

BIOMETRIA MACRO E MICROSCÓPICA DOS COMPONENTES TESTICULARES EM LOBO GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) ADULTO

Viviane Lewicki Bittencourt¹
Tarcízio Antônio Rego de Paula¹
Sergio Luiz Pinto da Matta²
Cláudio César Fonseca¹
Deiler Sampaio Costa³
Eduardo Paulino da Costa¹
Laércio dos Anjos Benjamin¹

RESUMO

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

Palavras chave: lobo guará, testículo, biometria testicular, túbulo seminífero.

ABSTRACT

MACRO AND MICROSCOPIC BIOMETRY OF TESTICULAR COMPONENTS IN ADULT MANED WOLF (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811)

Biometric testicular macro and microscopic parameters aid in the development of protocols for assisted reproduction in different species. Four adult maned wolves derived from captivity were studied in the present experiment. The animals weighed 31.5 kg on average with testicular mass average of 6.3 g, having thus gonadosomatic index of 0.04%. The average volume of seminiferous tubule per testis was 4.81 mL, representing approximately 79.3% of the testicular parenchyma. Approximately 0.03% of the body mass was placed in seminiferous tubule, i.e., the tubulosomatic index. The maned wolf presented about 18 meters of seminiferous tubule per gram of testis. The diameter of the seminiferous epithelium was on average 227.3 μ m. The values recorded in this study are in agreement with the range found for other carnivorous species that have already been studied.

Key words: maned wolf, testis, testicular biometry, seminiferous tubule.

1- Universidade Federal de Viçosa. Depto de Veterinária. Av. P. H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: tarcizio@ufv.br.

2 - Universidade Federal de Viçosa. Depto de Biologia Geral. Av. P. H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000 Viçosa, MG.

3 - Universidade do Norte Fluminense UENF. Depto de Veterinária. Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-600 Campos dos Goytacazes, RJ.

INTRODUÇÃO

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

Os Lobos-guarás tem hábitos noturnos e crepusculares, ocupam uma área média de 30 km². São animais facultativamente monogâmicos, podendo os casais dividir a mesma área, mas raramente são vistos juntos, exceto durante a estação da reprodução (abril a junho). Os territórios são demarcados em locais específicos de defecação e urina em superfícies elevadas como morros de térmitas (Fletcher et al., 1995; Wieloch et al., 1997). Territórios de animais do mesmo sexo não se sobrepõe (Fletcher et al., 1995). Outra forma de comunicação comum é a voz, emitindo um rugido-latido, prolongado e profundo, como sinalização de sua presença dentro do território (Fletcher et al., 1995; Wieloch et al., 1997). A área familiar é a mesma por toda a vida, só sendo ocupada por outro quando seu habitante morre (Fletcher et al., 1995).

As fêmeas de lobo-guará são monoestras, ou seja, ciclam uma vez ao ano, na qual o estro dura em torno de 5 dias. De uma gestação de 63 – 67 dias, nascem de 2 a 5 crias (Dietz, 1984; Fletcher et al., 1995), na maioria das vezes durante a estação seca. As fêmeas escondem alimentos na toca antes de parir. Utilizam como toca, para fazer seu ninho, locais de topografia existentes tais como afloramento de rochas, pontos baixos nos capinzais e morros de térmitas abandonados (Fletcher et al., 1995). As mães amamentam seus filhotes, de pelagem negra e ponta da cauda branca, por quase dois meses e por alimentos regurgitados pelos pais (Fletcher et al., 1995; Wieloch et al., 1997).

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

A biometria testicular associada ao conhecimento da proporção volumétrica dos componentes testicular-

es e a quantificação da população celular no epitélio seminífero é fundamental à determinação da taxa de produção espermática, que é um parâmetro essencial para o desenvolvimento e aplicação de técnicas de reprodução assistida, as quais podem contribuir enormemente para a preservação de espécies ameaçadas (Courrot *et al.*, 1970; França, 1991; Guerra, 1983; Guião-Leite & Paula, 2003; Ortavant *et al.*, 1997; Roosen-Runge & Giesel, 1950). Neste sentido o presente trabalho teve como objetivo descrever os aspectos básicos da morfometria testicular, através de métodos conservativos da capacidade reprodutiva em lobos guarás adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Para o procedimento cirúrgico e mensuração dos testículos, cada animal foi contido quimicamente, com auxílio de dardos anestésicos, e mantido sob anestesia geral utilizando-se associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso) e xilazina (1 mg/kg de peso). Depois de anestesiados, os animais foram pesados e, através de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos bem como mensuradas suas dimensões externas de comprimento, largura e espessura com o uso de um paquímetro, descontando-se a espessura de uma prega dupla da pele do escroto. Estas dimensões foram utilizadas para o cálculo do volume testicular, através da fórmula $4/3\pi(ABC)$, onde A representa a metade do comprimento, B a metade da largura e C a metade da espessura, (Moreira et al., 1997; Guião leite et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006)

Após a mensuração dos testículos, foram feitas tricotomia e antissepsia local do escroto. A pele e a túnica fibrosa foram incisionadas e, com o uso de um bisturi circular de 4 mm de diâmetro, obteve-se um fragmento, o qual foi imediatamente imerso em solução fixadora de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Posteriormente, foi armazenado sob refrigeração, no mesmo tampão fosfato, até o processamento histológico. A albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele foram suturadas individualmente com pontos sim-

ples separados, utilizando fio absorvível sintético poligactina 910 (Vicril®[®], 3-0 – Ethicon). No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatório (Flunixin Meglumine, Banamine – Schering-Plough S/A, 1.1 mg/kg de peso) e antibiótico (penicilina, 20.000 UI/kg de peso).

Todos os fragmentos foram processados para estudos em microscopia óptica e, para tal, foram desidratados em bateria de álcoois de concentrações crescentes (70^o, 80^o, 90^o e 100^o GL) por uma hora cada, infiltrados em 2 banhos de resina plástica à base de glicol metacrilato (Hystoresin, *Leica Instruments*) e incluídos, na mesma resina, por adição do catalisador (dimetil sulfoxido). Da mesma maneira, a albugínea do fragmento foi processada e incluída separadamente. Foram obtidos cortes seriados, de quatro micrômetros (4 µm) de espessura em micrótomo rotativo (Reichert - Jung Modelo 2045 Multicut) dotado de navalha de vidro, com intervalos de 40µm; montados sobre lâmina de vidro e corados com Azul de Toluidina-Borato de Sódio a 1%. Todo o processo foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

O volume calculado para o testículo dos animais foi considerado como peso, visto que a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é aproximadamente 1,0 (Costa et al., 2006). Inferindo-se ao peso corporal o peso de ambos os testículos, foi calculado o índice gonadosomático (IGS), que representa o percentual de massa corporal alocado em testículos.

Para cálculo da proporção volumétrica ocupada pelo túbulo seminífero e espaço intertubular, foram obtidas 25 imagens aleatórias dos cortes histológicos, em microscópio óptico (Olympus CX 40) equipado com câmara digital (TCL - 984P). Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 14 polegadas, com aumento final de aproximadamente 1000 vezes. Uma graticula composta por 441 intersecções, foi aplicada sobre as imagens. Estas intersecções foram computadas como pontos coincidentes ao túbulo seminífero e espaço intertubular. Assim, para cada animal foram computados um total de 11.025 pontos no parênquima testicular. Com a proporção volumétrica do túbulo seminífero e espaço intertubular no volume testicular, foi possível o cálculo do volume total de cada um destes componentes testiculares.

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

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

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

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os animais apresentaram peso corporal médio de 31,5 kg (Tabela 1), semelhante ao descrito por Fletchall et al, (1995) para animais em cativeiro. Segundo Sheldon (1992) animais de vida livre atingem em média de 20 a 23kg. O peso dos testículos foi estimado a partir das dimensões testiculares, não sendo observada diferença entre os antímeros direito e esquerdo (Tabela 1). O lobo-guará apresenta cerca de 0,04% do peso corporal alocado em testículo, ou seja, índice gonadosomático (Tabela 1), esse índice é menor do que o 0,1% computado em cães SRD (Paula & Cardoso, 1995) e 0,07% em gatos domésticos (Godinho, 1999), porém muito próximo aos 0,03% observado no puma (Guião-Leite & Paula, 2003), outro carnívoro de massa corporal semelhante (Tabela 4), confirmando que de maneira geral os carnívoros apresentam baixo investimento de massa corporal em testículos (Kenagy & Trombulak, 1986).

A média do peso do testículo em lobo-guará oscilou entre 6,29 a 6,39 g. A relação entre testículo e peso corporal nas diferentes espécies não está relacionada com o tamanho e localização do testículo, forma do corpo ou modo de locomoção (terrestre, aquático ou aéreo). Porém, mamíferos de menor porte tendem a alocar maior proporção de massa corporal em testículos, que os de maior porte (Kenagy & Trombulak, 1986).

O tamanho relativo dos testículos correlaciona-se funcionalmente com o sistema de acasalamento (Dixson, 1993) e desta forma, espécies de mamíferos onde uma fêmea cruza com vários machos durante o período fértil

do ciclo ovariano, apresentam maiores índices gonadosomáticos em relação às espécies onde um único macho é responsável pela cópula. Isto se deve ao fato de, no primeiro caso, haver necessidade de maior produção espermática, uma vez que a competição pela fertilização ocorre no interior do trato genital feminino. Assim, o menor índice gonadosomático observado para o lobo-guará e para a onça parda em relação ao gato e cão doméstico parece ser reflexo de suas maiores massas corporais e do seu comportamento reprodutivo no qual raramente uma fêmea copula com mais de um macho durante o cio (Dietz, 1984).

Para os cálculos quantitativos de produção espermática, torna-se necessário a compartimentalização do testículo em seus diferentes componentes funcionais e estruturais.

A estimativa da proporção volumétrica testicular destes componentes inicia-se com o cálculo do volume ocupado pelo parênquima testicular, que representa o volume total do testículo descontado o percentual da albugínea e mediastino testiculares. Na maioria dos animais domésticos estes ocupam entre 10 a 15% (França & Russell, 1998). Como nos lobos-guarás do presente estudo utilizou-se apenas fragmentos obtidos através de biópsia testicular, não foi possível o acesso a dados sobre o mediastino testicular. Porém, foi possível estimar a espessura da albugínea testicular em cada animal e, por meio deste parâmetro, foi calculado seu volume médio, que variou de 0,59 a 0,64 ml, representando cerca de 11% do volume testicular (Tabela 2).

O túbulo seminífero é o principal componente do testículo nos mamíferos, exercendo grande influência sobre a massa testicular e a produção espermática (Amann, 1970). A proporção volumétrica de túbulos seminíferos pode variar de 61 a 86% em animais domésticos de produção (França & Russell, 1998). Em mamíferos não domésticos, a menor proporção volumétrica foi observada em capivaras, onde apenas 50% do parênquima testicular é composto por túbulos seminíferos (Costa et al., 2006). O volume médio de túbulos seminíferos observado em lobos-guarás foi de 4,81 ml por testículo, o que representou cerca de 79,3% do parênquima testicular (Tabela 2), sendo esta proporção volumétrica menor que os quase 90% observados no gato (Godinho, 1999) e no cão (Paula & Cardoso, 1994) (Tabela 4). Em relação à massa corporal, o lobo-guará apresenta cerca de 0,03 % desta alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático (Tabela 1). A onça parda apresenta cerca de 0,02% (Guião Leite & Paula, 2003), no cão

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

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

*valores estatisticamente semelhantes $p > 0,05$

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

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

e no gato domésticos este índice é bem superior, respectivamente de 0,08 e 0,06% (Godinho, 1999; Paula & Cardoso, 1995) (Tabela 4).

O diâmetro do túbulo seminífero permanece relativamente constante nos animais não sazonais e sexualmente maduros (Guião-Leite et al., 2006; Costa et al., 2006), embora, o valor tipicamente observado nos animais domésticos de produção apresente uma variação de 170 a 275µm (França & Russel, 1998). O lobo-guará apresenta diâmetro médio dos túbulos seminíferos de 227 µm (Tabela 3), o mesmo valor registrado na onça parda (Guião Leite & Paula, 2003), muito próximo ao observado no gato doméstico (Godinho, 1999) e acima do registrado no cão (Paula & Cardoso, 1995) (Tabela 4).

O comprimento total do túbulo seminífero é calculado a partir do volume total de túbulos seminíferos dividido por sua área de secção transversal. O lobo-guará apresenta em média 109 metros de túbulo seminífero por testículo (Tabela 3), parâmetro este diretamente relacionado ao tamanho do testículo. Porém, uma comparação entre diferentes espécies não é significativa visto a grande variação no tamanho testicular. Assim, o comprimento tubular por grama de testículo é um parâmetro mais

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

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

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

acurado para a comparação interespecífica. O lobo-guará apresenta cerca de 18 metros de túbulo seminífero por grama de testículo (Tabela 3), mesmo valor observado em onça parda (Guião-Leite & Paula, 2003) e próximo ao descrito para a maioria dos animais domésticos de produção (França & Russel, 1998). O gato doméstico apresenta cerca de 23m de túbulo por grama de testículo (Godinho, 1999), denotando maior investimento na produção espermática em gatos domésticos, em relação a estas espécies silvestres, reafirmando diferenças quanto às estratégias reprodutivas (Tabela 4).

CONCLUSÕES

O lobo-guará apresenta pequena alocação do peso corporal em massa testicular, sendo o índice gonadossomático (IGS) de 0,04%, como também observado em espécies que apresentam o comportamento reprodutivo monogâmico. Cerca de 79,3% do parênquima testicular corresponde à túbulo seminíferos, o que exprime um investimento de 0,03% da massa corporal, sendo este o índice tubulossomático, abaixo dos valores encontrados para carnívoros domésticos. Os valores registrados neste estudo encontram-se dentro da amplitude observada para as demais espécies carnívoras já estudadas.

Tabela 4 – Dados comparativos de índice gonadossomático (IGS), índice tubulossomático (ITS), volume, diâmetro e comprimento de túbulo seminífero entre espécies de carnívoros.

	IGS (%)	ITS (%)	Túbulo seminífero (%)	Diâmetro do túbulo (µm)	Comprimento do túbulo (m/g)	Ref
Lobo-guará	0,04	0,03	79,3	227,3	17,9	
Cão doméstico	0,10	0,08	88,2	175,0	17,6	Mascarenhas et al, 2006
Gato doméstico	0,07	0,06	90,0	223,0	23,0	Godinho, 1999
Onça parda	0,03	0,02	78,0	227,3	18,2	Guião-Leite & Paula, 2003

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann R.P (1970) Sperm production rates. In: Johnson, A.D, Gomes, WR, Vandemark, NL (Eds.) The testis. New York, Academic Press. v.1, p.433-482.
- Carvalho CT (1976) Aspectos faunísticos do cerrado – o lobo-guará (Mammalia, Canidae). São Paulo, Instituto Florestal (Boletim técnico). 16p.
- Costa DS, Paula TAR, Matta SLP (2006) The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. Animal Reproduction Science, 91:173-179.
- Courot M, Hochereau-De-Reviers M.T & Ortavant R. (1970) Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR., Vandemark NL. (ed.). The testis. New York, Academic Press. v.1, p.339 – 432.
- Dietz JM (1984) Ecology and Social Organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Smithsonian Contribution to Zoology, 392: 5-50.
- Dixson AF (1993) Sexual selection, sperm competition and the evolution of sperm length. Folia primatologica, 61 : 221 – 227.
- França LR. (1991) Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese de doutorado. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 180p.
- França LR & Russell LD (1998) The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J. (Eds.) Male Reproduction. A multidisciplinary overview. 1ª ed. Madrid, Churchill Communications Europe España. p.197-219.
- Fletcher, N. B.; Rodden, M.; Taylor, S. (1995) (Ed.). Husbandry manual for the maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. Grand Rapides, John Ball Zoological Society Wildlife Conservation Fund, 79 p.
- Godinho CL (1999) Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese de mestrado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 124p.
- Guerra MO (1983) Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. Revista Brasileira de Biologia, 43:385-394.

- Guião Leite FL, Paula TAR (2003) Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça parda (*Puma concolor*). Revista Brasileira de Reprodução Animal, 27: 21-26.
- Guião Leite FL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Neves MTD, Barros JBG (2006) Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*) Animal Reproduction Science, 91:307-316.
- IBAMA (2003). Lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. [On line] Disponível em : <http://www.ibama.gov.br>. [Data de acesso: 26 de março de 2003].
- Kenagy GJ & Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. J Mamm, 67: (1) p. 1-22.
- Mascarenhas RM, Paula TAR, Matta SLP, Lanna LL, Fonseca, CC & Neves, MTD (2006) Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, do período púbere à senilidade. Revista Ceres, 53:106-112 .
- Moreira JR, Macdonald DW, Clarke JR (1997) Correlates of testis mass in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*): dominance assurance or sperm production? Journal of Zoology, 241: 457-463.
- Ortavant R, Courot M.& Hochereau-De-Reviers M.T (1997) Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT (Eds.). Reproduction in domestic animals. New York, Academic Press . p. 203 - 227.
- Paula TAR & Cardoso FM (1994) Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia., 46: 19 – 30.
- Paula TAR & Cardoso FM (1995) Alterações etárias na espermatogênese do cão. II. População celular dos túbulos seminíferos e rendimento espermatogênico. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 47: 535-547.
- Roosen-Runge EC & Giesel Jr LO (1950) Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. American Journal of Anatomy, 87: 1-30.
- Sheldon JW (1992) Wild Dogs: The natural history of the nondomestic canidae.. San Diego, Academic Press, Inc. p. 69-75.
- Wieloch D R, Veado BV & Furtado DB (1997) Cadernos da Fundação Zoo-Botânica I - Animais do Zoológico, Belo Horizonte: Fundação ZooBotânica de Belo Horizonte, Serviço de educação ambiental. p. 235.