespecífica, a chegada e aceitação de um novo macho eventualmente ocorre (Dietz, 1985; Emmons et al., 2012). Uma vez formado, o casal compartilha territórios sobrepostos, porém raramente interagem fora do período reprodutivo (Dietz, 1984; Sperscoski, 2007). Via de regra, a espécie é considerada monogâmica facultativa, e os casais podem permanecer juntos por muitos anos, contudo, é comum que os machos eventualmente troquem de território e de parceira após múltiplas ninhadas concebidas (Emmons et al., 2012).

Como consequência de sua natureza solitária, o comportamento social da espécie enfatiza padrões de comunicação a longa distância como vocalizações interespecíficas e a defecação/micção próximos a locais de descanso, tocas e em marcos físicos, tais como estradas, pedras, trilhas e cupinzeiros. (Kleiman, 1972; Rodden et al., 1996). A produção destas pistas olfativas, não serve apenas a demarcação do território, como também é especialmente relevante dentro do contexto reprodutivo considerando-se a janela copulatória restrita da espécie. Sabe-se, por exemplo, que durante o proestro

fêmeas aumentam a frequência de micção como forma de comunicar seu status reprodutivo (estro) ao seu companheiro o que acaba por predizer o sucesso reprodutivo (Rodden et al., 1996). Há ainda, evidências de que a sinalização química através da urina masculina tenha papel essencial na indução do estro e/ou da ovulação, posto que fêmeas cativas com contato visual e olfativo com machos foram capazes de ovular ao passo que fêmeas apenas com acesso visual não (Johnston et al. 2014b; Kester et al.2016).

Durante o período de estro, o tempo de interação entre macho e fêmea aumenta consideravelmente. O comportamento de corte caracteriza-se pelas abordagens frequentes, inspeção ano genital mútua, farejar, posição lordótica e brincadeiras. Assim como observado em outros canídeos, sucesso do acasalamento inclui um 'engate' copulatório que pode durar muitos minutos (Rodden et al., 1996, 2004)

Cuidado parental e aloparental

Canídeos destacam-se entre carnívoros pelo nível e complexidade de cuidado parental e aloparental exibido pela maioria das espécies (Asa e Valdespino, 1998). Tratando-se de espécies monogâmicas tal qual o lobo-guará, é praticamente certo que o macho exerça alguma sorte de cuidado com os filhotes dentro de um contexto de investimento bi parental para a sobrevivência dos mesmos (Malcom, 1985).

A mãe exerce o papel de cuidadora principal e única durante as quatro primeiras semanas pós-parto, período de maior dependência dos filhotes e amamentação exclusiva. Durante este intervalo, assim como os filhotes, a mãe ficar confinada a toca, delimitando seu tempo e aérea de deslocamento á curtos períodos de forrageamento ao anoitecer (Melo et al. 2007). A partir do momento em que os filhotes saem da toca e passam a depender cada vez menos da amamentação e cada vez mais da regurgitação de alimentos, o tempo de interação mãe-filhotes diminui gradativamente (Veado, 1997; Rodden et al., 2004).

Neste interim, o tipo de comportamento parental exibido pelo macho é predominantemente indireto, sobretudo neste primeiro momento, no qual a fêmea pode tornar-se agressiva em resposta a qualquer tentativa de aproximação á toca (Kleiman, 2011).Ao mesmo tempo, há um aumento nas concentrações de andrógenos e

corticosteroides secretados pelo pai, o que sugere a intensificação de comportamentos de defesa de território (Sperciski, 2013), sendo esta a principal exercida função do macho então (Bestelmeyer, 2000; Melo et al., 2007; Emmons et al., 2012).

Ao passo que os filhotes emergem da toca, o pai passa a ter uma participação mais direta na sua criação, fornecendo alimento regurgitado e pequenas presas não apenas sua prole, mas também para a fêmea. Há uma diminuição no deslocamento e um aumento na frequência de visitas a área da toca (Bestelmeyer, 2000; Melo et al., 2007; Emmons et al., 2012), contudo, isso não significa o pai tomará para si a posição de 'babá' (o que implicaria revezamento em turnos nos cuidados de filhotes) (Melo et al., 2009; Emmons et al., 2012). Na realidade, em comparação com a fêmea, o tempo gasto pelo macho na interação e cuidados diretos com os filhotes é significativamente menor (Veado, 1997) e ele raramente é deixado a sós com sua cria (Melo et al. 2009).

O território do casal não raramente é coabitado por uma fêmea jovem proveniente de uma ninhada anterior. Ela permanece em seu território natal por um período superior ao nascimento da próxima ninhada, enquanto os demais filhotes, tendem a dispersar antes do início da próxima temporada reprodutiva. Os poucos dados observacionais disponíveis até então, sugerem que esta fêmea atua como 'ajudante' na criação dos filhotes mais jovens, provendo proteção e alimento para os mesmos (Emmons et al., 2012; Songsasen et al. 2014).

Ao que tudo indica, a presença desta ajudante é comum, mas não obrigatória. Com ninhadas pequenas, ela nem sempre está presente. Ela permanece no território por cerca de dois anos para então serem substituídas por fêmeas mais jovens, ou ainda 'herdar' o território com o desaparecimento ou morte de suas mães (Melo et al., 2009; Emmons et al., 2012). A herança dos territórios pelas filhas, bem como o fato de elas ocuparem a posição de ajudante sugerem que, para os lobos-guarás, o sexo socialmente dominante é o feminino e, portanto, as principais proprietárias do território são as fêmeas (Emmons et al., 2012).

OBSTÁCULOS À CONSERVAÇÃO *IN-SITU* E *EX-SITU*

O conhecimento da biologia reprodutiva é considerado uma peça chave no

desenvolvimento de estratégias de conservação. Igualmente importante é entender os fatores ambientais ou endógenos que podem interferir neste processo. O sucesso reprodutivo pode ser dificultado tanto populações pequenas e fragmentadas quanto em cativeiro, não apenas devido ao aumento da homozigose, mas também graças ao espaço restrito, problemas de saúde e manejo, dietas não adaptadas ou comportamento sexual anormal (Comizolli & Holt, 2019).

In-situ, a perda e fragmentação de habitat é considerada a causa primária de ameaça ao lobo-guará. Embora a espécie não tenha dificuldades em atravessar paisagens antropizadas (Jacomo et al. 2009; Trolle et al. 2007), o contato direto e indireto com humanos exerce efeitos extremamente deletérios sob as populações naturais, sobretudo aquelas que estão localizadas fora de áreas protegidas. Sabe-se, por exemplo, que lobos-guará vivendo ambientes alterados naturalmente secretam maiores concentrações glicocorticoides (Vynne, 2010) que, quando em níveis cronicamente elevados, possuem efeito supressório sobre a função reprodutiva (Pride, 2005). Este efeito já foi comprovado ao compararem os níveis de progestágenos secretados por fêmeas alocadas dentro e fora de áreas protegidas: as últimas claramente possuíam menores concentrações de progesterona (Vynne, 2010), hormônio cuja deficiência já foi associada a perda precoce de ninhadas, dentre outros distúrbios reprodutivos (Wasser et al., 1995; Velloso et al., 1998; Songsasen et al., 2006).

A exposição crônica aos glicocorticoides em concentrações elevadas também acabam por afetar a saúde geral do indivíduo, tornando-o mais susceptível a enfermidades. Tal fato torna-se especialmente relevante se considerarmos que, sob um ponto de vista sanitário, a antropização de ambientes acaba por facilitar o contato artificial de indivíduos selvagens com patógenos comuns à cães domésticos. Agentes infecciosos de doenças como a raiva, a parvovirose e a cinomose já foram detectadas em populações naturais (Deem & Emmons, 2005; Bronson et al., 2008) e seu efeito sob a dinâmica populacional a longo prazo é insipiente e preocupante.

Em cativeiro, baixos índices de concepção e as altas taxas de mortalidade de filhotes até um ano de idade são considerados os principais empecilhos na manutenção de uma população viável, de modo que, ainda hoje, a população cativa é dependente do influxo

de animais provenientes da natureza (Vanstreels & Pessutti, 2010; Songsasen & Rodden, 2010). Múltiplas variáveis contribuem para este sucesso reprodutivo escasso, sejam elas inerentes aos próprios padrões reprodutivos da espécie, ou ocasionadas por condições inadequadas de manejo:

Em primeiro lugar, o paramento de casais em cativeiro pode ser dificultado em virtude do maior grau de seletividade atribuído às espécies com sistemas de reprodução monogâmicos (Dietz, 1984; Pró-Carnívoros, 2003; Spercoski, 2007; Cunha de Paula et al., 2013). Assim, nem sempre casais geneticamente relevantes dentro do programa de reprodução terão afinidade entre si, e o intercâmbio de indivíduos entre instituições além de oneroso financeiramente também trarão custos físicos e emocionais aos indivíduos em questão. A incompatibilidade de casais pode ser contornada pela aplicação de técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial, contudo o desenvolvimento e aplicação deste tipo de técnica esbarra em características reprodutivas como a monoestria e a ocorrência ovulação induzida, que não apenas reduzem a possibilidade de concepção a uma curta janela anual, bem como complexificam a aplicabilidade de técnicas auxiliares, como a sincronização de estro e indução da ovulação (Dietz, 1984; Pró-Carnívoros, 2003; Spercoski, 2007; Cunha de Paula et al., 2013; Johnson et al., 2014b).

Ademais, o estresse crônico resultante de condições sub-ótimas de manejo é frequentemente associado baixos índices de sucesso reprodutivo e perda precoce da prole em carnívoros. Em um levantamento entre instituições brasileiras constatou-se que em um período de 37 anos, cerca de 79% de todos os filhotes de lobo-guará nascidos vieram a óbito no primeiro ano de vida (Vanstreels & Pessutti, 2010). Este dado torna-se especialmente alarmante se levarmos em conta que o tamanho médio da ninhada é de dois a quatro filhotes, números considerados modestos para um canídeo de seu porte (Rodden et al., 1996).

Fêmeas de lobo-guará que perderam seus filhotes, de uma maneira geral, apresentam menores concentrações de progestágenos durante a segunda metade da gestação (Songsasen et al., 2006) e maiores concentrações de corticosteroides durante a fase periovulatória (Songsasen & Rodden, 2010), quando comparadas com suas contrapartes

que criaram os filhotes com sucesso. Além disso, parece haver correlação positiva entre a concentração média de corticosteroides do casal e a mortalidade de filhotes (Sperciski, 2007). O cortisol pode ter efeito inibitório sobre a secreção de hormônios gonadais em mamíferos, de modo que, neste caso, a baixa na secreção de progesterona provavelmente afetou o ambiente uterino e, conseqüentemente, a saúde futura do filhote (Songsasen et al. 2014). A alta mortalidade neonatal também é frequentemente associada à inabilidade materna, sendo predominante fêmeas jovens (< 2 anos de idade) ou primíparas por conta da inexperiência e condição corporal inadequada (Lunn et al., 1994; Maia & Gouveia, 2002).

BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS

A preservação da diversidade genética afim de que se mantenham populações viáveis a longo prazo é considerada um dos pontos centrais da conservação. Populações selvagens reduzidas ou dispersas possuem poucas oportunidades para intercâmbio genético o que invariavelmente levará ao aumento da homozigose, redução da capacidade adaptativa e problemas de infertilidade (Wildt et al. 2010a). Dentro deste contexto encontra-se a importância das populações *ex-situ* que servem como *backup* genético para reforço, recuperação e reintrodução de populações *in-situ*. A manutenção da diversidade genética das populações cativas, apesar de dispendiosa e complicada, está sujeita às menores pressões ambientais e, conseqüentemente, a um maior controle de variáveis. Muitos programas de reprodução em cativeiro prosperam ao simplesmente estimular a reprodução natural sob condições de manejo ótimas, quando isso não ocorre, a solução é combinar estes esforços com técnicas de reprodução assistida (TRAs) (Wildt et al. 2010b).

Metodologias de coleta seminal

Como qualquer TRA, o emprego de técnicas envolvendo sêmen requer não apenas conhecimento prévio da biologia reprodutiva e respectivos parâmetros reprodutivos, bem como o estabelecimento de protocolos de coleta e preservação seminal adequados à espécie. A falta de conhecimento destes aspectos acaba se refletindo em péssimos resultados na aplicação de biotécnicas importantes para a conservação, como como a

inseminação artificial e a fertilização in vitro.

Embora não seja usual em canídeos selvagens, o uso da manipulação digital para coleta de sêmen já foi aplicada com sucesso para lobos-guará de cativeiro em diferentes ocasiões (Rego de Paula et al. 2002, Mascarenhas et al.2007, Carneiro et al. 2011, Teodoro et al.2012). O tempo decorrido para obtenção de ereção é variável de acordo com a época do ano, sendo mais rápido (até 5 minutos) dentro de estação reprodutiva e mais lento fora de estação (6 a 10 minutos) (Teodoro et al. 2012). Apesar de possuir boas taxas de sucesso, o emprego deste tipo de técnica está restrito ao cativeiro pois exige longo período de condicionamento, que, em alguns casos, pode durar até um ano (Carneiro et al. 2011, Teodoro et al. 2012). O uso da manipulação digital ainda oferece riscos de segurança a quem manuseia o animal, além de ter potencial de alterar o seu comportamento natural (Paula et al. 2002; Minter e Deliberto 2005): para populações ou indivíduos visados para reintrodução, o habituação à presença e manipulação por humanos é fortemente contraindicado.

Ainda neste interim, a eletroejaculação é o método de eleição na coleta de sêmen para a maioria dos animais selvagens, não apenas pela sua praticidade (não exige condicionamento), mas também por ser mais segura e abrangente. Para o lobo-guará, esta técnica já foi testada múltiplas vezes com diferentes taxas de sucesso (Fletchall et al. 1995, Nunes da Cunha et al. 2008; Comizzolli et al.2009; Songsasen et al. 2014; Johnson et al.2014a).

Os animais devem obrigatoriamente estar sob sedação química (3-5mg/kg de cloridrato de tiletamina e zolazepam ou associação de 1mg/kg tiletamina-zolazepam + 1mg/kg Cetamina + 0,4 mg/kg butorfanol). Em geral, os animais são submetidos a 60-90 estímulos de baixo nível (2-12 volts) divididos em duas três series intervaladas de 20-30 estímulos por procedimento. Enquanto Nunes da Cunha e colaboradores (2008) (80 estímulos de 4-12 volts) não obtiveram ejaculação em nenhuma de suas tentativas, Johnson e colaboradores (2014) utilizaram protocolo semelhante (até 90 estímulos de 2-5 volts) com sucesso. Cada procedimento deve durar por volta de 30 minutos.

Adicionalmente, vale destacar que um dos principais empecilhos associados a eletroejaculação nesta espécie é a facilidade da contaminação da amostra por urina

(Fletchall et al. 1995; Songsasen et al.2014), que apesar de frequente, não é um problema exclusivo da espécie, sendo comum a diversos canídeos selvagens. A presença de urina tem efeitos prejudiciais sobre as células espermáticas por alterar o pH e a osmolaridade seminais, o que pode levar a uma redução na motilidade e aumento nas proporções de defeitos espermáticos (Mackler et al.1981). A cateterização previa da uretra, esvaziamento e lavagem da bexiga (com solução salina estéril ou ainda diluentes seminais) não apenas é comum como recomendada para evitar situações como essa (Nunes da Cunha et al.2008; Johnson et al. 2014a).

Criopreservação de sêmen

O sêmen do lobo-guará, assim como a maioria de seus cofamiliares, também apresenta hipersensibilidade a desidratação e criopreservação, o que resulta em péssima motilidade pós- aquecimento (Johnson et al. 2014a). Aspectos como a motilidade espermática e susceptibilidade ao estresse osmótico, são extremamente sensíveis a mudanças na osmolaridade do meio em que se encontram, de modo que espécies como o lobo-guará, cujo sêmen possui osmolaridade relativamente maior do que a espécie domestica mais próxima, o cachorro (321-388 mOsmol vs. ~310 mOsmol, respectivamente) não de adaptam bem a diluentes comerciais (Teodoro et al. 2012, Johnson et al. 2014a). Assim, há relatos do uso de apenas dois crioprotetores nesta espécie: DMSO e glicerol, sendo que o primeiro obteve os melhores resultados em relação a motilidade final pós-descongelamento (57%) (Mascarenhas et al., 2007; Johnson et al., 2014a).

Indução de atividade ovariana de ovulação

Johnson e colaboradores (2014b) até o momento, foram os únicos a relatarem a indução da atividade ovariana e subsequente ovulação usando um agonista do GnRH, a desorrelina, e LH recombinante respectivamente. Fêmeas adultas solitárias e pareadas receberam implante subcutâneos de dessorelina (2,1 mg) que foram retirados de 7-11 dias depois. Parte das fêmeas solitárias receberam, no dia da retirada do implante, injeção única de 0,0375 mg de LH recombinante. Através da análise de esteroides fecais (metabólitos de estrógenos e progestágenos) provou-se que o tratamento com dessorelina foi capaz de estimular a atividade ovariana em todos os animais, ao passo

que a ovulação (representada hormonalmente por uma onda de estrógenos seguida por um pico de progestágenos) só foi possível nas fêmeas pareadas e nas fêmeas solitárias que receberam LH recombinante. A dose escolhida de LH recombinante por sua vez, provou-se capaz de desencadear a ovulação em todas as fêmeas testadas.

Os estudos destes autores não apenas revelaram que a presença do macho é essencial para o desencadeamento da ovulação em condições naturais, bem como forneceu as primeiras bases para desenvolvimento de protocolos de sincronização de estro e ovulação e subsequente inseminação artificial para a espécie. Vale ressaltar que, apesar do uso da desorrelina ser questionável em algumas espécies de canídeos por poder afetar saúde uterina (Arlt et al. 2011), levar a luteólise prematura (Swanson et al. 1997) ou ainda a supressão da reprodução (implantes de longa ação), nas fêmeas avaliadas a dose utilizada aparentemente não afetou a capacidade de sucesso reprodutivo em estações reprodutivas subsequente em pelo menos uma das fêmeas pareadas.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A elaboração de estratégias de conservação e, conseqüentemente, de ações eficazes para manutenção de populações viáveis de uma espécie ameaçada é uma questão complexa e multifatorial. O conhecimento de aspectos básicos da biologia reprodutiva do lobo-guará - tema central desta revisão - é apenas uma das peças neste quebra-cabeças de fatores. A partir das informações aqui reunidas, pudemos concluir que as principais limitações para o estabelecimento de ações de conservação mais efetivas dentro do escopo reprodutivo da espécie, estão fundamentadas em uma única questão: a falta de conhecimento aprofundado acerca de sua história de vida.

Dentro da perspectiva reprodutiva, o conhecimento padrões específicos da história de vida do lobo-guará, tais como a idade a puberdade, a senescência reprodutiva, função gonadal e comportamento parental, está repleto de lacunas e imprecisões. A falta de especificidade acerca dos processos de puberdade e senescência, por exemplo, afeta as populações naturais ao tornarem imprecisas avaliações importantes como a de taxa de crescimento, de viabilidade reprodutiva e do desempenho geral de populações. Ao mesmo tempo, um conhecimento mais amplo a respeito destas etapas da história de vida

implicaria em uma evolução na elaboração de estratégias de manejo reprodutivo em cativeiro, otimizando a capacidade e vida reprodutiva de cada indivíduo.

Dentro deste mesmo contexto, a relativamente recente descoberta da ocorrência da ovulação induzida na espécie, é uma prova de que, apesar de possuir aspectos básicos bem caracterizados, o estudo da função gonadal da espécie ainda carece de aprofundamento. Neste sentido, estudos dos padrões gonadais sob condições naturais ainda tão raros nesta espécie, poderiam fornecer o *background* ideal para a interpretação dos padrões gonadais e reprodutivos observados em cativeiro. Dentro desta mesma premissa, a caracterização em vida livre de aspectos comportamentais únicos a espécie, como por exemplo a (também) recém-descoberta do papel da fêmea jovem como 'ajudante', poderiam implicar na reformulação de medidas de manejo em cativeiro que, por sua vez, poderiam resultar em menor mortalidade de filhotes.

Ainda que grande parte das sugestões aqui dispostas envolvam a caracterização mais aprofundada da fisiologia reprodutiva básica, devemos ressaltar que os avanços na pesquisa reprodutiva aplicada na espécie não devem ser ignorados. Levando-se em conta os resultados obtidos até então, sugerimos que estudos nesta área continuem a focar no desenvolvimento e adaptação de técnicas de reprodução assistida que visem contornar as características fisiológicas peculiares já descritas, em especial a ovulação induzida e a alta osmolaridade e baixa qualidade seminal. Em um desdobramento futuro, a junção do conhecimento da fisiologia básica e destas mesmas técnicas permitiria uma maior precisão no estabelecimento de protocolos de sincronização de estro, superovulação ou ainda na adequação de diluente seminal para a espécie. Este tipo de abordagem é, em última instância, essencial para o aperfeiçoamento de técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial, fertilização in vitro e transferência de embriões, consideradas indispensáveis para o aprimoramento do manejo genético destas populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHO, C. J. R.; PEREIRA, L. A.; PAULA, A. C. Patterns of habitat utilization by small mammal populations in cerrado biome of central Brazil. **Mammalia**, Berlim, v.50, p.447-460, 1986.

- ARLT, S.P.; SPANKOWSKY, S.; HEUWIESER, W. Follicular cysts and prolonged oestrus in a female dog after administration of a deslorelin implant. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.59, p. 87–91, 2011.
- ASA, C.S. Reproductive biology and endocrine studies. In: BOITANI, L.; POWELL, R.A. **Carnivore Ecology and Conservation**. Oxford: Oxford University Press, 2012. cap.12. p.273-93.
- ASA, C.S. et al. Evidence for induced estrus or ovulation in a canid, the island fox (*Urocyon littoralis*). **Journal of Mammalogy**, v.88, p. 436–440, 2007.
- ASA, C.S.; VALDESPINO, C. Canid reproductive biology: an integration of proximate mechanisms and ultimate causes. **American Zoologist**, v. 38, p.251–259, 1998.
- BAKER, J.R. The evolution of breeding seasons. In: DE BEER, G.R. **Evolution: Essays Presented to E. S. Goodrich**. Oxford: Oxford University Press, 1938. 350 p.
- BESTELMEYER, S.V. **Solitary, reproductive, and parental behavior of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*)**. 2000, 192 p. PhD Thesis, Colorado State University, Fort Collins, 2000.
- BOWLER, D.E.; BENTON, T.G. Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. **Biological Reviews**, Cambridge, v.80, p. 205–225, 2005.
- BRONSON, E. et al. Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Florida, v.39, p.28–36, 2008.
- CARNEIRO, F.T. et al. Caracterização morfológica do sêmen de dois lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) da microrregião de Viçosa. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2011, Recife. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2011.
- CLAPHAM, P.J. Age at attainment of sexual maturity in humpback whales, *Megaptera novaeangliae*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa v.70, p.1470–1472, 1992.
- COMIZZOLI, P. et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, Supl. 2, p. 47–52, 2009.
- COMIZZOLI, P.; HOLT, W.V. Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. **Biology of Reproduction**, Virginia, ioz031, p.1–12, 2019. Edição especial.

- CUNHA DE PAULA, R. et al. Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília DF, v.3, n.1, p.146-159, 2013.
- CUNHA DE PAULA, R.; DESBIEZ, A.L.J. Maned Wolf Population Viability. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.2.p.15-34.
- DEEM, S.L.; EMMONS, L.H. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Florida, v.36, p.192–197, 2005.
- DIETZ J.M. *Chrysocyon brachyurus*. **Mammalian Species**, v.234, p.1–4,1985.
- DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contribution to Zoology**, Washington DC, v.392, p. 1–51, 1984.
- EMMONS, L.H. et al. Social interactions and reproduction. In: EMMONS, L.H. **The Maned Wolves of Noel Kempf Mercado National Park**. Washington DC: Smithsonian Institute Scholarly Press, 2012. p. 57–75.
- FLETCHALL, N.B. Natural History. In: FLETCHALL, N.B; RODDEN, M.; TAYLOR, S. **Husbandry Manual for the Maned Wolf *Chrysocyon brachyurus***. MWSSP, 1995, cap.1. p. 6-9.
- FOUNTOURA-RODRIGES, M.L.; EIZIRICK, E. Evolutionary and Conservation Genetics of the Maned Wolf. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.6.p.77-86.
- HOLLAND, R. The Maned wolf Ex Situ Worldwide. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.4.p.53-62.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Lista de espécies terrestres e mamíferos aquáticos ameaçados - Portaria MMA nº444, de 17 de dezembro de 2014**. 13 p., 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/faunabrasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2017.
- JACOMO, A. T. D. et al. Home range and spatial organization of maned wolves in the Brazilian grasslands. **Journal of Mammalogy**, v.90, p.150-157, 2009.

- JOHNSON A.E.M. et al. Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hyper-sensitivity to osmotic and freezing-induced injury but respond favorably to dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v.68, p. 361–370, 2014.
- JOHNSON, A.E.M. et al. Induction of ovarian activity and ovulation in an induced ovulator, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), using GnRH agonist and recombinant LH. **Theriogenology**, Milan, v.82, p. 71–79, 2014.
- KARSCH, F. J. et al. Neuroendocrine Basis of Seasonal Reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, v.40, p.185–232, 1984.
- KESTER, M.E. et al. Automated Headspace Solid-Phase Microextraction of Urinary VOCs from Eleven Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*): A Recursive Workflow for GC–MS Analysis. In: SCHULTE, B.A.; GOODWIN, T.E.; FERKIN, M.H. **Chemical Signals in Vertebrates 13**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016, p.477-498.
- KLEIMAN, D.G. Social Behavior of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and Bush Dog (*Speothos venaticus*): A Study in Contrast. **Journal of Mammalogy**, v.53, n.4, p.791-806, 1972,
- KLEIMAN, D.G. Social behavior of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dog (*Speothos vanaticus*): A study in contrast. **Journal of Mammalogy**, v.53, p.791–806, 1972.
- KURTIN, B. **The age of mammals**. New York: Columbia University Press, 1971. 250 p.
- LARIVIÈRE, S.; FERGUSON, S.H. Evolution of Induced Ovulation in North American Carnivores. **Journal of Mammalogy**, v.84, n.3, p. 937–947, 2003.
- LUNN, N.T.; BOYD, I.L.; CROXALL, J.P. Reproductive performance of female Antarctic fur seals: the influence of age, breeding experience, environmental variation and individual quality. **Journal of Animal Ecology**, London, v.63, p. 827–840, 1994.
- MAIA, O.B.; GOUVEIA, A.M.G. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.62, p.25–32, 2002.
- MAIA, O.B. et al. Comparison of serum hormone levels of captive and free-living maned wolves *Chrysocyon brachyurus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v.41, p.176-179, 2008.

- MAKLER, A. et al. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of urine specimens. **Fertility and Sterility**, v. 4, p. 507-511, 1981.
- MALCOM, J.R. Paternal care in canids. **American Zoologist**, v.25, p.853-856, 1985.
- MASCARENHAS, R.M. et al. Parâmetros e congelabilidade do sêmen de Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*). In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007, Curitiba. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2007.
- MELO, L.F.B. et al. First observations of nest attendance behavior by wild maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*. **Zoo biology**, San Francisco, v.28, n.462, p.69–74, 2009.
- MELO, L.F.B. et al. Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815): As revealed by GPS tracking collars. **Journal of Zoology**, Massachusetts, v.271, p.27–36, 2007.
- MINTER, L.J.; DELIBERTO T.J. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**, Milan, v.64, p.1898–1912, 2005.
- NUNES DA CUNHA, I.C. et al. Biometry of the reproductive system and the ejaculation response of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) to electroejaculation procedure. In: 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction and 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress, 2008, Vienna. **Proceedings...** Vienna: IVIS, 2008.
- PAULA, R.C.; DEMATTEO, K. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T4819A88135664. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>>. Acesso em: 7 ago. 2016.
- PAULA, T.A.R. et al. Acompanhamento anual da concentração de patologias espermáticas de lobo-guara adulto (*Chrysocyon brachyurus*). In: VI CONGRESSO E XI ENCONTRO DA ABRAVAS, 2002, Guarapari. **Anais...** Guarapari: [s.n.], 2002.
- PRATES, P.H.S. **Diversidade genética e história evolutiva do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*)**. 2008, 71p. Tese (Doutorado em Biociência – zoologia), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- PRIDE, R.E. High faecal glucocorticoid levels predict mortality in ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). **Biology Letters**, London, v.1, p.60–63, 2005.

- PRÓ CARNÍVOROS. **Plano de manejo:** biologia comportamental e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no cerrado de Minas Gerais – MG. Proposta apresentada ao Fundo Nacional do Meio Ambiente – FNMA. 2003.
- REGO DE PAULA, T.A. et al. Acompanhamento anual da concentração e patologias espermáticas de lobo-guará adulto (*Chrysocyon brachyurus*). In: VI Congresso e XI Encontro da ABRAVAS, 2002, Guarapari. **Anais...** São Paulo: ABRAVAS, 2002.
- REITER, L.E. **Understanding Poor Reproduction in The Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) Held Ex Situ.** 2006, 117 p. Thesis (Master in Master of Arts in Interdisciplinary Studies), Interdisciplinary Studies, George Mason University. Fairfax, VA.2006.
- ROBINSON, T.J. Reproduction in cattle. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals.** 3rd ed. New York: New York Academic Press, 1977. p. 433– 441.
- RODDEN, M. D. et al. Use of behavioral measures to assess reproductive status in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Zoo Biology**, San Francisco, 15: p. 565 – 585. 1996.
- RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D.W. **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs.** Cambridge: IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge 2004. cap.3, p.38–43.
- RODRIGUES, F.H.G. **Biologia e conservação do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF.** 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- RODRIGUES, M.L.F. **Diversidade genética e estrutura populacional do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).** 2009, 42 p. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SANTOS, E.F.; GOBBI, N.; FELIPPE, P.A.N. A Case Study: Diet of Maned Wolf and Its Relationship to Seed Dispersal at a Cattle Ranch in Southeastern Brazil. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives.** Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.11.p.153-164.
- SILLERO-ZUBIRI, C. The Canidae Family: Setting the Scene for Maned Wolf Conservation. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives.** Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.1.p.3-14.

- SONGSASEN, N. et al. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Theriogenology**, Milan, v.66, p.1743–1750, 2006.
- SONGSASEN, N. et al. Reproduction and Factors Affecting Reproductive Success in the Maned Wolf. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.8.p.99-108.
- SONGSASEN, N.; RODDEN, M. The role of the Species Survival Plan in Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* conservation. **International Zoo Yearbook**, London, v. 44, n.1, p.136-148, 2010.
- SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.24, p.417–63, 2000.
- SPERCOSKI, K.M. **Fisiologia Reprodutiva De Lobos-Guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) e Estresse De Cativeiro: Monitoramento Em Longo Prazo da Função Gonadal e Adrenocortical**. 2013, 122 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2013.
- SPERCOSKI, K.M. **Monitoramento a longo prazo da excreção de corticoides fecais em lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) de cativeiro e vida livre: uma contribuição para o manejo e a conservação da espécie**. 2007, 68 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- SWANSON, W.F. et al. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, Virginia, v.57, p.295–302, 1997.
- TEODORO, L.O. et al. Seasonal Aspects of Reproductive Physiology in Captive Male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, Supl. 6, p. 250–255, 2012.
- TROLLE, M. et al. Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, Netherlands, v.16, p.1197-1204, 2007.
- VANSTREELS, R.E.T.; PESSUTTI, C. Analysis and discussion of Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* population trends in Brazilian institutions: lessons from the Brazilian studbook, 1969–2006. **International Zoo Yearbook**, London, v.44, p.121–135, 2010.
- VEADO, B.V. Parental behavior in maned wolf *Chrysocyon brachyurus* at Belo Horizonte Zoo. **International Zoo Yearbook**, London, v.35, p.279–286, 1997.

- VELLOSO, A. L. et al. Longitudinal Fecal Steroid Excretion in Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and Comparative Endocrinology**, v.112. p. 96–107,1998.
- VYNNE, C. **Landscape use by wide-ranging mammals of the cerrado**. 2010, 144 p. PhD Thesis, University of Washington, Seattle, 2010.
- WASSER.S.K.; VELLOSO, A.L.; RODDEN, M. Using Fecal Steroids to Evaluate Reproductive Function in Female Maned Wolves. **The Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 59, n. 4, p. 889-894, 1995.
- WILDT, D.E. et al. Lessons from biodiversity: the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. **Mol.Reprod.Dev.** New Jersey, v.77, p. 397–409, 2010.
- WILDT, D.E. et al. Felids ex situ: Managed programs, research and species recovery. In: MACDONALD, D.; LOVERIDGE, A.J. **The biology and conservation of wild felids**. Oxford: Oxford University Press, 2010. cap.8, p.217-237.

CAPÍTULO II.

Do freezer à bancada: o uso de amostras de banco de recursos genéticos para determinar efeito da idade e de fatores ambientais sobre a concentração de esteroides sexuais de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de vida-livre

Gabriela Siqueira Martins^{1*}, Claudio Alvarenga de Oliveira¹, Nucharin Songsasen²

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Center of Species Survival, Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, VA USA.

* Autor para correspondência: gabi.smartins@outlook.com

RESUMO

A falta de conhecimento acerca de aspectos básicos da fisiologia reprodutiva é um dos principais obstáculos na utilização dos materiais disponíveis em Bancos de Recursos Genômicos (BRGs) em protocolos de conservação de espécies ameaçadas. Em geral, amostras que não sejam gametas ou embriões raramente são utilizadas para estudos reprodutivos. A presente pesquisa buscou demonstrar o potencial de uso que amostras de soro provenientes de BRGs, possuem no desenvolvimento de pesquisa de caráter exploratório nesta área. Utilizamos parâmetros endócrinos para detectar a fase pubertal e os períodos sazonais de atividade reprodutiva em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de vida-livre. Adicionalmente, utilizamos dados pluviométricos da região para avaliar a possível influência chuva sobre o padrão endócrino anual. Os resultados obtidos sugerem que, em concordância com dados observacionais, a puberdade ocorre entre o primeiro e o terceiro anos de vida. Ademais, nossos resultados reafirmaram um padrão endócrino-reprodutivo sazonal concentrado majoritariamente nos dias curtos de outono. Contudo, a ocorrência de um segundo período de elevação nas contrações hormonais durante a primavera sugere que o início da estação chuvosa possa atuar como um gatilho

precoce para o início da atividade reprodutiva nesta espécie. Os dois momentos de alta hormonal em épocas diferente do ano, podem implicar na ocorrência de estro precoce ou até mesmo poliestria. Ambas as condições podem ainda estar associadas a presença de ovulação induzida nas fêmeas desta espécie que, na impossibilidade de acasalamento durante o outono ou ainda quando há perda precoce de ninhada, poderia obter uma segunda oportunidade de sucesso reprodutivo.

Palavras-chave: lobo-guará; esteroides sexuais; puberdade; sazonalidade; chuva.

INTRODUÇÃO

O sucesso na conservação de espécies ameaçadas é dependente de abordagens diversas e complementares que devem ter como prioridade a manutenção da biodiversidade por meio do estabelecimento de populações sustentáveis (i.e.: geneticamente diversas) (Leon-Quinto et al. 2009). Na maioria dos casos, isso requer não apenas desenvolvimento de ações de preservação *in situ*, mas também o apoio estratégico, estrutural e epistemológico que apenas o cativeiro pode oferecer. Programas de reprodução *ex situ* e a criopreservação de recursos genéticos estão entre as principais estratégias adotadas neste sentido, sobretudo quando a preservação da viabilidade genética de populações pequenas está em questão (Comizzolli et al. 2009). Dentro deste contexto, em contraponto à preservação *in vivo* realizada pelos zoológicos, os bancos de recursos genéticos (BRGs) desempenham o papel pivotal de reservatórios da diversidade genética *in vitro* (material biológico).

O uso dos recursos disponíveis nos bancos genômicos tem sido promovido extensivamente, principalmente em associação a técnicas de reprodução assistida, tais como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a fertilização *in vitro*. Em última instância, esta combinação representa a interface ideal entre conservação *in situ* e *ex situ* (Holt al. 1996; Andrabi & Maxwell, 2007; Leon-Quinto et al. 2009). Apesar disso, esta abordagem requer extensivo conhecimento técnico e teórico, principalmente acerca da fisiologia reprodutiva do animal, o que - como a própria condição de risco destas espécies sugere - nem sempre está disponível ou é facilmente alcançável (Comizzolli et al. 2009). Felizmente, o mesmo banco que oferece o material para aplicação das tecnologias chamadas “de ponta”, também pode propiciar meios para a

resolução do principal obstáculo à sua aplicação: a falta de conhecimento da biologia básica.

Embora o conceito dos BRGs seja amplamente associado ao armazenamento de germoplasma e embriões, a preservação de outros tipos de material biológico também pode ser útil para fins de conservação da vida selvagem (Leon-Quinto et al. 2009). A partir da coleta e armazenamento de sangue, por exemplo, podem ser obtidos soro, plasma, células sanguíneas, DNA e culturas de tecidos e células (Wildt et al. 1997) – todos com inúmeras possibilidades de aplicação. Não obstante, amostras desta natureza geralmente são coletadas separadamente, com o objetivo de desenvolver estudos específicos no campo da genética ou epidemiologia, e raramente são preservadas depois disso. No presente estudo, propomos uma alternativa para utilização deste material ‘excedente’ na pesquisa de aspectos básicos da fisiologia endócrina reprodutiva de uma espécie ameaçada, de maneira a reforçar que o potencial de uso dos recursos disponíveis BRGs no campo da reprodução não está restrita ao uso de embriões e gametas.

A nossa espécie de estudo foi o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), canídeo sul-americano, natural das áreas de descampados e vegetações abertas que constituem um dos biomas mais ricos e ameaçados do planeta: o cerrado (Myers et al. 2000; Klink e Machado, 2005). Em virtude da destruição e fragmentação de seu habitat para conversão em terras agrícolas, atualmente a espécie passa por um delicado período de declínio populacional (Rodden et al. 2004). Como consequência, o lobo-guará figura nas principais listas de espécies ameaçadas de extinção do mundo, sendo considerada ‘Vulnerável’ (ICMBio, 2018) no Brasil e ‘Quase Ameaçada’ (NT – “near threatened”) internacionalmente (IUCN, 2019). Em cativeiro, baixos índices de concepção e as altas taxas de mortalidade de filhotes até um ano de idade são considerados os principais empecilhos na manutenção de uma população viável.

A maior parte do conhecimento que se tem atualmente sobre a função endócrino-reprodutiva do lobo-guará originou-se de poucos estudos não-invasivos (fezes) realizados em cativeiro (ao exemplo de Wasser et al. 1995; Velloso et al. 1998; Songsasen et al. 2006; 2014; Reiter, 2006; Maia et al. 2008; Teodoro et al. 2012; Spencoski, 2013).

Estes estudos ajudaram a estabelecer alguns dos fundamentos da biologia reprodutiva da espécie como a sazonalidade reprodutiva, a monoestria e a duração e características do ciclo estral (revisados em Martins et al.2019, Capítulo 1). Ainda são raros, no entanto, os estudos acerca deste tema em vida livre (Maia et al., 2008; Vynne, 2010).

Por permitirem avaliação da função endócrina em condições naturais, os estudos *in situ* podem ser utilizados para identificar características específicas do ciclo reprodutivo dentro ou entre populações (Kersey & Denhard, 2014). Hormônios traduzem informações ambientais em sinais fisiológicos de modo que a percepção de um estímulo ambiental pode ser inferida a partir de mudanças correspondentes em níveis hormonais relevantes (Wingfield & Farner, 1993). Assim, os padrões temporais de secreção hormonal em vida livre podem ser utilizados na avaliação requisitos ambientais para a reprodução (i.e.: temperatura, precipitação, fotoperíodo, disponibilidade de alimento), além de servirem como um dos primeiros indicadores da perturbação do processo reprodutivo (seja em virtude de patologias reprodutivas ou como consequência de alterações ambientais) (Wingfield et al.1997), o que é especialmente relevante no caso do lobo-guará. Este tipo de estudo também acaba fornecendo o modelo ideal para monitorar o desempenho reprodutivo em programas de reprodução em cativeiro (Wingfield et al.1997). Ademais, a observação aumento da secreção hormônios gonadais de animais jovens é um dos principais indicadores da maturidade sexual (Asa, 2012), parâmetro que, por sua vez, é extremamente relevante para avaliações das taxa de crescimento, de viabilidade reprodutiva, do desempenho geral de populações e até mesmo do estado de conservação de populações selvagens (Labrada-Martagón et al.2014; IUCN, 2012)

Em vista da oportunidade de avaliar amostras de soro provenientes de animais de vida livre de diferentes idades, a presente pesquisa foi idealizada com o objetivo de lançar luz sobre algumas das etapas da história de vida do lobo-guará através de seus respectivos correlatos hormonais. Em uma nota mais específica, buscamos caracterizar os perfis etários e temporais de esteroides sexuais (testosterona e estradiol) em uma população protegida de lobos-guará. Com isso, pretendemos identificar as possíveis influências de fatores ambientais (mais especificamente, da chuva) sobre o estabelecimento da reprodução, bem como estabelecer a (até o momento imprecisa) janela de idade a

maturidade sexual para a espécie. Esperamos ainda que os padrões encontrados não apenas sirvam de referência para estudos reprodutivos em populações cativas, mas também forneçam uma base para estudos que visem avaliar o impacto das mudanças ambientais sobre os índices reprodutivos das populações de fora das áreas protegidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA nº 1289140318).

Indivíduos e amostras

Para as análises conduzidas na presente pesquisa foram utilizadas 111 amostras de soro de lobo-guará (56 amostras de machos e 55 amostras de fêmeas) cedidas pelo banco de recursos genéticos do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros (CENAP) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Foram selecionadas apenas amostras de indivíduos de vida livre e idade conhecida (3 meses a 13 anos), pertencentes à população residente no Parque Nacional de Serra da Canastra (Minas Gerais, Brasil) e entornos, totalizando 39 machos e 31 fêmeas. Todas as amostras utilizadas foram coletadas ao longo de um período de treze anos (2002-2015).

Área de estudo

O Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) (46°150W, 20°000S) está localizado no sudoeste do estado de Minas Gerais, Brasil e abrange 2000 km², dos quais 715,2 km² são regulados e gerenciados pelo ICMBio e o restante é de posse privada. A vegetação é composta predominantemente de prados abertos, sendo 35% considerados Cerrado. As terras de fazenda ao redor do parque são ocupadas majoritariamente por pecuária, plantações de subsistência e grandes plantações de café e milho (Dietz 1984, Spercoski et al. 2012). O clima predominante é o Tropical sazonal de inverno seco. A temperatura média anual fica em torno de 22-23° C, sendo que as médias mensais apresentam pequena estacionalidade. Em geral, a precipitação média anual fica entre 1.200 e 1.800 mm. Ao contrário da temperatura, a precipitação média mensal apresenta uma grande

estacionalidade, concentrando-se nos meses de primavera e verão (outubro a março), que é a estação chuvosa. No período de maio a setembro, os índices pluviométricos mensais reduzem-se bastante, podendo chegar a zero. Disto resulta uma estação seca de três a cinco meses de duração (MMA-IBAMA, 2005).

Dados meteorológicos e Climograma

Os dados pluviométricos utilizados para avaliar a influência da estação do ano (seca ou chuva) sobre os hormônios esteroides foram obtidos na plataforma do Instituto Nacional das Águas (ANA). Foram selecionados sete postos pluviométricos da região do PNSC, com séries históricas que variavam entre 17 e 30 anos (Apêndice A). A partir destes dados foi construído um climograma (Walter, 1973) que, por sua vez, foi utilizado para definir o que seria considerado estação seca e chuvosa. Climogramas demonstram o balanço hídrico de uma região ao contrapor a média mensal da temperatura máxima com a média da pluviosidade (mm). O superávit hídrico é considerado quando a altura da pluviosidade ultrapassa em até duas vezes a média da temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$). Assim, para os fins deste estudo, a estação seca foi definida entre os meses de maio a agosto e a estação chuvosa de setembro a abril (Figura 1).

Figura 1. Climograma da região do Parque Nacional da Serra da Canastra (MG- Brasil) baseado em séries meteorológicas históricas (1988-2018): barras listradas simbolizam a

precipitação média mensal (mm); linha simboliza o limiar do superávit hídrico, isto é, o dobro da temperatura média máxima mensal (°C).

Classificação etária e reprodutiva

Os indivíduos selecionados foram classificados em três categorias etárias, conforme sugerido por Cunha de Paula e colaboradores (2014), sendo elas: jovem (3 - 12 meses de idade), sub adulto (>1 - 3 anos de idade) e adultos (>3 - 14 anos de idade). Amostras de adultos e sub adultos, por sua vez, foram classificadas de acordo com o status reprodutivo, considerando-se a estação reprodutiva extensivamente descrita para a espécie (i.e.: Dietz, 1984; Comizzolli et al. 2009; Emmons et al., 2012). Assim, amostras coletadas entre os meses de março e junho foram consideradas dentro de estação reprodutiva, ao passo que amostras coletadas entre julho e fevereiro foram consideradas como fora de estação reprodutiva. Todas as amostras foram mantidas em freezer -80°C até o início das análises.

Dosagens hormonais

As concentrações de testosterona nos machos e de estradiol nas fêmeas foram quantificadas por meio de ensaios imunoenzimáticos (EIAs) utilizando-se anticorpos para testosterona (policlonal, R156/7, diluição de 1:50.000) e estradiol (policlonal, R4972, diluição de 1:40.000) e enzima peroxidase (HRP, testosterona, 1:50.000; estradiol, 1:110.000) fornecidos pela Dra. Coralie Munro (University of California, Davis, CA, EUA). O anticorpo R156/7 possui reação cruzada de 100% com testosterona, 57,37% com 5 α -dihidrotestosterona e 0,27% com androstenediona ao passo que o anticorpo R4972 possui reação cruzada de 100% com 17 β -estradiol, 3,3% para estrona, 1% com testosterona e 0,8% para progesterona.

O EIA de testosterona para a espécie foi previamente validado por Spercoski e colaboradores (2012), ao passo que o ensaio de estradiol teve sua validação constatada por meio da demonstração de paralelismo entre a curva formada com diluições seriadas de soro puro e a respectiva curva padrão (coeficiente de correlação de Pearson, $r > 0,95$). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de <10% ($n=3$ para testosterona e $n= 2$ para estradiol). A

sensibilidade dos ensaios foi de 2,30 pg/poço para testosterona e 1,95 pg/poço para estradiol.

Análise estatística

Influência da idade, status reprodutivo e época do ano sobre os níveis de estradiol (fêmeas) e testosterona (machos).

Uma vez que as concentrações de gonadotrofinas e a morfologia gonadal estavam além do escopo deste estudo, o aumento na produção de andrógenos nos machos e estrógenos nas fêmeas foi usado como indicador tanto do início da atividade gonadal em animais jovens e sub adultos, quanto da função reprodutiva em animais maduros. Assim, a variação dos níveis de hormônios esteroides foi abordada a partir de três perspectivas, idade (jovens, sub adultos e adultos), status reprodutivo (dentro ou fora de estação reprodutiva) e período do ano (seca ou chuva). A significância dos fatores biológicos e ambientais foram averiguados construindo-se diferentes Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMER, usando pacote *lme4* no software R (versão 1.1.463). Devido à não-normalidade das contrações hormonais, outliers foram identificados visualmente e excluídos, e os valores remanescentes de concentração foram log-transformados para se obter uma distribuição normal dos dados. No total, uma amostra foi excluída do conjunto de machos e três amostras foram excluídas do conjunto das fêmeas.

Os modelos foram construídos com combinações dos efeitos fixos categóricos “Categoria Etária” (Jovem, Sub Adulto e Adulto), “Status Reprodutivo” (dentro ou fora de estação reprodutiva) e “Época do Ano” (Seca ou Chuva). A identidade dos indivíduos foi incluída como efeito aleatório em todos os modelos a fim de se explicar medições repetidas de um mesmo indivíduo em diferentes ocasiões. Excluindo-se os outliers o conjunto de dados utilizado totalizou n=55 amostras para machos e n=52 amostras para fêmeas. Adicionalmente, com objetivo de apurar a influência da chuva sobre os níveis hormonais sem o efeito do estação reprodutiva ou idade, foram construídos modelos baseados em amostras de indivíduos maduros (adultos e sub adultos) e fora de estação reprodutiva (n=33 para machos, e n= 32 para fêmeas). Por conta das grandes diferenças entre os níveis de estradiol de fêmeas sub adultas e adultas, para o modelo de estradiol,

“Categoria Etária” também foi incluída como variável fixa. Nestes modelos, o ano de amostragem foi adicionado como efeito aleatório tendo em vista as variações no nível de precipitação ao longo dos anos.

Seleção dos modelos

Os modelos foram selecionados com base nos valores do Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc) e de peso do modelo (AICcw) (função *aictab*, pacote *AICcmodavg*, Mazerolle, 2016). O conjunto de modelos candidatos continha adicionalmente um modelo nulo, com apenas efeito(s) aleatório(s). Dentro de cada conjunto de modelos candidatos, o modelo de melhor ajuste foi considerado aquele com o valor mais baixo de AICc e valor mais alto de peso (Apêndice B). A fim de se verificar a homogeneidade de variância e possível violação da suposição de normalidade os resíduos dos modelos escolhidos foram analisados usando métodos gráficos (i.e.: *qqplots* de resíduos, com valores previstos vs. resíduos). Ao longo do texto, o número de amostras irá variar de acordo com o modelo representado, uma vez que nem todas as amostras foram utilizadas em todos os modelos. As figuras representam dados originais (pg/ml) e não os valores log-transformados. O nível de significância para os testes foi fixado em $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Testosterona

As concentrações da testosterona sérica nos machos sofreram influência da idade, status reprodutivo e época do ano em diferentes níveis (Tabela 1). Em relação à idade, indivíduos jovens apresentaram valores significativamente mais baixos deste hormônio ($P < 0,05$) em comparação às demais categorias etárias, ao passo que, apesar de não haver diferença significativa entre os valores de sub adultos e adultos ($P > 0,05$), os adultos apresentarem as mais altas concentrações pontuais de testosterona dentro de todo o conjunto de amostras (1903,20 pg/ml para adultos, 1399,80 pg/ml para sub adultos e 75,20 pg/ml para jovens) (Figura 2a). Ainda dentro do conjunto de dados de machos sub adultos, 16 meses foi considerada a idade mínima para um indivíduo apresentar concentrações de testosterona similares a de adultos dentro de estação reprodutiva.

Ademais, a marcante sazonalidade reprodutiva da espécie também se refletiu nos níveis de testosterona ($P < 0,05$), sendo que menores concentrações de testosterona ocorrem fora da estação reprodutiva e concentrações mais elevadas dentro de estação reprodutiva. Quando o conjunto original de amostras foi restringido a apenas amostras de animais adultos e sub adultos, este mesmo padrão de influência e significância se manteve ($P < 0,001$) (Figura 2b).

Tabela 1. Resultados dos modelos lineares mistos testando a influência das variáveis preditoras (categoria etária, status reprodutivo e período do ano) sobre os níveis de testosterona sérica (log-transformados) em lobos-guará machos.

Variável	Estimativa $\pm$ EP	<i>t</i>	<i>P</i>
Modelo Geral (peso do modelo: 0,67) (n= 55 amostras, 38 Id.)			
(Intercepto)	0.941 $\pm$ 0,066	14,123	<0,001
Categ. Etária (Jovem)	-0.235 $\pm$ 0,117	-2,005	0,045
(Sub Adulto)	0,190 $\pm$ 0,100	1,895	0.058
Status Reprod. (Fora de estação)	-0.128 $\pm$ 0,056	-2,288	0,022
Período do ano (Seca)	-0.150 $\pm$ 0,054	-2,754	0,005
Modelo restrito (peso do modelo: 0,65) (n= 33 amostras, 23 Id)			
(Intercepto)	0,762 $\pm$ 0,072	10,577	<0,001
Período do ano (Seca)	-0,201 $\pm$ 0,026	-7,687	<0,001

Por fim, o efeito da época do ano sobre a produção hormonal também se provou significativa, sendo que os níveis de testosterona estão positivamente relacionados com o índice de pluviosidade ($P < 0,05$) (Figura 2c e Figura 3). Por existir uma significativa diferença entre níveis hormonais de jovens e indivíduos maduros (sub adultos e adultos), além de uma clara sobreposição entre a estação reprodutiva e época do ano, um segundo modelo foi criado a fim de eliminar possíveis interferências destes fatores sobre os níveis hormonais (Tabela 1) e reassegurar a significância deste fator climático. Assim, quando apenas indivíduos maduros fora de estação reprodutiva foram avaliados, comprovou-se que há diferença significativa ($P < 0,001$) nas concentrações hormonais entre os períodos de seca (menores concentrações) e chuva (maiores concentrações).

Figura 2. Variação da concentração de testosterona sérica em lobos-guará machos de acordo com **a)** categoria etária, **b)** status reprodutivo (ENR= Estação Não-Reprodutiva e ER= Estação Reprodutiva) e **c)** época do ano.

Figura 3. Variação média anual das concentrações de testosterona e estradiol de lobos-guará de vida livre em relação ao índice pluviométrico médio da região do Parque Nacional da Serra da Canastra (Minas Gerais – Brasil). Em sombreado destaca-se a estação seca.

Estradiol

Apesar de a idade exercer influência sobre a produção de esteroides sexuais nas fêmeas, fato evidenciado pela diferença significativa ($P < 0,05$) encontrada entre os valores de fêmeas sub adultas e as demais categorias etárias, não houve diferença significativa entre animais jovens e adultos ($P > 0,05$) (Tabela 2, Figura 4a). Em contrapartida, levando-se em conta a amplitude de valores máximos, jovens e adultas se distanciaram consideravelmente, com adultas chegando a concentrações maiores que 3000 pg/ml, enquanto jovens não ultrapassam 145 pg/ml. Dentro do subconjunto de amostras de fêmeas sub adultas, concentrações estrogênicas sugestivas da atividade folicular (ou seja, similares às concentrações de adultas) foi observada em lobas a partir de um ano de idade, sendo a concentração máxima verificada 3232,50 pg/ml.

Em consonância com a testosterona, os níveis de estradiol também provaram sofrer efeito direto da estação reprodutiva tanto na avaliação de indivíduos de todas as idades ($P < 0,05$) quanto no conjunto de dados restrito aos animais maduros ($P < 0,05$) (Figura 3, Figura 4b). Por fim, a época do ano também interferiu sobre os níveis hormonais no mesmo padrão apresentado aos machos, tanto no modelo geral ($P < 0,001$) quando no modelo livre da influência de idade e status reprodutivo ($P < 0,05$) (Figura 3 e Figura 4c). De modo geral, a estação chuvosa foi caracterizada por maiores concentrações hormonais e, apesar de ser impossível determinar se existe um padrão crescente nas concentrações destes hormônios (o número de amostras coletadas entre novembro e janeiro é bem inferior aos outros meses), o início e fim da atividade reprodutiva parecem estar em sincronia com o início e término da estação chuvosa.

Tabela 2. Resultados dos modelos lineares mistos testando a influência das variáveis preditoras (categoria etária, status reprodutivo e período do ano) sobre os níveis de estradiol sérico (log-transformados) em lobos-guará fêmeas.

Variável	Estimativa $\pm$ EP	<i>t</i>	<i>P</i>
Modelo Geral (Peso do modelo:0,73) (n=52 amostras, 30 Id.)			
(Intercepto)	1,013 $\pm$ 0,052	19,379	< 0,001
Categ. Etária (Jovem)	-0,147 $\pm$ 0,123	-1,197	0,231
(Sub Adulto)	0,163 $\pm$ 0,062	2,624	0,008
Status Repr. (Fora de estação)	-0,129 $\pm$ 0,045	-2,838	0,004
Período do ano (Seca)	-0,163 $\pm$ 0,048	-3,379	< 0,001
Modelo Restrito (peso do modelo: 0,96) (n= 32 amostras, 22 Id.)			
(Intercepto)	0,775 $\pm$ 0,115	6,698	<0,001
Categ. Etária (Sub Adulto)	0,147 $\pm$ 0,036	4,029	<0,01
Período do ano (Seca)	-0,141 $\pm$ 0,046	-3,037	0,002

Figura 4. Variação da concentração de estradiol sérica em lobos-guará fêmeas de acordo com **a)** categoria etária, **b)** status reprodutivo (ENR= estação não reprodutiva, ER= Estação reprodutiva) e **c)** época do ano.

DISCUSSÃO

O uso de amostras de BRGs em estudos endócrinos

O uso de amostras provenientes de BRGs (e, portanto, coletadas para outros fins que não o da pesquisa em questão) apresenta uma série de limitações sobretudo em relação ao delineamento experimental e análises pretendidas. A utilização deste tipo de material para estudos endocrinológicos é especialmente interessante para pesquisas de caráter exploratório e amplo, ao passo que pesquisas mais específicas requerem estudos longitudinais com metodologia de amostragem seriada - situação onde o uso de amostragem não-invasiva (p.ex.: coleta de fezes) provavelmente é mais proveitoso. Contudo, o tipo de abordagem amostral adotada pelo nosso estudo também oferece uma série de vantagens que inclui a possibilidade de um número amostral incomumente grande para pesquisas envolvendo espécies ameaçadas, economia de custos de amostragem, e, é claro, o evitamento de novas capturas. Além disso, como o principal meio de transporte dos hormônios no corpo é o próprio o sangue, esta continua sendo a matriz mais informativa e amplamente utilizada no campo da endocrinologia reprodutiva, tendo vantagens em relação a outros substratos por requerer menor processamento e permitir acesso ao hormônio in natura (Kersey & Dehnhard, 2014; Brown, 2018). Ademais, este tipo de matriz não requer indexação das concentrações e oferece um retrato instantâneo do status hormonal do animal do momento da coleta (Brown, 2018).

Adicionalmente, é interessante que o processo de seleção de amostras do BRG seja bastante criterioso, tanto em relação ao volume disponível e condições de armazenamento da amostra, quanto no que concerne aos registros de origem da mesma (i.e.: número de identificação, local, data de coleta, indivíduo amostrado, sexo, idade, etc.): quanto maior o número de informações, mais confiável será a análise.

Puberdade e maturidade sexual

Dentro dos modelos construídos para explicar a variação de estrógenos e andrógenos em lobos-guará de vida livre, o efeito da idade foi considerado significativo e relevante em ambos os sexos. A variação destes hormônios durante os primeiros anos de vida é um dos principais indicadores do desenvolvimento reprodutivo, sendo fundamental para

caracterizá-lo (Asa, 2012). Genericamente, a puberdade pode ser definida como o conjunto de mudanças físicas através das quais o indivíduo atinge a maturidade, sendo capaz de reproduzir-se sexualmente (Gobello, 2014). Este é um processo gradual e quantitativo, composto por uma miríade de marcos físicos, comportamentais, seminais e endócrinos que culminam na maturação dos órgãos genitais e no desenvolvimento das características sexuais secundárias (Gobello, 2014; Lea & England, 2018). Do ponto de vista endocrinológico, durante a puberdade o centro tônico do hipotálamo se torna gradualmente menos sensível aos estrógenos, permitindo que quantidades cada vez maiores de GnRH sejam liberadas, o que acarreta no aumento da produção de gonadotrofinas. Tanto o LH quanto o FSH atuam na promoção da gametogênese e, conseqüentemente, na produção dos esteroides sexuais (Senger, 2005). Posto isso, em ambos os sexos a diferença das concentrações hormonais entre jovens e sub adultos foi evidente (Figuras 2a e 4a), de modo que se pode presumir que a puberdade nesta espécie ocorra em algum ponto entre o primeiro e o terceiro ano de vida. Apesar de não existirem até o momento dados precisos em relação à idade na maturidade sexual para o lobo-guará (sobretudo sob o ponto de vista endócrino), os nossos resultados parecem corroborar a maioria dos dados observacionais disponíveis a este respeito.

Em cativeiro, registros ao longo dos anos dão conta de que ambos os sexos podem se reproduzir a partir de um ano de idade, embora isso seja raro (Songsasen & Rodden, 2010; Holland et al. 2014). Neste cenário, geralmente a maturidade sexual é considerada a partir dos três anos de idade, e a idade média do primeiro parto, quatro anos (Songsasen et al. 2006). Já em vida livre, os dados são ainda mais escassos com apenas Cunha de Paula e Desbiez (2014) sugerindo a idade média do primeiro parto como dois anos. Com base nestes dados e considerando-se um período gestacional de aproximadamente 65 dias, pode-se especular que a maturidade sexual já tenha ocorrido aos 22 meses de idade. Como nossos dados sugerem (a idade mínima a apresentar concentrações relevantes de E2 foi 12 meses de idade), muito provavelmente o estabelecimento da atividade ovariana ocorre antes disso. É natural e comum a grande parte das fêmeas de mamíferos (incluindo os canídeos) que o primeiro estro seja “silencioso”. Isso ocorre por que o sistema nervoso central requer exposição prévia à

progesterona antes que ele se torne responsivo e o animal mostre sinais comportamentais cio (Lea & England, 2018).

Para machos, as informações acerca da primeira reprodução em populações *ex-situ* são praticamente inexistentes. A fim de se evitar endogamia assim como a maioria dos mamíferos, o sexo masculino é o principal dispersante nesta espécie. A dispersão geralmente ocorre antes da maturidade sexual (Bowler & Benton, 2005), então é provável que a puberdade ocorra em algum ponto próximo a este evento, ou seja, entre 15 e 22 meses, valores muito próximos ao encontrado em nossos resultados (16 meses). Reforça esta hipótese o relato feito por Songsasen e colaboradores (2014) de produção espermática, ainda que modesta, em um macho selvagem de dois anos de idade, o que reforça esta hipótese.

Outro ponto de interesse em relação aos nossos resultados foi a proximidade entre as concentrações médias de estradiol entre fêmeas jovens e adultas. Muito provavelmente, este foi um reflexo da distribuição das amostras dentro do subconjunto das adultas (n=41) onde o número de amostras fora da estação reprodutiva (n=27) foi quase o dobro do número de amostras dentro de estação (n=14). Em reprodutoras monóclicas e sazonais, como o lobo-guará, o período de anestro (ou quiescência ovariana) característico da estação não-reprodutiva, em muito se assemelha ao estado pré-púbere: em ambos os casos, a baixa frequência na secreção de LH impede que haja estímulo suficiente para desencadear aumento da produção de estrógenos (Lea & England, 2018), assim, é esperado que jovens e adultos fora de estação reprodutiva (que representam dois terços do nosso subconjunto de amostras) apresentem concentrações similares de estradiol. Em contrapartida, em questão de amplitude de valores máximos, a diferença entre a capacidade gonadal destes dois grupos etários foi bem evidenciada. Ademais, no que diz respeito à discrepância das concentrações de estradiol entre sub adultas e as demais categorias, prevalência das altas concentrações nas sub adultas, pode ser fruto da inconstância da produção de esteroides sexuais resultante de um processo de maturidade ainda em progresso (Wildt et al. 1981).

Influência de fatores ambientais sobre a função reprodutiva

Nossos resultados corroboram a longa lista de autores que classificam o lobo-guará como uma espécie de marcada sazonalidade reprodutiva, em virtude da prevalência de altas concentrações de esteroides sexuais durante os meses de outono (março a junho) (Dietz, 1984; Velloso et al.1998; Maia & Gouveia, 2002; Rodden et al 2004; Maia et al.2008; Comizzoli et al.2009). Contudo, nossas análises também registraram um inesperado segundo padrão de alta hormonal (sincrônico e comum a ambos os sexos) durante a primavera (Figura 3). Tomando-se por base o perfil das fêmeas, apesar de comprovar existência de atividade folicular em setembro-outubro, é impossível determinar se o pico observado nesta época do ano seria resultante de uma onda folicular anovulatória ou não – o que *per se* poderia indicar tanto um adiantamento da atividade reprodutiva (i.e.: flexibilização da estação) quanto uma possível ocorrência de um segundo estro durante o ano.

Apesar de, ao nosso conhecimento, não existirem estudos abordando especificamente a observação de picos de testosterona e estradiol ao final do ano, evidências de um suposto “adiantamento” na atividade reprodutiva já haviam sido relatadas anteriormente em populações de vida livre. Dietz (1984) e Emmons et al. (2012) observaram cópulas em populações selvagens tão precocemente quanto novembro, ao passo que Vynne (2010) relatou uma elevação de progestinas fecais indicativa da ocorrência de ovulação durante mês de dezembro. Nos três casos, subsequentemente às primeiras observações, os autores narraram nascimentos em janeiro e março. Levando em conta o período gestacional médio da espécie (~65 dias), estes nascimentos comprovariam a ocorrência de estro, ovulação e cópula férteis ao final do ano, o que enfraqueceria a hipótese da onda folicular anovulatória. É passível de discussão, no entanto, que tipo de fator(es) desencadearia(m) a ativação do eixo reprodutivo tão prematuramente.

A teoria mais aceita para explicar a sazonalidade reprodutiva afirma que a seleção natural favorece adaptações que priorizem a ocorrência da reprodução em harmonia com as condições ambientais sazonais (Baker, 1938; Bronson & Heideman, 1994). Em outras palavras, em termos de sobrevivência, é vantajoso para uma espécie que os nascimentos ocorram em condições de temperatura e de disponibilidade de recursos que garantam a sobrevivência imediata dos neonatos e supram as altas demandas metabólicas de

lactação da mãe e, posteriormente, de crescimento da prole (Millar, 1977). Esta interação entre fisiologia e variáveis ambientais resultou em estratégias de reprodução espécie-específicas (Bronson e Heideman, 1994) que, em muitos casos, respondem de maneira plástica a cada modelo ambiental ocorrente dentro da amplitude de distribuição da espécie (Southwood 1977; Partridge e Harvey 1988). De fato, para os carnívoros, a latitude em que a espécie ocorre foi recentemente considerada o principal modulador da atividade reprodutiva (Heldsteb et al. 2018). Este determinante inclui diferentes fatores que atuam conjuntamente como preditores e/ou indicadores das condições ambientais, entre eles o fotoperíodo, a temperatura e o regime sazonal de chuvas.

A importância do fotoperiodismo sobre regulação da reprodução do lobo-guará já foi comprovada por meio de observação de uma diferença de seis meses entre o estabelecimento de estações reprodutivas de indivíduos vivendo no hemisfério norte e no hemisfério sul (Ewer, 1973, Velloso et al.1998), porém pouco foi discutido acerca da influência de outras variáveis sobre a reprodução. Apesar de não sofrer com variações muito amplas na temperatura média local, nossa área de estudo, o PNSC, é conhecida pela marcante sazonalidade no regime de chuvas que, por sua vez, regem o ciclo de presas local (Asa & Valdespino, 1998, MMA-IBAMA, 2005). A ampla variação de recursos alimentares decorrente desta configuração climática tem impacto direto sobre a história de vida do lobo-guará, que ajusta sua dieta em função destas condições: durante o período de seca há um maior consumo de pequenos mamíferos, ao passo que na estação chuvosa prevalece o consumo de uma miscelânea de frutos e artrópodes (Queirolo & Motta-Junior, 2007).

Uma vez que a disponibilidade de recursos está intimamente relacionada com o *timing* reprodutivo, era de se esperar que nossas análises demonstrassem a influência da chuva sobre a reprodução o que, de fato, ocorreu: independentemente da estação reprodutiva ser levada em consideração (modelo geral - amostras do ano todo) ou não (modelo restrito - amostras de estação não-reprodutiva), as concentrações séricas de testosterona e estradiol foram maiores durante a estação chuvosa. Não por acaso, a estação seca coincide com o pico da temporada de nascimentos para o lobo-guará (junho e julho, podendo de estender até setembro ou outubro) (Dietz, 1984; Vynne, 2010; Emmons et

al., 2012). Assim, a baixa nas concentrações de estrógenos encontradas nas fêmeas nesta estação provavelmente é consequência fisiológica do diestro (independente da ocorrência fecundação ou não) (Songsasen et al., 2006), ao passo que, nos machos, a queda hormonal pode estar vinculada à expressão do cuidado parental (de Bruin et al. 2016).

Em tempo, considerando-se a alta demanda energética vinculada à lactação e ao crescimento da prole (Millar, 1977), a concentração de nascimentos durante uma época de escassez de recursos parece, à primeira vista, contraproducente à sobrevivência da espécie. É possível, no entanto, que esta conformação tenha um papel importante na sobrevivência do filhote pós-desmame (Emmons, 2012). O processo de desmame do lobo-guará inicia-se ainda no primeiro mês de vida. Com sete semanas, os filhotes passam a acompanhar o forrageamento da mãe e o desmame completo ocorre por volta de 15 semanas de vida. Durante todo esse período e até os sete meses de idade, os filhotes também recebem alimentação sólida (via regurgitação) de ambos os pais (Rodden et al. 2004). Assim, os nascimentos durante a seca, beneficiariam a sobrevivência do filhote ao permitirem um desmame (três meses) no início da estação chuvosa (outubro), época de maior disponibilidade de recursos. Ainda nestas circunstâncias, o início do forrageamento solo (sete meses), coincidiria com o auge da estação chuvosa (janeiro a março). Não surpreendentemente, é precisamente nesta mesma época que o principal fruto consumido por eles, a *Solanum lycoparpum*, atinge o pico de produção (Jácomo et al. 2004). Assim, é provável que a estratégia reprodutiva escolhida pela espécie priorize a sobrevivência do filhote em detrimento da mãe (Emmons et al. 2012). Contudo, para o lobo-guará, esta condição pode ser mitigada tanto pelos hábitos alimentares de cunho oportunista e generalista, quanto pela atuação do macho como provedor adicional de alimento tanto para a mãe quanto para os filhotes durante a lactação (Bestelmeyer, 2000; Melo et al. 2007).

Em vista dos resultados obtidos, é possível especular que, em vida livre, a estação reprodutiva do lobo-guará seja mais flexível do que o observado em cativeiro, posto que estes animais estão expostos uma maior pressão ambiental por parte do regime de chuvas (e, conseqüentemente, da variação da disponibilidade de alimentos). Dentro

desta premissa, propomos que o fotoperíodo possa atuar como o indicador ambiental final ou definitivo, ao passo que a chuva (ou o início dela) atuaria mais como um preditor de ajuste fino, indicando tanto o início da época favorável à reprodução quanto o final dela (Delani, 1982, Bradshaw & Holzapfel, 2007). Neste contexto, a observação de dois momentos de suposta atividade reprodutiva poderia tanto representar uma diluição temporal no estabelecimento de estro ao longo de um período reprodutivo mais alongado, quanto implicar a ocorrência de dois estros (ou ciclos) em uma mesma estação – o que vai de encontro à monoestria descrita na espécie até então (Songsasen et al. 2006).

Adicionalmente, nascimentos resultantes de acasalamentos no fim do ano ocorreriam durante o pico de chuvas (Janeiro-Fevereiro), o desmame ocorreria no fim da estação chuvosa, ao passo que filhotes intensificariam comportamento de forrageamento durante a seca. Nenhum desses parâmetros parece vantajoso em termos de sobrevivência pós-desmame, o que nos leva a questionar, em que condições a ocorrência de estro “precoce”, ou ainda, um possível segundo estro beneficiaria o sucesso reprodutivo da espécie. Para tentarmos responder essa pergunta, é preciso que se leve em conta uma das características reprodutivas mais marcantes do lobo-guará: a ocorrência de ovulação induzida.

O papel da ovulação induzida no timing reprodutivo

Ainda que relativamente comum dentro da ordem *Carnivora*, a ocorrência de ovulação induzida em canídeos é considerada rara: antes de Johnson e colaboradores (2014) a terem descrito no lobo-guará, esta condição só havia sido relatada em um único canídeo, a Raposa-das-ilhas (*Urocyon littoralis*, Asa et al. 2007).

Apesar de existirem diferentes pressões atuando na evolução da ovulação induzida nos carnívoros, dentro deste grupo a condição é mais frequentemente relatada em espécies que apresentam áreas de vida amplas, hábitos solitários e habitat sazonal, características comuns ao lobo-guará. Nestas circunstâncias, a ovulação induzida é conveniente, posto que a chance de cópula e sucesso reprodutivo não fica limitada a curta janela de tempo de uma ovulação espontânea (Larivière & Ferguson, 2003). Sabendo que em cativeiro fêmeas de lobo-guará separadas durante a estação reprodutiva podem apresentar um cio tardio quando reunidas aos seus parceiros (Songsasen et al. 2014), uma das possíveis

explicações para um segundo padrão de alta hormonal seria simplesmente a falta de oportunidade de acasalamento prévio durante a estação reprodutiva passada. Dentro de uma premissa similar, Emmons (2012) sugere que o alto risco de morte de animais jovens (que em fêmeas de até dois anos pode chegar a 60%) poderia também ser um fator promotor da reprodução sazonal prematura em fêmeas nulíparas.

Adicionalmente, considerando o efeito da latitude, há indícios de que ovuladores induzidos apresentem uma temporada de nascimentos mais ampla do que espécies com ovulação espontânea. Uma das possíveis explicações para este fato, seria que a ocorrência de ovulação induzida sem necessidade de fixar um período para o estro, permite que fêmeas que tenham passado por perda precoce de ninhada, acasalem e concebam novamente em um curto intervalo de tempo (Sanderson & Nalbandov, 1973). Esta parece ser mais uma explicação razoável para o retorno antecipado da atividade reprodutiva (Heldstab et al. 2018), o que implicaria a ocorrência de dois estros em um mesmo ano.

Ainda que entre os canídeos sul-americanos o relato de poliestria seja comum (por ex. *Speothus veneticus*, DeMatteo et al. 2007; e *Cerdocyon thous*, Monteiro et al. 2002), não existem, até o presente momento, evidências concretas de que uma mesma lobo-guará fêmea possa reproduzir com sucesso duas vezes ao ano. Embora o uso de amostras pontuais não nos permita muito mais do que especulações, vale mencionar que duas das fêmeas analisadas apresentaram concentrações elevadas de estradiol tanto em março quanto em setembro/outubro. O mesmo aconteceu com um dos machos amostrados, em maio e outubro. Em dois destes casos (um macho e uma fêmea), as amostras foram coletadas no mesmo ano.

CONCLUSÃO

Este é, ao nosso conhecimento, um estudo inédito em muitos aspectos. Em primeiro lugar, a utilização de amostras de sangue provenientes de um BRG para o desenvolvimento de estudos reprodutivos comprovou a validade destes bancos como fonte de material para estudos como o nosso. A análise de estrógenos e andrógenos séricos provou-se uma maneira eficiente de caracterizar etapas do desenvolvimento e função reprodutiva em lobos-guará em seu habitat natural. Nossos resultados

corroboraram dados observacionais de cativeiro e vida livre ao indicarem o início da atividade gonadal entre um e três anos de idade. As idades mínimas a apresentarem concentrações hormonais expressivas foram de 12 meses para fêmeas e de 16 meses para machos.

Nesta mesma linha, este é apenas o segundo estudo baseado em análises hormonais a investigar a sazonalidade reprodutiva de lobos-guaras de vida livre, e o único a incluir a correlação dos níveis hormonais com o regime de chuvas característico do habitat natural da espécie. Nossos resultados indicam que, em condições naturais, há uma maior flexibilidade na duração da estação reprodutiva em virtude da influência dos níveis de precipitação. Este alongamento da estação é representado pela existência de não apenas um, mas dois momentos de suposta atividade reprodutiva ao longo do ano. Embora não possamos afirmar se cada um destes momentos representa a ocorrência de um estro (poliestria) ou se fêmeas diferentes podem apresentar estro em momentos diferentes ao longo desta estação estendida, a conformação encontrada é indicativa de que o fotoperíodo, apesar de ser pivotal, não é o único fator importante para o estabelecimento reprodução na espécie.

Apesar de lançar luz sobre novos aspectos da biologia reprodutiva natural do lobo-guará, atestando o potencial do uso de amostras coletadas oportunisticamente em pesquisas de campo e armazenadas em BRGs no desenvolvimento de pesquisas de base, nossa pesquisa gerou mais perguntas do que as respondeu. Estudos futuros devem priorizar um maior entendimento dos fatores que governam tanto o estabelecimento quanto a ciclicidade dos eventos reprodutivos da espécie, através de análises longitudinais *in situ* e *ex-situ*. É de particular interesse entender, até que ponto as condições ambientais locais influenciam os padrões da reprodução, posto que isso pode culminar em uma nova óptica de manejo e de avaliação de viabilidade populacional.

FINANCIAMENTO

Este estudo e faz parte de Tese submetida à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) como parte dos requisitos para

obtenção do título de Doutor em Reprodução Animal e foi apoiado financeiramente pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Processo 88882.276411/2019-01) e pela Fundação Fulbright através de bolsa de auxílio e bolsa de doutorado sanduiche, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à G. Sobral pelas contribuições na revisão do rascunho original e à Dr.M. Brown e ao Endocrinology Research Laboratory do Smithsonian Conservation Biology Institute, pela orientação, acompanhamento e disponibilização de equipamentos e reagentes para realização das dosagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.
- ASA, C.S. Reproductive biology and endocrine studies. In: BOITANI, L.; POWELL, R.A. **Carnivore Ecology and Conservation**. Oxford: Oxford University Press, 2012. cap.12. p.273-93.
- ASA, C.S. et al. Evidence for induced estrus or ovulation in a canid, the island fox (*Urocyon littoralis*). **Journal of Mammalogy**, v.88, p. 436–440, 2007.
- ASA, C.S.; VALDESPINO, C. Canid reproductive biology: an integration of proximate mechanisms and ultimate causes. **American Zoologist**, v. 38, p.251–259, 1998.
- BAKER, J.R. The evolution of the breeding season. In: BEER, G.R. **Evolution: Essays on Aspects of Evolutionary Biology**. Oxford: Oxford University Press, 1938. p. 161–177.
- BESTELMEYER, S. V. **Solitary, Reproductive, and Parental Behavior of Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*)**. 2000. Dissertação de doutorado. Colorado State University, Fort Collins, USA.2000.
- BOWLER, D.E.; BENTON, T.G. Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behavior to spatial dynamics. **Biological Reviews**, Cambridge, v.80, p. 205–225, 2005.

- BRADSHAW, W.E.; HOLZAPFEL, M.C. Evolution of Animal Photoperiodism. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.38, p.1-25, 2007.
- BRONSON, F.H.; HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. Vol. 2, p. 541–583.
- BROWN, J.L. Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals. **Theriogenology**, v.109, p.2-13, 2018.
- COMIZZOLI, P. et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, Supl. 2, p. 47–52, 2009.
- CUNHA DE PAULA, R.; DESBIEZ, A.L.J. Maned Wolf Population Viability. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014. cap.2. p.15-34.
- CUNHA DE PAULA, R.; RODRIGUES, F.H.G.; BIZERRIL, M.X. et al. The Maned Wolf Conservation Project: Serra da Canastra, Minas Gerais, Brazil. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014. cap.13. p.177-192.
- DE BRUIN, R.; GANSWINDT, A.; LE ROUX, A. From killer to carer: steroid hormones and paternal behavior. **African Zoology**, v.51(4), p.173-82, 2016.
- DEHNHARD, M.; NAIDENKO, S.; FRANK, A.; et al. Non-invasive monitoring of hormones: a tool to improve reproduction in captive breeding of the Eurasian Lynx. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43(2), p.74-82, 2008.
- DELANY, M.J. Reproduction and life histories. In: DELANY, M.J. **Mammal Ecology**. New York: Springer Science + Business Média, 1982, cap.3, p.20-34.
- DEMATTEO, K. E.; PORTON, I.J.; KLEIMAN, D.G.; et al. The Effect of the Male Bush Dog (*Speothos venaticus*) on the female reproductive cycle. **Journal of Mammalogy**, v.87, p.723–732, 2006.
- DIETZ J.M. *Chrysocyon brachyurus*. **Mammalian Species**, v.234, p.1–4, 1985.
- DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contribution to Zoology**, Washington DC, v.392, p. 1–51, 1984.
- EMMONS, L.H. et al. Social interactions and reproduction. In: EMMONS, L.H. **The Maned Wolves of Noel Kempf Mercado National Park**. Washington DC: Smithsonian Institute Scholarly Press, 2012. p. 57–75.

- EWER, R. F. **The Carnivores**. Ithaca: Cornell University Press, 1973.500 p.
 - FOLEY, J.A. et al. Global consequences of land use. **Science**, v.309, p.570–74, 2005.
 - GOBELLO, C. Prepubertal and Pubertal Canine Reproductive Studies: Conflicting Aspects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.70-73, 2014.
 - HELDSTAB, S.A.; MÜLLER, D.W.H.; GRABER, S.M.; et al. Geographical Origin, Delayed Implantation, and Induced Ovulation Explain Reproductive Seasonality in the Carnivora. **Journal of Biological Rhythms**, v.33 (4), p.402-419, 2018.
 - HOLT, W.V.; BENNET, P.M.; VOLUBOUEV, V. Genetic resource banks in wildlife conservation. **Journal of Zoology**, v.238, p.531-544, 1996.
 - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Lista de espécies terrestres e mamíferos aquáticos ameaçados** - Portaria MMA nº444, de 17 de dezembro de 2014. 13 p., 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/faunabrasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2017.
 - IUCN. **IUCN Red List categories and criteria, version 3.1, second edition**. Disponível em: <http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/RL-2001-001-2nd.pdf>. Acesso em: 12 dez.2019,
 - JACOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Niche separation between the maned-wolf *Chrysocyon brachyurus*, the crab-eating fox *Dusicyon thous* and the hoary fox *Dusicyon vetulus* in central Brazil. **Journal of Zoology**, v.262, p.99-106, 2004.
 - JOHNSON, A.E.M. et al. Induction of ovarian activity and ovulation in an induced ovulator, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), using GnRH agonist and recombinant LH. **Theriogenology**, Milan, v.82, p. 71–79, 2014.
 - KERSEY, D.C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, v.203, p.296–306, 2014.
 - KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p.707–713. 2005.
- LABRADA-MARTAGÓN, V.; ZENTENO-SAVÍN, T.; MANGEL, M. Linking physiological approaches to marine vertebrate conservation: using sex steroid hormone determinations in demographic assessments. **Conservation Physiology**, v.2, p.1-18,2014.

- LARIVIÈRE, S.; FERGUSON, S.H. Evolution of Induced Ovulation in North American Carnivores. **Journal of Mammalogy**, v.84, n.3, p. 937–947, 2003.
- LEA, R.; ENGLAND, C.W. Puberty and Seasonality. In: NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. USA: Saunders. cap.3, p.54-62.
- LEON-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; et al. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science**, v.112; p.357-361, 2009.
- MAIA, O.B.; GOUVEIA, A.M.G. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.62, p.25–32, 2002.
- MAIA, O.B. et al. Comparison of serum hormone levels of captive and free-living maned wolves *Chrysocyon brachyurus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v.41, p.176-179, 2008.
- MAZEROLLE, M. J. **AICcmodavg**: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). R package version 2.0-4, 2016. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=AICcmodavg>
- MELO, L.F.B. et al. Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815): As revealed by GPS tracking collars. **Journal of Zoology**, Massachusetts, v.271, p.27–36, 2007.
- MILLAR, J.S. Adaptive features of mammalian reproduction. **Evolution**, v.31, p.370–386, 1977.
- MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE – IBAMA. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra da Canastra**. 222 p., 2005.
- MONTEIRO, R.V.; SANTOS, M.R.C; VIANNA, C.B. et al. Serial clinical, colposcopic and endocrinological evaluations of *Cerdocyon thous* bitches from the Rio de Janeiro zoo. **Brazilian. J. Vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 93-96, 2002.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p.853–858, 2000.
- PAULA, R.C.; DEMATTEO, K. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). **The IUCN Red List of Threatened Species** 2015: e.T4819A88135664. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>. Acesso em: 7 ago. 2016.

- PARTRIDGE, L.; HARVEY, P.H. The ecological context of life history evolution. **Science**, v.241, p.1449–55, 1988.
- QUEIROLO, D.; MOTTA-JUNIOR, J.C. Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. **Acta Theriologica**, v.52 (4), p.391–402, 2007.
- RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D.W. **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs**. Cambridge: IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge 2004. cap.3, p.38–43.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. Boston: RStudio Inc. 2018. Disponível em: URL <http://www.rstudio.com/>.
- SANDERSON, G.C.; NALBANDOV, A.V. The reproductive cycle of the raccoon in Illinois. **Illinois Natural History Survey Bulletin**, v.31(2), p.29–85, 1973.
- SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd Revised. Pullman, WA: Current Conceptions, Inc., 2005, 381p.
- SONGSASEN, N. et al. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Theriogenology**, Milan, v.66, p.1743–1750, 2006.
- SONGSASEN, N. et al. Reproduction and Factors Affecting Reproductive Success in the Maned Wolf. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014. cap.8. p.99-108
- SONGSASEN, N.; RODDEN, M. The role of the Species Survival Plan in Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* conservation. **International Zoo Yearbook**, London, v. 44, n.1, p.136-148, 2010.
- SOUTHWOOD, T.R.E. Habitat, the templet for ecological strategies? **Journal of Animal Ecology**, v.46, p.336– 65, 1977.
- SPERCOSKI, K.M.; MOARAI, R.N.; MORATO, R.; et al. Adrenal activity in maned wolves is higher on farmlands and park boundaries than within protected areas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 179(2), p.232-40, 2012.
- VELLOSO, A. L. et al. Longitudinal Fecal Steroid Excretion in Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and Comparative Endocrinology**, v.112. p. 96–107, 1998.
- VYNNE, C. **Landscape use by wide-ranging mammals of the cerrado**. 2010, 144 p. PhD Thesis, University of Washington, Seattle, 2010.

- WILDT, D.E.; RALL, W.F.; CRITSER, J.K.; et al. Genome resource banks. **Bioscience**, v.47, p.689–698,1997.
- WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J.; CHAKRABORTY, P.K. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. **Journal of Animal Science**, v.53(1), p. 182–191, 1981.
- WINGFIELD, J. C.; FARNER, D. S. Endocrinology of reproduction in wild species. **Avian Biology**, v. 9, p. 163-327, 1993.
- WINGFIELD, J.C.; HUNT, K.; CREAGH, B.; et al. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: CLEMMONS, J.R.; BUCHHOLZ, R. **Behavioral Approaches to Conservation in Wild**. London: Campridge University Press, 1997. p.95-131.

APÊNDICE A. Correlação dos postos pluviométricos utilizados para aquisição de dados meteorológicos da região do Parque Nacional de Serra da Canastra (Fonte: Agência Nacional de Águas, Sistema Nacional de Recursos Hídricos).

Código	Nome	Município	Latitude	Longitude	Série histórica	Anos
2046025	Fazenda Sabura	São Roque de Minas	-20:8:51	-46:17:5	1988-2018	30
2046009	Delfinópolis	Delfinópolis	-20:20:52	-46:50:45	1995-2018	23
2046013	Vargem Bonita	Vargem Bonita	-20:19:48	-46:21:58	1988-2018	30
1946011	Tapira	Tapira	-19:55:37	-46:49:31	1988-2018	30
2046001	Itaú de Minas	Itaú de Minas	-20:44:21	-46:44:7	1988-2005	17
2045012	Piuhim-I	Piuhim	-20:27:43	-45:56:42	1988-2018	30
2046027	UHE Furnas	Alpinópolis	-20:40:33	-46:19:23	1990-2010	20
Fonte: Agência Nacional de Águas, Sistema Nacional de Recursos Hídricos						

APÊNDICE B. Comparação de modelos de variação de estradiol e testosterona em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de vida livre, com todos os modelos candidatos (AICc < 2,0) e modelo nulo.

	Estradiol					Testosterona				
	AICc	Δ AICc	LL	k	Peso	AICc	Δ AICc	LL	k	Peso
Idade										
Categ. Etária + Época + Status	66,74	0,00	- 25,10	7	0,73	81,83	0,00	-32,72	7	0,67
Modelo nulo (intercepto)	76,71	9,97	- 35,10	3	0,01	91,99	10,16	-42,76	3	0,00
Status Reprodutivo										
Categ. Etária + Época + Status	64,46	0,00	-25,23	6	0,72	78,96	0,00	-32,48	6	0,37
Status + Época	-	-	-	-	-	79,52	0,56	-34,06	5	0,28
Categ. Etária + Época	-	-	-	-	-	80,62	1,66	-34,61	5	0,16
Modelo nulo (intercepto)	74,50	10,05	-33,99	3	0,00	84,93	5,97	-39,20	3	0,02
Período do ano										
Categ. Etária + Chuva. Seca	- 6,55	0,00	10,96	6	0,96	5,87	1,23	4,68	6	0,35
Seca.Chuva	-	-	-	-	-	4,64	0,00	3,79	5	0,65
Modelo nulo (intercepto)	5,60	12,15	1,94	4	0,00	29,60	26,62	-10,09	4	0,00

CAPÍTULO III.

Uso do hormônio Anti-Mülleriano como marcador da função ovariana em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de vida livre

Gabriela Siqueira Martins^{1*}, Puja Basu², Nucharin Songsasen³, Claudio Alvarenga de Oliveira¹

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Veterinary Medical Center, College of Veterinary Medicine, Michigan State University, MI, USA.

³Center of Species Survival, Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, VA, USA.

* Autor para correspondência: gabi.smartins@outlook.com

RESUMO

Nas últimas décadas, o uso do hormônio anti-Mülleriano (HAM) como um importante biomarcador da função ovariana tem sido bastante relevante não apenas como ferramenta de diagnóstico, bem como para o aprimoramento de técnicas de reprodução assistida em animais de produção e, mais recentemente, em animais de companhia. Poucos são os trabalhos, no entanto, abordando a mensuração deste hormônio em espécies selvagens. O objetivo deste estudo foi determinar as concentrações de HAM em amostras sangue de lobos-guará de vida livre e sua relação com a idade, maturidade sexual e sazonalidade. No total 29 amostras de soro de fêmeas com idade entre 4 meses e 10 anos foram analisadas. Os níveis de HAM encontrados em nossa pesquisa aproximam-se daqueles relatados em cadelas. Encontramos diferença significativa ($p=0,04$) entre as concentrações séricas de fêmeas imaturas ($0,299 \pm 0,150$ ng/ml) e maduras ($1,142 \pm 0,301$ ng/ml). Diferentemente de outros mamíferos, não foi constatada queda nos níveis de HAM à medida que a idade das fêmeas avançou. Nas fêmeas maduras, diferenças sazonais ($p<0,05$) nas concentrações de HAM foram identificadas,

com fêmeas dentro de estação reprodutiva ($1,718 \pm 0,650$ ng/ml) apresentando concentrações mais elevadas do que aquelas fora de estação reprodutiva ($0,772 \pm 0,243$ ng/ml). Este foi o primeiro estudo a caracterizar concentrações de HAM em um canídeo selvagem. Nossos resultados enriquecem o escarço conhecimento acerca da fisiologia reprodutiva do lobo-guará e representam um importante primeiro passo para otimização de técnicas de reprodução assistida e de monitoramento de fertilidade em programas visando a conservação desta espécie ameaçada.

Palavras-chave: lobo-guará; hormônio Anti-Mülleriano; puberdade; função ovariana.

INTRODUÇÃO

O hormônio anti-Mülleriano (HAM), também conhecido como substância inibidora de Müller, é uma glicoproteína pertencente à superfamília de fatores de crescimento transformantes TGF- β , cuja expressão está restrita às gônadas de mamíferos eutérios (Cate et al. 1986; Teixeira et al. 2001; Visser et al. 2006). Originalmente caracterizada em células de Sertoli embrionárias durante o processo de diferenciação sexual masculino, este hormônio é conhecido pela sua atuação supressória sobre o desenvolvimento dos ductos de Müller, responsáveis pela formação dos ovidutos, útero e terço superior da vagina (Jost, 1947; Josso et al. 1993). Nas fêmeas, a expressão de HAM é uma descoberta relativamente recente e está atribuída às células da granulosa dos folículos ovarianos em crescimento (Vigier et al. 1984). Sua ação leva à inibição do recrutamento de folículos primordiais (evitando assim a exaustão prematura da reserva folicular) (Durlinger et al. 1999) e modulação do crescimento folicular por meio da diminuição da resposta ao FSH em folículos preantrais e antrais pequenos (Durlinger et al. 2001; Campbell et al. 2012). Nos ovários, a produção de HAM inicia-se assim que folículos em estágio primordial são recrutados (McGee & Hsueh, 2000) e atinge potencial máximo durante os estágios preantral e antral pequeno. À medida que a foliculogênese avança em direção à ovulação e o crescimento folicular passa a ser dependente de gonadotrofinas (e.g. FSH), a produção de HAM decai, estando completamente ausente

em folículos pre-ovulatórios, atresícos e no corpo lúteo (Durlinger et al.2002; Mossa et al.2017).

Tendo a maior parte de sua produção imputada aos folículos saudáveis em crescimento, as concentrações de HAM acabam refletindo indiretamente o número destes folículos no ovário e, conseqüentemente, o número de folículos primordiais existentes no *pool* folicular (Fanchin et al.2003; La Marca & Volpe 2006). A variação na produção de HAM ao longo da vida da fêmea é um tópico amplamente explorado na literatura, sendo a queda gradual nos níveis circulantes deste hormônio considerado o biomarcador que melhor reflete o declínio da capacidade reprodutiva decorrente do esgotamento da reserva ovariana (i.e.: senescência reprodutiva) (Lee et al.1996; de Vet et al.2002; Visser et al., 2006; Steiner et al. 2011; Hollinshead et al.2017). Em outras palavras, o HAM funciona como um excepcional marcador da reserva ovariana ao longo da vida reprodutiva da fêmea e, por conseguinte, indicador direto da função gonadal, potencial reprodutivo e do envelhecimento ovariano (de Vet et al.2002; La Marca e Volpe, 2006; Visser et al.2006).

Este conhecimento expandiu a importância e aplicação deste hormônio em estudos visando aspectos como a avaliação da fertilidade (Rico et al.2009; Lahoz et al.2012), monitoramento da função ovariana (Visser et al.2006; Nagashima et al.2017), diagnóstico de patologias ovarianas (Grynnerup et al. 2012; Tar et al. 2014; Dewailly et al. 2014) e aprimoramento de técnicas de reprodução assistida (Visser et al.2006; Takahashi et al.2008), tanto em humanos quanto animais domésticos. Todavia, o uso do HAM na avaliação ou caracterização de qualquer métrica reprodutiva deve levar em conta que as concentrações circulantes deste hormônio podem ser influenciadas por aspectos como a idade (de Vet et al.2002; Grynnerup et al. 2011), a sazonalidade (Claes et al.2013; Montano et al. 2017), ou ainda, apresentar ampla variação individual dentro de uma mesma espécie (Nagashima et al. 2017).

Aqui apresentamos o primeiro estudo de HAM em um canídeo selvagem, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Único representante do seu gênero, o lobo-guará é endêmico da América do Sul, onde habita as regiões do cerrado, chaco e pampas: áreas de descampados e matagais extremamente visadas na monocultura intensiva de grãos e na

pecuária extensiva (Queirolo et al. 2011). Assim, não é surpreendente que a lobo-guará encontre-se atualmente sob risco de extinção, sendo classificado como quase ameaçado internacionalmente (IUCN,2018) e como vulnerável no Brasil (ICMBio, 2014), país que abriga cerca de 90% de sua população natural. Além da perda de habitat, agravam a condição de risco desta espécie a alta incidência de mortes por atropelamentos, caça e doenças transmitidas por animais domésticos (Rodden et al. 2004). Em cativeiro, os programas de conservação existentes têm que lidar com baixos índices de concepção e as altas taxas de mortalidade de filhotes de modo que, a despeito de seus esforços, continuam a depender do influxo de animais provenientes da natureza (Vanstreels & Pessutti, 2010; Songsasen & Rodden, 2010). Múltiplas variáveis contribuem para o escasso sucesso reprodutivo, sejam elas ocasionadas por condições inadequadas de manejo ou inerentes aos próprios padrões reprodutivos da espécie. O pareamento de casais, por exemplo, é dificultado em virtude do maior grau de seletividade atribuído a seu sistema de reprodução monogâmico. Já a aplicação de técnicas de reprodução assistida esbarra em aspectos reprodutivos como a sazonalidade, a monoestria e a (recém-descoberta) ocorrência ovulação induzida (Dietz, 1984; Spercoski, 2007; Cunha de Paula et al., 2014; Johnson et al., 2014).

Em última instância, a maior parte das dificuldades encontradas no manejo reprodutivo de populações cativas de lobo-guará é fruto da falta de uma melhor caracterização de sua biologia reprodutiva. Neste contexto, a avaliação de aspectos como maturidade sexual, fertilidade e status reprodutivo são consideradas essenciais na elaboração de orientações específicas para a reprodução (Lasley et al.1991), além de serem vitais para estudos de crescimento e de viabilidade de populações *in-situ* (Graham et al. 2004; Comizolli et al.2009). Assim, avaliação de HAM nesta espécie oferece a oportunidade de acessar todos estes aspectos, gerando informações que futuramente serão úteis para o aprimoramento de políticas de manejo adequadas para populações *ex-situ* e *in-situ*. É com base nesta premissa, que os objetivos desta pesquisa foram caracterizar as concentrações séricas de HAM em fêmeas de lobos-guará levando em consideração a influência da idade, maturidade sexual presumida e sazonalidade, bem como sua relação com as concentrações séricas de estradiol.

MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA nº 1289140318).

Animais e amostras

Para as análises conduzidas na presente pesquisa foram utilizadas 29 amostras de soro de lobos-guará fêmeas cedidas pelo banco de recursos genéticos do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros (CENAP) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Todos os indivíduos avaliados eram provenientes natureza e tiveram idades estimadas entre 4 meses e 10 anos de idade, para os fins desta pesquisa consideraram-se imaturas fêmeas com idades menores ou iguais a um ano ($n=6$) e maduras aquelas com mais de um ano de idade ($n=23$). As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas oportunamente via venopunção durante estudos de campo com diferentes finalidades entres os anos de 2002 e 2013 realizados pelo próprio pessoal do CENAP e pesquisadores associados. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o início das análises.

Ensaio Imunoenzimático

Hormônio anti-Mulleriano (HAM)

A determinação dos valores de concentração de HAM para cada amostra de soro foi realizada usando o ensaio imunoenzimático não competitivo AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra foi dosada em duplicata e a concentração média das duas alíquotas foi calculada para maximizar a acurácia. As concentrações de HAM nas amostras foram calculadas com base na curva de calibração, cujos intervalos variaram entre 0,089 e 20,99 ng/ml. O coeficiente de variação entre amostras paralelas foi de $<19\%$ em todas as amostras (Apêndice A), e o limite de detecção do ensaio foi de 0,004 ng/ml. O ensaio foi validado fisiologicamente por meio da comparação entre as médias das concentrações séricas de fêmeas jovens (≤ 1 ano; $n=6$) e fêmeas adultas ($> 1 - 10$ anos, $n=23$).

Estradiol

As concentrações de estradiol foram avaliadas via ensaio imunoenzimático *in house* validado previamente por MARTINS et al. 2020 (Capítulo II). Foi utilizado o anticorpo policlonal R4972 (diluição 1:40.000) e enzima peroxidase (HRP, 1:110.000) fornecidos pela Dra. Coralie Munro (University of California, Davis, CA, EUA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 2,7% e 4,2% respectivamente.

Análises estatísticas

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o software R (versão 1.1.463). A concentração basal de HAM foi calculada de acordo com o sugerido por Brown e colaboradores (1999). Resumidamente, todas as concentrações de indivíduos maduros foram incluídas na análise a partir dos quais se procedeu a exclusão de valores que fossem maiores que a média mais duas vezes o desvio padrão (DP). A média era então recalculada e o mesmo processo de exclusão de valores se procedia, até que não existisse nenhum valor maior que média + 2 DP (HAM). A média das concentrações remanescentes foi então estabelecida como o valor basal deste hormônio para a espécie.

Os níveis séricos de HAM foram analisados em relação a quatro fatores: (1) maturidade sexual (i.e.: imaturas, ≤ 1 ano de idade; ou maduras, > 1 ano de idade); (2) sazonalidade (i.e.: estação reprodutiva: março e junho ou estação não reprodutiva: julho e fevereiro, apenas fêmeas adultas); (3) idade estimada (em meses); e (4) em relação à concentração de estradiol dentro do mesmo conjunto de amostras de adultas ($n=23$) e em comparação com os níveis de E2 de um conjunto estendido de amostras ($n=50$, dados retirados de Martins et al. 2020). A divisão entre fêmeas imaturas e maduras foi determinada de acordo estudo prévio que ao avaliar a relação entre idade e a concentração de esteroides sexuais (testosterona e estradiol) nesta mesma população propôs que a maturidade sexual ocorra majoritariamente entre o primeiro ano e o terceiro anos de vida do indivíduo (Martins et al. 2020). Já as categorias de sazonalidade foram definidas com base nas extensivas observações comportamentais e endocrinológicas que definiram o outono como principal

estação reprodutiva para este canídeo (p.ex. Dietz, 1984; Comizzolli et al.2009; Emmons et al., 2012; Martins et al. 2020).

Os dados foram normalizados utilizando a transformação em raiz quadrada. Testes *t* foram realizados para determinar a existência de diferença significativa entre as concentrações médias de HAM entre fêmeas pré- púberes e maduras (como parte do processo de validação fisiológica), e entre adultas dentro e fora da estação reprodutiva. A análise de regressão linear foi realizada para verificar a relação entre as concentrações de HAM e a idade dos indivíduos. Por fim, a relação entre as concentrações séricas de HAM e E2 foram obtidas pela correlação de Spearman (uma vez que dados de E2 não foram normais, mesmo após transformação). Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para todas as análises foi adotado um nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

A concentração basal média de HAM calculada a partir das amostras de fêmeas adultas foi de $0,586 \pm 0,517$ ng/ml ($n=23$). Conforme observado na Figura 1, o teste *t* de Student constatou diferença significativa ($p=0,04$) entre os níveis séricos de HAM de fêmeas imaturas e maduras. Metade ($n=3$) das fêmeas imaturas amostradas apresentou concentrações de HAM abaixo do limite de detecção do ensaio, sendo suas idades estimadas em 4, 6 e 7 meses de vida, ao passo que as demais fêmeas imaturas nas quais o HAM foi detectado possuíam mais que seis meses de idade. Ainda dentro grupo amostral das jovens, as concentrações de HAM mantiveram-se menores ou iguais a $0,897$ ng/ml (média de $0,299 \pm 0,150$ ng/ml) (Apêndice B). Para fêmeas maduras ($n=23$), apenas três indivíduos ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio, quando as demais apresentaram concentrações de até $5,490$ ng/ml (média de $1,142 \pm 0,301$ ng/ml) (Apêndice B).

Figura 1. Concentrações médias de HAM entre fêmeas de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) imaturas (≤ 1 ano de idade, $n = 6$) e maduras (> 1 ano de idade, $n = 23$). O asterisco na coluna indica diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

A análise de regressão linear sugeriu uma relação próxima da significativa entre as concentrações séricas de HAM e idade em meses ($\text{HAM} = 0.21 + [0.081 \times \text{Raiz da idade}]$; $R^2 = 0.11$; $p = 0,06$; Figura 2).

Figura 2. Regressão linear de idade (meses) em relação às concentrações de hormônio anti-Mulleriano (HAM) (ng/ml) para 29 fêmeas de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Dados transformados em raiz quadrada.

O efeito potencial da estação reprodutiva sobre as concentrações séricas de HAM em fêmeas maduras foi constatado por meio de diferença significativa ($p=0,05$) entre concentrações médias de adultas dentro e fora da estação reprodutiva (Figura 3). Fêmeas dentro de estação apresentaram concentração média HAM de $1,718 \pm 0,650$ ng/ml ao passo que fora de estação reprodutiva este valor caiu para $0,772 \pm 0,243$ ng/ml (Apêndice B).

Figura 3. Concentrações médias de HAM entre fêmeas adultas de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) durante a estação reprodutiva (ER) e a estação não reprodutiva (ENR). O asterisco na coluna indica diferença significativa entre médias ($p < 0,05$).

Apesar das concentrações médias de HAM prevalecerem elevadas predominantemente durante a primeira metade do ano (janeiro a junho), podendo ultrapassar em até três vezes os índices basais médios (Figura 4), um segundo período de elevação, em menor escala (aproximadamente 1,4 vezes a concentração basal) foi observado em setembro-outubro. Ao longo do ano, os bimestres que registraram as maiores concentrações de HAM foram março-abril (5,490 ng/ml), maio-junho (4,578 ng/ml) e setembro-outubro (3,173 ng/ml).

Figura 4. Média ($\pm$ EPM) das concentrações de **(a)** HAM (n=23) de lobas-guará (*Chrysocyon brachyurus*) adultas ao longo do ano. A linha tracejada indica valores basais médios, calculados de acordo com Brown *et al* (1999).

Por fim, ainda que os padrões de concentração média de HAM e estradiol sigam tendências semelhantes ao longo do ano (Figura 5), não houve correlação entre as concentrações séricas de estradiol e HAM ($r_s = -0,156$, $p = 0,444$).

Figura 5. Comparação entre as concentrações médias (ng/ml) de HAM (linha preta) e E2 (linhas cinza) de lobas-guará (*Chrysocyon brachyurus*) adultas ao longo do ano. Em cinza, a linha cheia indica a concentração média de E2 dentro do mesmo conjunto de amostras (n=23) usadas para dosar HAM ao passo que a linha tracejada indica a concentração média de E2 em relação a um conjunto de amostras estendido (n=50) extraído de MARTINS et al. (2020).

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o estudo do hormônio anti-Mülleriano como um importante biomarcador da fertilidade tem sido bastante relevante não apenas como ferramenta de diagnóstico, mas também para o aprimoramento de técnicas de reprodução assistida em humanos (LaMarca e Volpe, 2006; Visser et al. 2006; Smeenk et al. 2007), animais de produção (Almeida et al. 2011; Lahoz et al. 2012; Mossa et al. 2017) e, mais recentemente, em animais de companhia (Axnér & Holst, 2015; Hollinshead et al. 2017; Nagashima et al. 2017). O presente estudo é pioneiro na mensuração de HAM em um canídeo selvagem. Considerando-se as dificuldades inerentes à coleta de amostras em animais de vida livre, sobretudo em espécies de índole solitária e reservada como o lobo-guará, nossa pesquisa encontrou limitações relevantes em relação ao número e ao volume das amostras disponibilizadas para a realização da análise de HAM. Em virtude

da pouca quantidade de material, ficaram restritas também as possibilidades de testes de validação do ensaio, motivo pelo qual, para essa análise inicial, optamos pela realização da validação fisiológica do ensaio apenas. Posto isto, também é necessário ressaltar que entre dos mamíferos há uma ampla variação nas concentrações de HAM, não apenas entre espécies, mas também em relação ao gênero (La Marca & Volpe, 2006). Em muitos casos, a diferença entre níveis séricos de machos e fêmeas pode atingir magnitude de cem vezes (ao exemplo de Dow et al. 2011; Wilson et al. 2011; Montano et al. 2017), de modo que os níveis relatados para fêmeas de lobo-guará dificilmente poderão ser utilizados como referência para uma futura análise de machos.

As concentrações de HAM observadas em nosso estudo estão dentro dos intervalos relatados para fêmeas de outras espécies de mamíferos, em especial a cadela *Canis lupus familiaris* (Place et al 2011. Hollinshead et al 2017, Nagashima et al.2017). Em termos de valores basais, a concentração média encontrada ($0,586 \pm 0,517$ ng/ml) aproxima-se da relatada para cadelas por Nagashima et al. (2017), que variou entre 0,21 e 0,58 ng/ml (n=5). Como os próprios resultados do referido estudo sugerem, é possível haver uma grande variação individual entre níveis basais de HAM, um ponto que deve ser levado em consideração para comparações e interpretações futuras de nossos resultados.

Quando confrontadas as categorias de maturidade, nossas análises demonstraram que fêmeas pré-púberes possuíram as menores médias de HAM (inclusive em relação a fêmeas adultas fora de estação reprodutiva), havendo diferença significativa entre os valores delas e de fêmeas maduras, o que validou fisiologicamente o ensaio para a espécie. Estes resultados assemelham-se ao encontrados em mulheres (Hudson et al.1990) e cadelas (Place et al. 2011), nos quais indivíduos pré-púberes apresentaram concentrações séricas de HAM consideradas baixas ou até mesmo indetectáveis. Nas fêmeas imaturas avaliadas neste estudo (n=6), os valores de HAM ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio metade dos indivíduos, e abaixo da concentração basal em todos os animais com exceção de um: uma fêmea de aproximadamente um ano de idade, cuja concentração sérica de HAM atingiu 0,897 ng/ml. É passível de especulação se esta fêmea já se encontrava em processo de puberdade. Apesar de não existirem dados

precisos acerca da idade na maturidade sexual para a espécie, um de nossos estudos recentes (Martins et al. 2020) sugere que esse processo ocorra entre o primeiro e o terceiro ano de vida.

De acordo com Lee e colaboradores (1996) em roedores, os níveis de proteína e mRNA de HAM até então desprezíveis no ovário pré-pubertal, apresentam um aumento gradual em sua expressão por ocasião do amadurecimento sexual. De maneira semelhante, picos pré-pubertais de HAM já foram descritos para ovelhas (Lahoz et al. 2014) e gatas (Axnér & Holst, 2015). Dentro deste contexto, um padrão de transição hormonal sugestivo para o estabelecimento da puberdade foi insinuado em nossos resultados, com aumento gradual nas concentrações de HAM ocorrendo a partir de um ano e culminando em três anos de idade (aproximadamente entre os pontos 4 e 6, na Figura 2), precisamente a janela sugerida pelo nosso estudo.

Ainda em referência à correlação entre idade e níveis séricos de HAM, contrariando nossas expectativas, nossa análise demonstrou que, à medida que a idade das fêmeas amostradas avançou, houve um aumento concomitante nas concentrações de HAM. Sendo um potencial biomarcador da fertilidade, um declínio nas concentrações séricas de HAM (em conjunto com outros padrões reprodutivos) pode ser considerado parte do processo fisiológico que leva a senescência reprodutiva (Montano et al. 2017). É possível propor que nossos resultados apenas reflitam a dificuldade de observação da ocorrência da senescência em espécies selvagens (uma vez que estas sucumbiriam à predação, doenças ou condições ambientais adversas antes disso) o que, de fato, é uma teoria bastante difundida no meio científico (Nussey et al. 2013). Este fato poderia inclusive explicar por que a distribuição de idade das amostras de adultas utilizadas em nosso estudo está, em sua quase totalidade, limitada ao auge ('prime age') reprodutivo da espécie (entre 3 a 8 anos de idade, Songsasen & Rodden, 2010). A despeito do fato de que em vida livre a expectativa de vida do lobo-guará pode chegar a 12 anos (Songsasen et al. 2014), amostras de indivíduos com mais de 10 anos foram bastante raras nos registros do BRG do CENAP. Considerando-se que, em cativeiro a expectativa de vida destes animais pode atingir até 16 anos (Rodden et al. 2004), é bem provável que, o estudo da variação de HAM em um grupo de amostras de animais cativos com mais de

8 anos forneça *insights* valiosos tanto para cálculos populacionais quanto para a otimização e aprimoramento de programas de reprodução.

Além das diferenças encontradas entre lobas-guará pré-púberes e adultas, também foi observado efeito sazonal significativo nas concentrações séricas de HAM entre as adultas desta espécie. O perfil de HAM ao longo do ano seguiu de maneira quase sincrônica o perfil sazonal de estradiol e testosterona séricos relatado previamente pela nossa equipe (Martins et al 2020), e se aproximou bastante dos padrões sazonais de esteroides gonadais usualmente apresentados para espécie (Velloso et al.1998; Maia & Gouveia, 2002; Rodden et al 2004; Maia et al.2008; Comizzoli et al.2009). A variação sazonal nos valores de HAM já foi relatada em algumas espécies exóticas tais como o hamster siberiano (*Phodopus sungorus*, Kabithe & Place, 2008), os peixes-boi (*Trichechus manatus*, Wilson et al., 2011) e em belugas (*Delphinapterus leucas*, Montano et al.2017). Enquanto que nos machos este efeito está associado à resposta das células de Sertoli, à um aumento do estímulo gonadotrófico ou ainda ao aumento no número destas células no testículo (Claes et al. 2013), nas fêmeas, a relação entre as flutuações sazonais de HAM e a atividade folicular ovariana ainda permanece uma incógnita (Montano et al. 2017). Uma vez que os pequenos folículos ovarianos em crescimento (principais responsáveis pela expressão do HAM neste sexo) independem da ação das gonadotrofinas, é pouco provável que uma resposta ao estímulo gonadotrófico esteja por detrás deste fenômeno.

Ainda em relação à sazonalidade, este estudo reafirma um aspecto interessante evidenciado em nossa pesquisa anterior (Martins et al. 2020) nesta população: a ocorrência de atividade ovariana fora da estação reprodutiva preconizada, entre os meses de setembro e outubro. Há três hipóteses para este segundo pico: i) uma onda folicular anovulatória (o que explicaria a menor amplitude dos picos de E2 e HAM), ii) adiantamento da atividade reprodutiva (o que já foi observado em populações vida livre por Dietz, 1894; Emmons et al.2012; Vynne, 2010) ou ainda iii) uma possível segunda ovulação. Estes resultados apenas reafirmam a validade dos estudos endocrinológicos em populações de vida livre que, além de fornecerem informações valiosas sobre a

biologia natural da espécie, também oferecem a oportunidade de observar a resposta do animal às variáveis ambientais (Kersey & Dehnhard, 2014).

Por fim, nossos resultados constataram falta de correlação entre as concentrações de HAM e de estradiol, fato também relatado por Axné & Holst (2015) em gatas e por Rico et al (2011) em vacas. Assim como propõem Rico e colaboradores (2011), em virtude da sua dependência do estímulo gonadotrófico, o estradiol é um reconhecido marcador do desenvolvimento folicular terminal, de maneira que não é esperado que ele se correlacione com as concentrações de HAM, um marcador de desenvolvimento folicular inicial.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos na presente pesquisa demonstram que o HAM está presente no soro de lobos-guarás fêmeas em concentrações que variam de acordo com o status de maturidade, sazonalidade e, possivelmente, com a idade. A diferença das concentrações médias entre fêmeas imaturas e maduras, sugere que o HAM é um aliado valioso na avaliação das alterações pubertais na função gonadal, aspecto até então pouco estudado nesta espécie. Nossos achados também indicam a existência de um efeito sazonal na produção de HAM, o que deve ser levado em conta numa futura amostragem que vise o monitoramento deste hormônio. Ademais, embora indícios do declínio de HAM (e, conseqüentemente, da função ovariana) associados à idade não tenham sido caracterizados, acreditamos que, dentro de uma amostragem mais expressiva esta correlação possa ser elucidada. Em suma, nossos resultados são de grande valia não apenas por enriquecerem o escasso conhecimento acerca da fisiologia reprodutiva do lobo-guará, como também pela sua potencial aplicação no desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida e no monitoramento de fertilidade em programas de conservação da espécie.

FINANCIAMENTO

Este estudo faz parte de Tese submetida a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) como parte dos requisitos para

obtenção do título de Doutor em Reprodução Animal e foi apoiado financeiramente pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Processo 88882.276411/2019-01) e pela Fundação Fulbright através de bolsa de auxílio e bolsa de doutorado sanduiche, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à G. Sobral pelas contribuições na revisão do rascunho original; ao Dr.B. Pretroff, ao Veterinary Diagnostic Laboratory (Michigan State University), à Dr.M. Brown e ao Endocrinology Research Laboratory do Smithsonian Conservation Biology Institute, pela orientação, acompanhamento e disponibilização de equipamentos e reagentes para realização das dosagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.; BALL, B.; CONLEY, A.; et al. Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. **Theriogenology**, v.76, p.1393–1403, 2011.
- AXNÉR, E.; HOLST, B.S. Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. **Theriogenology**, v.83, p.817-21, 2015.
- BROWN, J.L.; SCHMITT, D.L.; BELLEM, A.; et al. Hormone secretion in the Asian elephant (*Elephas maximus*): characterization of ovulatory and anovulatory luteinizing hormone surges. *Biology of Reproduction*, v.61, p.1294–1299, 1999.
- CAMPBELL, B.K.; CLINTON, M.; WEBB, R. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). **Endocrinology**, v.153, p.4533–43, 2012.
- CATE, R.L.; MATTALIANO, R.J.; HESSION, C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. **Cell**, v.45, p.685–698, 1986.
- CLAES, A.; BALL, B.A.; ALMEIDA, J.; et al. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. **Theriogenology**, v.79, p.1229-35, 2013.

- COMIZZOLI, P.; CROSIER, A.E.; SONGSASEN, N.; et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44(2), p.47-52, 2009.
- CUNHA DE PAULA, R. et al. Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília DF, v.3, n.1, p.146-159, 2013.
- DE VET, A.; LAVEN, J.S.E.; DE JONG, F.H.; et al. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertility and Sterility**, v.77(2), p.357-62, 2002.
- DEWAILLY, D.; ROBIN, G.; PEIGNE, M.; et al. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. **Human Reproduction Update**, v.22(6), p. 709–724, 2016.
- DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contribution to Zoology**, Washington DC, v.392, p. 1–51, 1984.
- DOW, T.; ROUDEBUSH, W.E.; PARKER, F.N., et al. Influence of age and gender on secretion of anti-Müllerian hormone in Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. **Theriogenology**, v.75, p.620–627, 2011.
- DURLINGER, A.L.L.; GRUIJTERS, M.J.; KRAMER, P.; et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.142, p.4891– 99, 2001.
- DURLINGER, A.L.L.; KRAMER, P.; KARELS, B. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti- Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.140, p.5789–96, 1999.
- DURLINGER, A.L.L.; VISSER, J.A.; THEMMEN, P.N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. **Reproduction**, v.124, p.601-09, 2002.
- EMMONS, L.H. et al. Social interactions and reproduction. In: EMMONS, L.H. **The Maned Wolves of Noel Kempf Mercado National Park**. Washington DC: Smithsonian Institute Scholarly Press, 2012. p. 57–75.
- FANCHIN, R.; SCHONAUER, L.M.; RIGHINI, C.; et al. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. **Human Reproduction**, v.18, p.323–27, 2003.
- GRAHAM, L.H. Non-Invasive Monitoring of Reproduction in Zoo and Wildlife Species. **ARBS Ann.Ver. Biomed.Sci.**, v.6, p.91-8, 2004.

- GRYNNERUP, A.G.; LINDHARD, A.; SORESEN, S. The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility – an overview. **Acta Obstetrica et Gynecologica**, v.91, p.1252-60, 2012.
- HOLLAND, R. The Maned wolf Ex Situ Worldwide. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.4.p.53-62.
- HOLLINSHEAD, F.K.; WALKER, C.; HANLON, D.W. Determination of the normal reference interval for anti-Müllerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52 (2), p.35-40, 2017.
- HUDSON, P.L.; DOUGAS, I.; DONOHUE, P.K. et al. An immuno- assay to detect human Müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.70, p.16–22, 1990.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Lista de espécies terrestres e mamíferos aquáticos ameaçados** - Portaria MMA nº444, de 17 de dezembro de 2014. 13 p., 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/faunabrasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2017.
- JOHNSON, A.E.M. et al. Induction of ovarian activity and ovulation in an induced ovulator, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), using GnRH agonist and recombinant LH. **Theriogenology**, Milan, v.82, p. 71–79, 2014.
- JOSSO, N.; CATE, R.L.; PICARD, J.Y.; et al. Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. **Recent Progress in Hormone Research**, v.48, p.1–59,1993.
- JOST, A. Recherches sur la differenciation sexuelle de l’embryon de lapin. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, v.36, p.217–315, 1947.
- KABITHE, E.W.; PLACE, N.J. Photoperiod-dependent modulation of anti-Müllerian hormone in female Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. **Reproduction**, v.135, p.335–342, 2008.
- KERSEY, D.C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, v.203, p.296–306, 2014.
- LA MARCA, A.; VOLPE, A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? **Clinical Endocrinology**, v.64, p.603–10, 2006.

- LAHOZ, B.; ALABART, J.L.; COCERO, M.J.; et al. Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology*, v.81, p.347-57, 2014.
- LAHOZ, B.; ALABART, J.L.; MONNIAUX, D.; et al. Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.118-127, 2012.
- LASLEY, B.L.; KIRKPATRICK, J.F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. **Journal of zoo and Wildlife Medicine**, v.22(1), p.23-31, 1991.
- LEE, M.M.; DONAHOE, P.K.; HASEGAWA, T.; et al. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.81, p.571–576, 1996.
- MAIA, O.B.; GOUVEIA, A.M.G. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.62, p.25–32, 2002.
- MAIA, O.B. et al. Comparison of serum hormone levels of captive and free-living maned wolves *Chrysocyon brachyurus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v.41, p.176-179, 2008.
- MARTINS, G.S.; OLIVEIRA, C.A. Notas sobre a biologia reprodutiva do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*): particularidades, entraves a conservação e perspectivas futuras.
- MARTINS, G.S.; SONGSASEN, N.; OLIVEIA, C.A. Do freezer a bancada: o uso de amostras de banco de recursos genéticos para determinar efeito da idade e ambiente sobre a concentração de esteroides sexuais em lobos-guará de vida-livre.
- MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p.200–214, 2000.
- MONTANO, G.A.; ROBECK, T.R.; STEINMAN, K.J.; et al. Circulating anti-Müllerian hormone concentrations in relation to age and season in male and female beluga (*Delphinapterus leucas*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29(8), p.1642-1652, 2017.
- MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D.; et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. **Reproduction**, v.154, p. R1-R11, 2017.

- NAGASHIMA, J.B.; HANSEN, B.S.; SONGSASEN, N.; et al. Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p.158-164, 2016.
- NUSSEY, D.H.; FROY, H.; LEMAÎTRE, J.F.; et al. Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for biogerontology. **Ageing Research Reviews**, v.12, p.214–225, 2013.
- PAULA, R.C.; DEMATTEO, K. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T4819A88135664. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>>. Acesso em: 7 ago. 2016.
- PLACE, N.; HANSEN, B.S.; CHERASKIN, J.; et al. Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariectomy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23(3), p.524-27, 2011.
- QUEIROLO, D.; MOREIRA, J.R.; SOLER, L.; et al. Historical and current range of the Near Threatened maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America. **Oryx**, v.45(2), p.296-303, 2011.
- RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; et al. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology of Reproduction**, v.80, p.50-59, 2009.
- RICO, C.; et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biology of Reproduction**, v.84, p.560–571, 2011.
- RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D.W. **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs**. Cambridge: IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge 2004. cap.3, p.38–43.
- SMEENK, J.M.J.; SWEEP, F.C.G.J.; ZIELHUIS, G.A.; et al. Anti-Müllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v.87, p.223–226, 2007.
- SONGSASEN, N. et al. Reproduction and Factors Affecting Reproductive Success in the Maned Wolf. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014. cap.8. p.99-108.

- SONGSASEN, N.; RODDEN, M. The role of the Species Survival Plan in Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* conservation. **International Zoo Yearbook**, London, v. 44, n.1, p.136-148, 2010.
- SPERCOSKI, K.M. **Monitoramento a longo prazo da excreção de corticoides fecais em lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1811) de cativeiro e vida livre: uma contribuição para o manejo e a conservação da espécie**. 2007, 68 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- STEINER, A. Z.; HERRING, A. H.; KESNER, J. S.; et al. Anti-Müllerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30–42 years. **Obstetrics and Gynecology**, v.117, p.798–804, 2011.
- TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M.; MANGANARO, T.F.; et al. The ontogeny of Müllerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v.35, p.447–53, 1986.
- TAR, R.; SEIFER, D.B.; KHANIMOV, M.; et al. Characterization of women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes. **Am.J.Obstet.Gynecol.**v.211, p.59.e1–8, 2014.
- TEIXEIRA, J.; MAHESWARAN, S.; DONAHOE, P.K. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. **Endocrine Reviews**, v.22, p.657–674, 2001.
- VANSTREELS, R.E.T.; PESSUTTI, C. Analysis and discussion of Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* population trends in Brazilian institutions: lessons from the Brazilian studbook, 1969–2006. **International Zoo Yearbook**, London, v.44, p.121–135, 2010.
- VELLOSO, A. L. et al. Longitudinal Fecal Steroid Excretion in Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **General and Comparative Endocrinology**, v.112. p. 96–107,1998.
- VIGIER, B; PICARD, J.Y.; TRAN, D.; et al. Production of anti- Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v.114 p.1315–1320, 1984.
- VISSER, J.A.; JONG, F.H.; LAVEN, J.S.; et al. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, v.131, p.1-9, 2006.
- VYNNE, C. **Landscape use by wide-ranging mammals of the cerrado**. 2010, 144 p. PhD Thesis, University of Washington, Seattle, 2010.

- WILSON, R.C.; REYNOLDS, J.W.; WETZEL, D.L. et al. Secretion of anti-Müllerian hormone in the Florida manatee *Trichechus manatus latirostris*, with implications for assessing conservation status. **Endangered Species Research**, v.14, p.107-112, 2011.

APÊNDICE A. Dados de leitura de ensaio imunoenzimático para dosagem de HAM (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) em lobos guará fêmeas.

I.D Poço	Poços	Leitura (450nm)	Média	Desv.Padrão	CV (%)
Branco	A1	0,053	0,054	0,001	2,619
	A2	0,055			
Padrão 1	B1	0,059	0,061	0,004	5,749
	B2	0,064			
Padrão 2	C1	0,080	0,081	0,001	1,746
	C2	0,082			
Padrão 3	D1	0,142	0,144	0,002	1,478
	D2	0,145			
Padrão 4	E1	0,320	0,32	0	0
	E2	0,320			
Padrão 5	F1	0,604	0,595	0,013	2,139
	F2	0,586			
Padrão 6	G1	1,262	1,256	0,009	0,732
	G2	1,249			
C1(negativo)	H1	0,264	0,267	0,004	1,327
	H2	0,269			
C2 (positivo)	A4	0,610	0,629	0,027	4,272
	A3	0,648			
LG1	B3	0,066	0,066	0	0
	B4	0,066			
LG2	C3	0,056	0,056	0,001	1,274
	C4	0,055			
LG3	D3	0,049	0,051	0,003	5,546
	D4	0,053			
LG4	E3	0,041	0,042	0,001	1,704
	E4	0,042			
LG5	F3	0,096	0,098	0,002	2,176
	F4	0,099			
LG6	G3	0,106	0,108	0,003	2,619
	G4	0,110			
LG7	H3	0,107	0,104	0,004	4,079
	H4	0,101			
LG8	A5	0,434	0,417	0,024	5,765
	A6	0,400			
LG9	B5	0,159	0,159	0	0
	B6	0,159			
LG10	C5	0,113	0,11	0,004	3,857
	C6	0,107			

(APÊNDICE A– Continuação)

I.D Poço	Poços	Leitura (450nm)	Média	Desv.Padrão	CV (%)
LG11	D5	0,089	0,088	0,001	1,607
	D6	0,087			
LG12	E5	0,193	0,193	0,001	0,367
	E6	0,192			
LG13	F5	0,127	0,125	0,003	2,263
	F6	0,123			
LG14	G5	0,175	0,169	0,009	5,455
	G6	0,162			
LG15	H5	0,046	0,047	0,001	3,009
	H6	0,048			
LG16	A7	0,095	0,093	0,002	2,269
	A8	0,092			
LG17	B7	0,277	0,278	0,001	0,255
	B8	0,278			
LG18	C7	0,078	0,081	0,004	4,392
	C8	0,083			
LG19	D7	0,106	0,109	0,004	3,892
	D8	0,112			
LG20	E7	0,122	0,122	0	0
	E8	0,122			
LG21	F7	0,085	0,084	0,001	1,684
	F8	0,083			
LG22	G7	0,044	0,044	0,001	1,589
	G8	0,045			
LG23	H7	0,044	0,045	0,002	4,662
	H8	0,047			
LG24	A9	0,167	0,167	0	0
	A10	0,167			
LG25	B9	0,063	0,069	0,008	11,355
	B10	0,074			
LG26	C9	0,068	0,07	0,003	4,041
	C10	0,072			
LG27	D9	0,348	0,364	0,023	6,216
	D10	0,380			
LG28	E9	0,049	0,049	0	0
	E10	0,049			
LG29	F9	0,130	0,132	0,002	1,613
	F10	0,133			

APÊNDICE B. Médias ($\pm$ EPM) e variações das concentrações circulantes de HAM de acordo com status de maturidade (Imaturas: ≤ 1 ano, Maduras: < 1 ano) e sazonalidade (ER: estação reprodutiva; ENR: estação não reprodutiva) de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) fêmeas.

	Amostras (n)	Média (ng/ml)	Variação (ng/ml)
<i>Idade</i>			
Imaturas	6	$0,299 \pm 0,150$	$< 0,004 - 0,897$
Maduras	23	$1,142 \pm 0,301$	$< 0,004 - 5,490$
<i>Sazonalidade</i>			
ER	9	$1,718 \pm 0,650$	$< 0,004 - 5,490$
ENR	14	$0,772 \pm 0,243$	$< 0,004 - 3,173$

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, as tentativas de se estabelecerem populações viáveis de lobo-guará *ex-situ* parecem ter atingido um delicado impasse onde a eficiência reprodutiva e o avanço de técnicas de reprodução assistida estão limitados por questões que envolvem não apenas aspectos fisiológicos, mas também técnicas de manejo em constante necessidade de aperfeiçoamento e, acima de tudo, um conhecimento ainda superficial acerca da história natural da espécie. Verdade seja dita, com exceção do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), poucas são as informações acerca de detalhes da fisiologia reprodutiva em todas as outras 35 espécies que compõe a família *Canidae* (Jewgenow & Songsasen, 2014).

O objetivo central desta tese foi oferecer informações e ferramentas que pudessem auxiliar na compreensão mais profunda da história de vida do lobo-guará pela óptica reprodutiva e, conseqüentemente, contribuir para a melhoria das ações de monitoramento e conservação da espécie. Para tanto, a primeira medida tomada foi retroceder um passo e colocar o atual conhecimento e experiência acerca do tema em perspectiva. Onde estavam as principais lacunas de conhecimento? Como abordá-las? O resultado dessa análise foi o **Capítulo I**. Nele, discutimos algumas das características reprodutivas e comportamentais que fazem do lobo-guará uma espécie díspar entre os canídeos, entre elas: a natureza essencialmente solitária (Dietz, 1984); a baixa qualidade seminal (Songsasen et al. 2014); a presença de ovulação induzida (Johnson et al. 2014); a prevalência de ninhadas pequenas (Dietz, 1984); etc. O contato com a literatura existente para a espécie também nos mostrou a carência de estudos fisiológicos em vida livre - tão importantes para a compreensão dos fatores que governam os padrões reprodutivos observados em cativeiro (Kersey & Dehnhard, 2014), porém dispendiosos tanto financeira quanto estruturalmente.

Ao fim dessa análise, três questões pareceram bastante relevantes dentro da premissa de nosso objetivo inicial: (1) a necessidade retomarmos a pesquisa da fisiologia básica sob condições naturais; (2) a necessidade de desenvolver estratégias para mitigar o custo associado a este tipo de pesquisa expandindo a sua aplicação; e (3) oferecer novas alternativas para o monitoramento da função reprodutiva desta espécie. Os **Capítulos II**

e III trataram de abordar estas questões. A ideia de usar de amostras de BRGs teve origem na necessidade de realizar pesquisa com recursos financeiros extremamente limitados e acabou gerando uma reflexão sobre o potencial e as limitações do uso deste material em pesquisas endocrinológicas: ao mesmo tempo que permite números amostrais mais expressivos e gera menos impacto nos indivíduos por evitar novas capturas, exige uma curadoria bastante criteriosa e não permite estudos extremamente específicos (como, por exemplo, de caracterização de ciclo estral) em vista da natureza pontual dos dados gerados.

A pontualidade dos dados, no entanto, não nos impediu de estreitar a janela da puberdade para espécie, pauta pouco abordada na literatura existente. Embora estudos longitudinais sejam necessários para uma maior especificidade, os resultados dos **Capítulos II e III** indicam que, a partir de pouco mais que um ano de idade o processo de amadurecimento sexual já pode ocorrer. Este tipo de informação é extremamente valiosa para estudos de viabilidade e crescimento populacional além de ser essencial no planejamento inteligente de cruzamentos *ex situ*.

Ainda com base no material disponibilizado pelo BRG, conseguimos correlacionar pela primeira vez dados ambientais com os níveis de hormônios reprodutivos, o que nos permitiu analisar a sazonalidade reprodutiva da espécie sob uma nova óptica: é bastante comum que a literatura *ex situ* descreva o lobo-guará como reprodutor sazonal estrito com temporadas reprodutivas curtas (Comizzoli, 2009) - características muito mais corriqueiras em espécies de clima temperado. Contudo, observações já indicavam que em vida livre o quadro poderia ser diferente (Dietz, 1984; Emmons, 2012; Vynne, 2010). De fato, a expressão da sazonalidade reprodutiva em espécies tropicais tende à flexibilidade, com estações reprodutivas mais longas e, não raramente, sofre influência do ciclo de presas decorrente de regimes pluviais (Asa & Valdespino, 1998). Foi exatamente este padrão que encontramos em nossas análises (**Capítulo II**). A avaliação da influência dos fatores ambientais sobre a reprodução de populações naturais é de extrema importância para a caracterização dos requisitos ambientais necessários para uma reprodução bem-sucedida (Wingfield et al. 1997). Ademais, ao correlacionarmos o regime de chuvas à atividade gonadal, criamos um importante precedente para a

avaliação do impacto que as mudanças ambientais (tanto globais quanto locais) terão sobre o futuro da espécie. Além de apontarem para uma possível antecipação da estação reprodutiva, nossos dados também implicam na possibilidade de ocorrência de mais de um ciclo por ano, o que não parece usual, mas poderia ocorrer em casos de perda precoce de ninhadas ou impossibilidade de acasalamento.

Em concordância com as análises de esteroides sexuais, os níveis de HAM (**Capítulo III**) também demonstraram variações sazonais em suas concentrações, inclusive durante a primavera. Embora a correlação entre os fatores ambientais e o desencadeamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal esteja bem estabelecida, a possível influência destes fatores sobre a produção de HAM sugere que existem outros caminhos pelos quais as condições ambientais afetam a atividade ovariana, levando ao recrutamento e crescimento inicial de folículos ovarianos. O ensaio de HAM também se provou uma ferramenta bastante interessante para o monitoramento da função ovariana nesta espécie, e pode ser uma peça-chave nos estudos da dinâmica folicular, na aplicação de técnicas de superovulação, fertilização *in vitro* ou ainda de monitoramento da fertilidade.

Apesar de extremamente promissor, um único aspecto da dosagem de HAM nos impediu de aplicar este ensaio em maior escala: o seu custo. Ainda são poucas as opções de kits comerciais para a dosagem deste hormônio e, embora a sensibilidade do kit escolhido seja notável, o custo de uma única placa (96 poços) ultrapassou os mil dólares. Felizmente, em vista do contínuo avanço da tecnologia de dosagem hormonal nos últimos anos, é bem provável que no futuro o custo para a dosagem de HAM seja mais acessível.

Em conclusão, consideramos que ao mesmo tempo que esta tese contribuiu para seu propósito de elucidar parte história de vida do lobo-guará, ela provou que este ainda é um território carente de exploração. A partir de nossas análises, por exemplo, conseguimos prover informações importantes a respeito da puberdade e da sazonalidade reprodutiva da espécie, apesar de levantarmos importantes dúvidas sobre características até então inquestionáveis como a monoestria ou a flexibilização da estação reprodutiva. Ademais, provamos o potencial do HAM como uma ferramenta para a resolução destas mesmas dúvidas. Como uma última reflexão, gostaria de ressaltar que o caminho para conservação de uma espécie nunca é trilhado sozinho. Esta talvez seja a principal lição

deste trabalho. Sem o apoio de equipes e instituições nacionais e internacionais que atuaram desde a coleta de amostras á campo; na criação, manutenção e curadoria do BRG; até as análises laboratoriais, nenhum dos resultados aqui apresentados seria possível. A luta pela conservação do resiliente lobo-guará está longe de terminar. A presente tese representa apenas mais um passo nessa longa jornada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASA, C.S.; VALDESPINO, C. Canid reproductive biology: an integration of proximate mechanisms and ultimate causes. **American Zoologist**, v. 38, p.251–259, 1998.
- COMIZZOLI, P.; CROSIER, A.E.; SONGSASEN, N.; et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44(2), p.47-52, 2009.
- DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contribution to Zoology**, Washington DC, v.392, p. 1–51, 1984.
- EMMONS, L.H. et al. Social interactions and reproduction. In: EMMONS, L.H. **The Maned Wolves of Noel Kempf Mercado National Park**. Washington DC: Smithsonian Institution Scholarly Press, 2012. p. 57–75.
- JEWGENOW, K.; SONGSASEN, N. Reproduction and Advances in Reproductive Studies in Carnivores. In: HOLT, W.V.; et al. **Reproductive Sciences in Animal Conservation**. New York: Springer-Verlag, 2014.cap.10.p.205-39.
- JOHNSON, A.E.M. et al. Induction of ovarian activity and ovulation in an induced ovulator, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), using GnRH agonist and recombinant LH. **Theriogenology**, Milan, v.82, p. 71–79, 2014.
- KERSEY, D.C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, v.203, p.296–306, 2014.
- SONGSASEN, N. et al. Reproduction and Factors Affecting Reproductive Success in the Maned Wolf. In: CONSORTE-MCCREA, A.G.; SANTOS, E.F. **Ecology and Conservation of the Maned Wolf: Multidisciplinary Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2014.cap.8.p.99-108.
- VYNNE, C. **Landscape use by wide-ranging mammals of the cerrado**. 2010, 144 p. PhD Thesis, University of Washington, Seattle, 2010.

- WINGFIELD, J.C.; et al. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: CLEMMONS, J.R.; BUCHHOLZ, R. **Behavioural Approaches to Conservation in the Wild**. London: Cambridge University Press, 1997. cap 5. p.95-105.