



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL- PGCAT

MÁRCIO FRAZÃO CHAVES

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE
DO BRASIL

RECIFE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

MÁRCIO FRAZÃO CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLOGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE
DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical. Área de Concentração- Medicina e Biologia da Conservação.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Geraldo Jorge Barbosa de Moura

RECIFE

2016

MARCIO FRAZÃO CHAVES

**“CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO
BRASIL”**

Tese apresentada ao Programa de Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical. Área de Concentração- Medicina e Biologia da Conservação.

Aprovado em 09 de dezembro de 2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C512c Chaves, Marcio Frazão
Caracterização histológica e biologia reprodutiva de
Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE),
Nordeste do Brasil / Marcio Frazão Chaves. – 2016.
85 f. : il.

Orientador: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira .
Coorientadores: Geraldo Jorge Barbosa de Moura.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical, Recife, BR-PE, 2016.
Inclui referências e anexo(s).

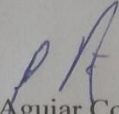
1. Anuros 2. Caatinga 3. Sazonalidade 4. Reprodução
5. Morfometria 6. Corpos gordurosos hormônios sexuais 7. Testículo
8. Ovário I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, orient. II. Moura, Geraldo
Jorge Barbosa de, coorient. III. Título

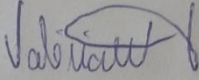
CDD 591.4

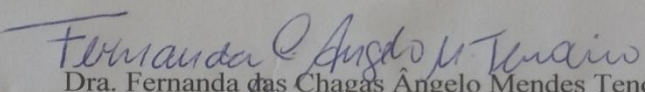
MARCIO FRAZÃO CHAVES

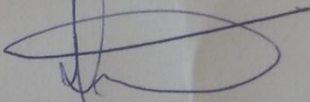
**“CARACTERIZAÇÃO HISTOLOGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE
Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO
BRASIL”**

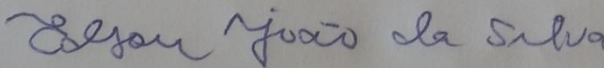
BANCA EXAMINADORA


Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE


Dra. Valéria Wanderley Teixeira
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE


Dra. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE


Dr. Daniel Oliveira Mesquita
Universidade Federal da Paraíba- UFPB


Dr. Edson João da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

RECIFE

2016

*“Quando chove no sertão;O sol deita e a água rola
O sapo vomita espuma;Onde um boi pisa se atola
E a fartura esconde o saco;Que a fome pedia esmola”*

(Cordel do Fogo Encantado)

“Dedico este trabalho a minha família, em especial ao meu filho, minha esposa e meus pais”.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Frutuoso Chaves e Miriam Chaves por todo o esforço e dedicação com a minha educação e conseqüente formação;

A minha esposa Verlúcia de Oliveira Freire Chaves, por todo seu amor, atenção, carinho, cuidado, apoio, compreensão, e por todo o auxílio dado durante esses anos.

Ao meu filho Miguel pela alegria e por todo amor que tem comigo tornando os meus dias mais felizes;

Aos professores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira pela oportunidade, confiança, incentivo, companheirismo e amizade.

A minha amiga, Professora Betânia Guilherme, pela paciência, carinho, incentivo e por todos os dias de convívio durante o doutorado.

Ao meu amigo, Dr. Geraldo Jorge pelo exemplo de profissional e por toda a ajuda dedicada a este trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical pela oportunidade dispondo assim, do local para a realização deste trabalho;

Ao corpo de professores do PGCAT, em especial a Marleyne Accioly e Anísio Soares por toda atenção e ajuda durante este doutoramento.

Aos professores e amigos do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Campina Grande *campus* de Cuité por toda a ajuda e compreensão durante os anos deste doutorado.

As minhas amigas Flávia Lins e Fernanda Ângelo pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao amigo Josemberg Baptista por toda a ajuda e incentivo dado a este trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Histologia: Franklin Magliano, Thiago Alves, Carolina Guimarães, Cintia, Hilda, Ismaela, Welma, Clóvis e Lécio Leoni por toda paciência e amizade que sempre tiveram comigo e que por muitas vezes se prontificaram a ajudar e colaborar com este projeto. À eles toda a minha gratidão;

Aos amigos do LEHP: Paulo Matheus, Ricardo Nagô, Marcos Freitas, Midiã Rodrigues, Stephenson Abrantes, Leonardo Oitaven, Adilson, Vitor, Elizandra pelos bons momentos em Recife, parcerias e conversas agradáveis.

Aos meus alunos do LABAN por toda a ajuda nas coletas e pela confiança e muitas vezes paciência nos meus momentos de ausência.

Aos meus amigos Igor Santos, Giva Brito e Renner Leite por todo apoio nos momentos mais cansativos e por toda a amizade e ajuda dedicada.

Aos meus amigos de copo e de cruz Daniel Mesquita, Tony Holanda e Pablo Riul pelos conselhos, boas conversas, cervejas e por toda a ajuda dedicada desde o início da minha graduação em Ciências Biológicas.

Aos meus companheiros de turma de pelos momentos compartilhados em cada disciplina.

Aos professores componente da banca de defesa por aceitarem participar deste importante momento de minha formação.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Aspectos sobre a reprodução animal são altamente diversos e complexos. A existência de uma série de estratégias reprodutiva podem ter evoluído com a finalidade de maximizar o *fitness*, evitar a predação, concorrência ou simplesmente estão relacionadas às condições ambientais. Em ambientes com características de semi-árido, a temperatura do ar e a umidade relativa relacionadas ao índice pluviométrico determinam o padrão reprodutivo dos anfíbios anuros. Nesta perspectiva características anatômicas e morfológicas do sistema reprodutor de *Leptodactylus macrosternum* correlacionadas a fatores climáticos, permitem avaliar o aspecto reprodutivo desta espécie ampliando o conhecimento da biologia reprodutiva dos anuros neotropicais. Desta forma, este trabalho objetiva descrever o ciclo reprodutivo anual da espécie *L. macrosternum* com base nos parâmetros, morfológicos das gônadas e corpos gordurosos, histológicos e morfométricos das gônadas e produção de hormônios sexuais e suas relações com as circunstâncias ambientais na área de estudo. Este trabalho foi realizado na área do Horto Florestal Olho d'água da Bica (HFODB), fragmento de área de caatinga situado no município de Cuité, estado da Paraíba. Os animais foram capturados quinzenalmente, através de coleta ativa, entre os meses de janeiro a dezembro de 2013. Para a determinação da dinâmica reprodutiva e energética da espécie baseado na morfologia das gônadas e corpos gordurosos, os valores de peso corporal (WT), peso das gônadas (WG), peso do fígado (WF) e peso dos corpos gordurosos (WFB) foram utilizados para os cálculos da relação gonadossomática [$RGS = WG(100)/WT$], hepatossomática [$RWF = WH(100)/WT$] e lipossomática [$RFB = WFB(100)/WT$] e Fator de Condição [$K1 = W/Lb$]. As gônadas foram estes foram fixados em solução Bouin por 24 horas e depois desidratados em série crescente de álcool com inclusão procedida em parafina e secções transversais de 5 μm e corados a posteriori com Hematoxilina e Eosina. A identificação dos tipos celulares ovocitários e quantificação dos tipos celulares ovocitários e testiculares foi procedida em microscópio convencional, trinocular e de bancada, acoplado a um sistema digital de aquisição de imagem. Para a avaliação das possíveis alterações nos aspectos histológicos dos ovários, foi procedida a quantificação dos tipos de ovócitos realizada através do método de densidade populacional numa área teste de 88mm². A avaliação das possíveis alterações nos aspectos histológicos e morfométricos dos testículos foram realizadas através da análise estereológica para a determinação da densidade das espermátides primária, secundária e espermatozóides calculada através da densidade de volume destes tipos celulares. Para a quantificação da densidade de perfis (Q_A , espermátides primárias, secundárias e espermatozoides) foram

contados respectivamente 14, 5 e 6 campos em uma Área Teste (AT) com 0,044 mm² para cada animal de cada grupo de estudo. O resultado final (mm²) foi adquirido após utilização da média para cada perfil e aplicação da seguinte fórmula: $Q_A = \sum \text{perfis} / A_T$. A análise hormonal foi realizada através da quantificação das dosagens dos níveis de progesterona e estrogênio para as fêmeas através do método ELIZA. Os dados meteorológicos mensais de temperatura (°C), e pluviosidade (mm) foram adquiridos através do banco de dados do Centro de Agência Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESA). Os resultados obtidos para as variáveis RGS, RGH, RFB e K1 ao longo dos meses de coleta foram submetidos à comparação sazonal, pela aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1999). A correlação existente entre essas variáveis foi também testada pela aplicação do Coeficiente de Correlação de Spearman. Os valores da densidade das células da linhagem reprodutiva, RGS, níveis de progesterona e estrogênio foram analisados relativamente aos meses pelo teste de Kruskal- Wallis. A dependência entre as variáveis climáticas (pluviometria e temperatura), densidade dos ovócitos III e ovócitos IV foi verificada por meio do teste de regressão linear simples. Os valores da densidade das espermatídes primária, secundária e espermatozóides foram analisados entre os meses pelo teste Kruskal- Wallis. A dependência entre as variáveis climáticas (pluviometria e temperatura), a densidade da população das espermatídes primária, secundária e espermatozóides foram verificadas por meio do teste de Regressão Linear Simples. Apenas entre os meses de maio-agosto e novembro-dezembro foram realizados registros e conseqüentemente capturas. A variação dos valores da Relação Gonadossomática (RGS), Hepatossomática (RWF), Lipossomática (WFB) e Fator de Condição (K1) foi verificada ao longo dos meses de coleta. A densidade populacional dos tipos de ovócitos e os valores da demonstraram dependência com a variação do regime de chuvas e temperatura da região, também determinando para a espécie um curto período reprodutivo, concentrados entre os meses de maio e junho de 2013. Os valores mensais das densidades das espermatídes primária, espermatídes secundária e espermatozoides apresentaram variações significativas ao longo dos meses de coleta demonstrando também, dependência com a variação do regime de chuvas e temperatura da região. Através da observação do processo de maturação dos gametas, bem como a observação da variação dos valores de K1, RGS, RWL, RFB e dos valores médios de estrógeno e progesterona nos animais coletados, bem como as suas relações com as variáveis climáticas da área demonstram para *L. macrosternum* uma curta atividade reprodutiva, provavelmente concentrada nos meses de junho, julho e dezembro de 2013 sendo coerente afirmar que a espécie apresenta um ciclo reprodutivo típico de ambientes tropicais sazonais do tipo “potencialmente contínuo”.

Palavras chave Anuros; Caatinga; Sazonalidade; Reprodução; Morfometria; Corpos Gordurosos Hormônios Sexuais; Testículo; Ovário

ABSTRACT

Aspects of animal breeding are highly diverse and complex. The existence of a number of reproductive strategies may have evolved in order to maximize the fitness avoid predation, competitors or are simply related to environmental conditions. In environments with semi-arid characteristics, the air temperature and relative humidity related to pluviometric index determine the reproductive pattern of amphibians. In this perspective anatomical and morphological characteristics of the reproductive system of *Leptodactylus macrosternum* correlated to climatic factors, enable the assessment of reproductive behavior of this species expanding the knowledge of the reproductive biology of neotropical frogs. Thus, this study aims to describe the annual reproductive cycle of the species *L. macrosternum* based on these parameters: morphology of the gonads and fatty bodies, histology and morphometry of the gonads and production of sex hormones and its relation to environmental conditions in the studied area. This work was carried out in the area of Horto Florestal Olho d'água da Bica (HFODB), caatinga area fragment in the municipality of Cuité, state of Paraíba. The animals were captured fortnightly through active collecting, between the months of January to December 2013. For the determination of the reproductive and dynamic energy of the species based on morphology of the gonads and fatty bodies, body weight values (WT), the weight of the gonad (WG), liver weight (WF) and weight of fatty bodies (WFB) were used for the calculation of gonadosomatic relation [$RGS = WG (100) / WT$],hepatosomatic [$RWF = WH (100) / WT$] and liposomal [$RFB = WFB (100) / WT$] and condition factor [$K1 = W / lb$]. The gonads were fixed in Bouin solution for 24 hours and then dehydrated in ascending series of alcohol proceeded embedded in paraffin and 5 μm cross-sections were obtained and subsequently stained with hematoxylin and eosin. The identification of oocyte cell types and quantification of oocyte and testicular cell types was preceded in conventional bench microscope, trinocular and coupled to a digital system of image acquisition. To assess possible changes in the histology of the ovaries, it was proceeded the quantification of the types of oocytes performed by the density method in a test area of 88mm^2 . The evaluation of possible changes in histology and morphometric of the testes was performed by stereological analysis for determining the density of primary spermatids, secondary and sperm volume calculated from the density of these cell types. To quantify the density

profiles (QA, primary spermatids, secondary and sperm) were counted respectively 14, 5 and 6 fields in a test area (AT) with 0.044 mm^2 for each animal in each study group. The final result (mm^2) was acquired after the utilization of the mean value for each profile and applying the following formula: $QA = \Sigma \text{profile} / AT$. Hormone analysis was performed by quantifying the dosages of progesterone and estrogen levels in females by ELIZA method. The weather temperature monthly data ($^{\circ} \text{C}$) and rainfall (mm) were acquired through the database of Center's of Agency Executives of State of Paraiba Water Management (EFSA). The results for RGS variables, RGH, RFB and K1 over the months of collection were subjected to seasonal comparison, by the application of non-parametric Kruskal-Wallis test (Zar, 1999). The correlation between these variables was also tested by applying the Spearman correlation coefficient. The values of the density of cells in the reproductive lineage, RGS, progesterone and estrogen levels were analyzed for the months by Kruskal-Wallis test. The dependence between climate variables (rainfall and temperature), density of oocytes III and IV was verified by the simple linear regression test. The values of the density of primary spermatids, secondary and sperm and testosterone levels were analyzed between the months by Kruskal-Wallis test. The dependence between climate variables (rainfall and temperature), the population density of spermatids primary, secondary and sperm were assessed using the simple linear regression test. Only in the months from May to August and November to December records and therefore catches were made. The variation in values of the gonadosomatic (RGS), hepatosomatic (RWF), liposomal (WFB) ratio and Condition Factor (K1) over the months of collection. The population density of the types of oocytes and the demonstrated dependence values to the variation in rainfall and temperature of the region, also determining for the species a short breeding season, concentrated between the months of May and June 2013. The monthly values of the densities of the primary spermatids, secondary spermatids and sperm showed significant variations over the months of collection demonstrating also dependence on the variation in rainfall and temperature of the region. By observing the gamete maturation process as well as the observation of changes in K1 values, RGS, RWL, RFB and the average values of estrogen and progesterone in animals collected, as well as their relationship with climatic variables area demonstrate to *L. macrosternum* a short reproductive activity, probably concentrated in the months of June, July and December 2013, being consistent to contend that the species has a typical reproductive cycle of seasonal tropical environments such as "potentially continuous".

Keywords: Anura; Caatinga; seasonality; Reproduction; morphometry; Fatty bodies;
Sex Hormones; Testis; Ovary

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Introdução Geral..... | 1 |
| Revisão da Literatura..... | 3 |
| Ordem Anura..... | 3 |
| Biologia reprodutiva dos anuros..... | 4 |
| A caatinga e sua fauna de anfíbios..... | 6 |
| <i>Leptodactylus macrosternum</i> (Miranda-Ribeiro, 1926)..... | 9 |
| A área de estudo..... | 10 |
| Objetivo Geral..... | 14 |
| Objetivos Específicos..... | 14 |
| Referências..... | 15 |
| CAPÍTULO 1- Correlações do fator de condição (K1) e das relações gonadossomáticas, hepatossomáticas e lipo-somáticas de <i>Leptodactylus macrosternum</i> (Anura, Leptodactylidae) no semiárido brasileiro..... | 24 |
| Abstract..... | 25 |
| Resumo..... | 26 |
| Introdução..... | 27 |
| Material e Métodos..... | 29 |
| Área de estudo..... | 29 |
| Procedimento de campo e laboratório..... | 30 |
| Cálculos do fator de condição (K1), relação gonadossomática (RGS), hepatossomática (RWL) e lipossomática (RFB)..... | 31 |
| Dados climáticos..... | 32 |
| Análise dos dados..... | 32 |
| Resultados..... | 32 |
| Discussão..... | 37 |
| Conclusão..... | 40 |
| Referências..... | 40 |
| CAPÍTULO 2- Biologia reprodutiva de fêmeas de <i>Leptodactylus Macrosternum</i> (Anura, Leptodactylidae)..... | 45 |
| Abstract..... | 46 |
| Resumo..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| Introdução..... | 48 |
| Material e Métodos..... | 49 |
| Área de estudo e amostragem..... | 49 |
| Análise Histológica..... | 50 |
| Dosagem hormonal..... | 51 |
| Análise dos dados..... | 51 |
| Resultados..... | 52 |
| Discussão..... | 56 |
| Referências..... | 59 |
| CAPÍTULO 3- INFLUENCIA DA PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA NA ESPERMATOGÊNESE DE <i>Leptodactylus macrosternum</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE)..... | 63 |
| Abstract..... | 64 |
| Resumo..... | 66 |
| Introdução..... | 67 |
| Material e Métodos..... | 68 |
| Área de estudo e amostragem..... | 68 |
| Procedimento de laboratório..... | 70 |
| Análise estereológica para a determinação da densidade das espermatídes espermatozóides..... | 70 |
| Análise dos dados..... | 71 |
| Resultados..... | 71 |
| Discussão..... | 75 |
| Referências..... | 78 |
| Considerações Finais..... | 82 |
| Anexos..... | 83 |

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Exemplar de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926).....09

Figura 2. Localização da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) situado no município de Cuité, estado da Paraíba e distribuição dos corpos d'água no interior da área de coleta, Cuité-Paraíba. A1 – área 1; A2 – área 2 e A3 – área 3.....11

Figura 3- Vista frontal da lagoa correspondente a área 1 localizado da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba.....12

Figura 4- Vista frontal da lagoa correspondente a área 2 localizado da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba.....13

Figura 5- Vista frontal da lagoa correspondente a área 1 localizado da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba.....13

CAPÍTULO I

Figura 1 - Localização dos pontos de amostragem de *L. macrosternum* inseridos na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), Município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil; entre janeiro a dezembro de 2013.....30

Figura. 2- A- *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926). (Legenda: B- Vistaventral de fêmea; O- Oócitos; Ov- Ovários; C- Vistaventral de macho; Te- testículos, Li- fígado, Fb- corpos gordurosos).....31

Figura 3- Relação peso total /comprimento dos indivíduos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil, no período de maio a dezembro de 2013.....33

Figura 4- Média e desvio padrão do fator de condição (K1), da Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatossomática (RWL) e da Relação Lipossomática (RFB) de machos de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) e variação climatológica - Precipitação (Prec, mm) e variação média da temperatura mensal (°C) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil, no período de maio a dezembro de 2013. (Legenda- * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p < 0,05$).....34

Figura 5- Média e desvio padrão do fator de condição (K1), da Relação

Gonadossomática (RGS), Relação Hepatosomática (RWL) e da Relação Lipossomática (RFB) de fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) e variação climatológica - Precipitação (Prec, mm) e variação média da temperatura mensal (°C) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil, no período de maio a dezembro de 2013. (Legenda- * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p < 0,05$).....35

CAPÍTULO 2

Figura 1- Localização dos pontos de amostragem de *L. macrosternum* inseridos na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), Município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil; entre janeiro a dezembro de 2013.....50

Figura 2. Cortes histológicos corado em HE dos ovários de *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba- Brasil. [A- Corte transversal do ovário de *Leptodactylus macrosternum* (H/E); Ovogônias (Og), ovócitos I (Ov1), ovócitos II (OV2), ovócitos III (Ov3) e ovócito IV (Ov4); B- Detalhe do ovócito I (Ov1), *- núcleo; Detalhe do ovócito II (Ov2), *- núcleo, --- cromossomos dispersos na periferia da carioteca; Detalhe do ovócitos III, *- núcleo, nuc- nucléolo; C- Detalhe do ovócito IV(Ov4), PA- pólo animal, PV- pólo vegetal, n- núcleo, nuc- nucléolo.].....53

Figura 3 –A- Valores mensais (média e erro padrão) dos níveis de estrógeno (pg/mL) e; B- progesterona (pg/mL) de fêmeas da espécie *Leptodactylu*

smacrosternum coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba-Brasil.....55

CAPÍTULO 3

Figura 1- Localização dos pontos de amostragem de *L. macrosternum* inseridos na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), Município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil; entre janeiro a dezembro de 2013.....69

Figura 2- Cortes histológicos corado em HE do testículo de *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba-Brasil. [A- Corte em 4x; TA- túnica albugínea, Med- mediastino; B- Corte em 40x; St1-espermátide primária, ST2- espermatide secundaria, Sp1- espermatócito primário; C- Corte em 40x; Sg1- espermatogônia primária, SG2 espermatogônia secundaria, Sp2 espermatócito secundário, Z espermatozóides; D- Corte em 40x; * lumen com espermatozóides.].....73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Coeficiente de correlação de Spearman comparando o Fator de Condição (K1) com as variáveis Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatossomática (RWF), Relação Lipossomática (WFB) de machos e fêmeas da espécie de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil no período de maio a dezembro de 2013.....36

Tabela 2- Relações entre as variáveis: Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatossomática (RWF), Relação Lipossomática (WFB) e Fator de Condição (K1) com a variação climática (pluviosidade- Pluv. E temperatura- Temp.) de machos e fêmeas da espécie de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil no período de maio a dezembro de 2013..... 37

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Valores mensais (média e erro padrão) da densidade populacional (mm^2) de células presentes nos ovários da espécie *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba- Brasil. N- número mensal de fêmeas; Og- ovogônias; Ov1- ovócitos I; Ov2- ovócitos II; Ov3-ovócitos III; Ov4- ovócito IV.
*valores estatisticamente significativos.....54

Tabela 2 – Relações entre a densidade populacional de ovogônia (Og); ovócito I (Ov1); ovócito II (Ov2); ovócito III (Ov3) e ovócito IV (Ov4) em fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* em relação a precipitação e a temperatura na área do Horto Florestal Olho d'Água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013. *valores estatisticamente significativos.....56

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Valores mensais (média e erro padrão) densidade das espermatídes primária (St1), espermatídes secundária (St2), espermatozóides (Ez) (mm^2) e área locular (μm^2) dos testículos da espécie *Leptodactylus macrosternum* coletados na área do HFOB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013. *=valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$, Kruskal- Wallis).....74

Tabela 2- Relações entre a densidade dos espermatócitos primário (St1), espermatócitos secundário (St2), espermatozóides (Ez) e a área ocupada pelos lóculos seminíferos (AL) de machos da espécie *Leptodactylus macrosternum* em relação a pluviometria e a temperatura na área do Horto Florestal Olho d'Água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013. *=valores estatisticamente significativos.....75

LISTA DE ABREVIATURAS

HFODB = Horto Florestal Olho D'água da Bica

K1= Fator de condição

RGS= Relações Gonadossomáticas

RWL= Relações Hepatossomáticas

RFB= Relações Lipossomáticas

IBAMA= Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LABAN= Laboratório de Biossistemática de Anuros

O= Óvulos

Ov= Ovários

Te= testículos

Li= fígado

Fb= corpos gordurosos

CRC= Comprimento rostro cloacal

WT= Peso total

WG= Peso das gônadas

WL= Peso do fígado

WFB= Peso dos corpos gordurosos

AESA= Agência Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba

HE= Hematoxilina e Eosina

ELISA= Ensaio imunoenzimático absorvente

Og= Ovogônias

Ov1= ovócitos I

Ov2= ovócitos II

Ov3= ovócitos III (Ov3)

Ov4= ovócito IV

nuc= nucléolo

PA= pólo animal

PV= pólo vegetal

n= núcleo

TA= túnica albugínea

Med= mediastino

St1= espermátide primária

ST2= espermatide secundaria

Sp1= espermatócito primário

Sg1= espermatogônia primária

SG2= espermatogônia secundaria

Sp2= espermatócito secundário

Z=espermatozóide

Introdução Geral

Aspectos sobre a reprodução animal são altamente diversos e complexos (LEONARD, 2010). A existência de uma série de estratégias reprodutiva podem ter evoluído com a finalidade de maximizar o *fitness*, evitar a predação, concorrência ou simplesmente estão relacionadas às condições ambientais específicas (HADDAD; PRADO, 2005; TABORSKY; BROCKMANN, 2010; TOLEDO ET AL., 2012).

Em áreas abertas às condições físicas do ambiente que mais interferem na atividade reprodutiva dos anuros são a temperatura do ar e a umidade relativa estritamente relacionada ao índice pluviométrico determinando o padrão reprodutivo dos anfíbios anuros (JIM, 1980; SASSO-CERRI et al., 2004). Durante a época de estiagem, as espécies de anuros que ocorrem nestas regiões apresentam mecanismos fisiológicos (controle hormonal) e comportamentais (vocalização, comportamento de estiva) às altas temperaturas e escassez de água nos corpos aquáticos (ABE, 1995). Nesses ambientes onde a sazonalidade é expressiva, os animais estão reprodutivamente ativos por dois ou três meses durante o ano (PRADO et al., 2000; BERTOLUCI; RODRIGUES, 2002; RODRIGUES, 2003), período este determinados pelo aumento nas taxas de pluviosidade da região. A associação destes fatores climáticos ao ritmo endógeno destes animais é responsável pelo controle dos processos de gametogênese em diversas espécies de anuros neotropicais (CEI et al., 1996; SASSO-CERRI et al., 2004), determinando a época favorável do ano em que os anuros se mantêm ativos, bem como a sua distribuição estacional (DUELLMAN; TRUEB, 1994; MOORE, 2005).

Sendo marcado pelo clima semi-árido, o domínio morfoclimático da Caatinga ocupa aproximadamente 800.000 Km², apresentando imprevisibilidade da distribuição temporal e espacial das chuvas, agravado por temperaturas anuais elevadas e relativamente constantes, variando entre 24 e 29°C (RODRIGUES, 2003; AB'SABER, 2005). Os totais de precipitação variam muito

anualmente e, em intervalos de dez a vinte anos, diminui para menos de metade da média (menos de 1.000 mm por ano), muitas vezes durante três a cinco anos seguidos, fenômeno conhecido como a "seca" (VELLOSO et al., 2002).

Neste sentido, a compreensão destes padrões e dos diferentes fatores e suas relações com a biologia reprodutiva destes animais em áreas de caatinga forcem informações que podem complementar o entendimento dos princípios de estruturação das comunidades de anuros em seus ecossistemas (BIONDA et al., 2011). De uma maneira geral, estes princípios de ecologia de comunidades são baseados em informações relativas à dinâmica de populações e de comunidades, que visam entender a distribuição de grupos de espécies, suas relações internas e com o meio, como as principais fontes de estruturação. A compreensão de tais padrões é uma ferramenta primária e essencial para estudos mais aplicados, voltados ao levantamento, conservação e manejo da biodiversidade (HOCKEY; CURTIS, 2009).

Nesta perspectiva, o conhecimento sobre a biologia reprodutiva de anuros apresenta um caráter de alta importância, uma vez que estas populações possuem uma alta especificidade microambiental e pequena capacidade de adequar-se a interferência humana torna-se extremamente vulneráveis às mudanças ambientais (SCHLAEPFER; GAVIN 2001; VITT; CALDWELL, 2001).

Revisão da Literatura

Ordem Anura

Na composição da biodiversidade, os anfíbios formam grupos especialmente sensíveis as alterações ambientais devido ao seu comportamento biológico, atributos fisiológicos e características ecológicas, como por exemplo, ciclo de vida bifásico e respiração cutânea (BLAUSTEIN et al., 1995). Esses animais necessitam de uma relativa estabilidade ambiental por serem dependentes de dois habitats diferentes simultaneamente: o aquático e o terrestre. Impactos gerados em qualquer desses ambientes inviabiliza sua população.

No mundo são conhecidas atualmente 7.546 espécies de anfíbios, destas 6.640 são da Ordem Anura (FROST, 2016), distribuídas principalmente nos trópicos e regiões temperadas. Ocorrem também em algumas ilhas oceânicas, especialmente aquelas ao sul do Oceano Pacífico e nos desertos, dos mais brandos aos mais extremos (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Para o Brasil são conhecidas 1026 espécies de anuros distribuídas em 19 famílias (SEGALLA et al, 2014; FROST, 2016), o que torna o país o mais diverso do mundo para o grupo.

A ordem Anura é constituída pelos sapos, rãs e pererecas e correspondem o grupo de anfíbios com maior representatividade (FROST, 2016). São animais caracterizados por serem anfíbios desprovidos de cauda, com algumas modificações estruturais voltadas para o salto como os membros posteriores alongados, tibia e fíbula fundidas proximal e distalmente e pé alongado devido ao alongamento dos elementos tarsais proximais. A coluna vertebral consiste de cinco a nove vértebras pré-sacrais, todas suportando processos transversos, exceto a primeira, o atlas, a menos que esteja fundida à segunda vértebra. As costelas são livremente associadas ou fundidas à segunda, terceira e quarta vértebras pré-sacrais. As vértebras pós-sacrais encontram-se fundidas ao cóccix, formando o uróstilo (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

Também é característico para a grande maioria das espécies pertencentes a ordem Anura o seu desenvolvimento ontogenético passando por um estágio larval denominado girino, que pode envolver até 46 estágios de desenvolvimento (GOSNER, 1960) onde a presença de corpos aquáticos e de temperaturas favoráveis determinam o desenvolvimento dos anfíbios em seus ambientes (CARDOSO; HADDAD, 1992).

Desta forma, as dependências de água, de temperaturas adequadas bem como um elevado nível de umidade determinam a distribuição e ocorrência da maioria das espécies de anuros. As áreas úmidas evitam a dessecação do animal, possibilitam a realização das trocas gasosas através da pele (respiração cutânea), além de propiciar três condições adequadas para reprodução do grupo. (DUELLMAN; TRUEB 1994; WELLS, 2007). Logo, de uma maneira geral, os anfíbios requerem múltiplas condições do habitat ao longo do seu ciclo de vida (GUERRY; HUNTER JR, 2002), incluindo corpos d'água adequados para reprodução, desenvolvimento larval, além de locais terrestres para crescimento, forrageamento, hibernação e dispersão dos adultos (KNUSTON et al., 1999, PRICE et al., 2004; BALDWIN et al., 2006).

Biologia reprodutiva dos anuros

Grande parte dos estudos que sobre aspectos sobre a biologia reprodutivas dos anuros de abordam aspectos comportamentais destes animais em seus ambientes. Trabalhos realizados por Wells (1978); Fellers (1979); Woodward (1986); Ryan (1985); Bastos; Haddad (1995); Martins et al. (1998) demonstram vários aspectos de seleção sexual em anfíbios anuros abordando características morfológicas e comportamentais, como o comprimento rostro-cloacal, vocalizações e o número de noites de participação no coro, no sucesso reprodutivo dos machos. Alguns trabalhos realizados demonstram os sistemas de acasalamento dos anuros baseados nos processos de competição entre machos nos coros reprodutivos (WELLS, 1977; ARAK, 1983; RYAN, 1985; ROBERTSON, 1986; MARTINS et al., 1998) e interações agressivas (HOWARD, 1978; WELLS,

1978; FELLERS, 1979; KREBS, 1982; HADDAD, 1992; SCHWARTZ, 1993). Outros estudos apontam estratégias comportamentais alternativas de acasalamento para machos menos aptos (PERRIL et al., 1978; FORESTER; LYKENS, 1986; HADDAD, 1992), onde estes adotam uma postura submissa e imóvel próximo ao macho dominante, seja para interceptar fêmeas que se aproximem do macho cantor ou esperar que áreas de corte sejam desocupadas.

As estratégias de acasalamento em anfíbios são determinadas principalmente pela temperatura e precipitação (CARDOS; MARTINS, 1987). Desta forma, os anuros apresentam dois padrões temporais de acasalamento (WELLS, 1977). Reprodução explosiva, característica por uma atividade reprodutiva em curto período de tempo e prolongada, caracterizado por atividades reprodutivas em um longo espaço temporal. Esses padrões determinam os modos reprodutivos em anuros (MAGNUSSON; HERO, 1991; HADDAD; PRADO, 2005; TABORSKY et al., 2008; TABORSKY; BROCKMANN, 2010). Duellman; Trueb (1994) e posteriormente Haddad, Prado (2005) definiram 29 modos reprodutivos aceitos para anuros, que vão de espécies que possuem modos mais generalizados, onde os ovos são depositados em ambientes aquáticos, a de espécies com modos mais especialistas, incluindo a deposição de ovos em ambiente terrestre, em folhas e em ninhos de espumas flutuantes.

Somando os padrões comportamentais as características histológicas das gônadas, os ciclos reprodutivos de anuros foram explorados e classificados por Lofts (1974), em: contínuo, potencialmente contínuo e descontínuo. Os ciclos “descontínuos”, típicos de zonas climáticas temperadas, apresentam um discreto período de reprodução com pronunciadas mudanças no tamanho das gônadas, produção de gametas e estruturas sexuais acessórias. Típicos de regiões tropicais, os ciclos “potencialmente contínuo” e “contínuo” são caracterizados pela produção constante de gametas. No ciclo “potencialmente contínuo” ocorre uma interrupção parcial da gametogênese.

Estudos que foram desenvolvidos com o objetivo de descrever histologicamente os testículos dos anuros (TABOGA; DOLDER, 1991; OLIVEIRA et al, 2002; OLIVEIRA et al.,

2003a; 2003b; PRADO; HADDAD, 2003; SANTOS; OLIVEIRA, 2007; FERREIRA et al., 2008; FERREIRA et al 2009; SANTOS et al. 2012; FERREIRA; MEHHANA, 2012, LEIVAS et al., 2012; VILLAGRA et al, 2012; VILLAGRA et al., 2014) evidenciam a espermatogênese de forma cística, ou seja, as células germinativas ocorrem em grupos organizados e definidos. Cada cisto possui células no mesmo estágio de diferenciação e, no túbulo seminífero, podemos encontrar vários cistos em estágios diferentes ou em estágios semelhantes, dependendo do tipo do ciclo reprodutivo de cada espécie (HERMOSILLA et al., 1983; OLIVEIRA et al., 2003a; 2003b).

Já os trabalhos que buscam a descrição histológica dos ovários (LOFTS, 1974; HERMOSILLA et al., 1983; COSTA et al. 1998; OLIVEIRA; ANDRADE, 1997; PRADO et al. 2002; OLIVEIRA; SANTOS, 2004; AZZOUZI; TEKAYA, 2007; MARAGNO; CECHIN, 2009; HACZKIEWICZ; OGIELSKA, 2013) apontam este órgão como estruturas saculares e lobuladas com um epitélio germinativo que confere a gônada uma capacidade cíclica para ploriferação e diferenciação dos gametas em grandes quantidades. As fêmeas próximas a ovoposição apresentam ovários aumentados e com intensa atividade vitelogênica, com proporcional aumento do complexo folícula-ovocitário (HERMOSILLA et al. 1986).

A caatinga e sua fauna de anfíbios

As Florestas Estacionais são o tipo de florestas tropicais mais ameaçados no mundo (JANSEN, 1997), restando atualmente 2% da cobertura original, a qual se encontra totalmente fragmentada (WERNECK; COLLI, 2006). Dentre as ameaças a esta fitofisionomia estão à alta fertilidade do solo e o relevo suave, propício à agricultura e a criação extensiva de gado, bem como a ocorrência de árvores de grande interesse econômico (MURPHY; LUGO 1986; PRADO; GIBBS, 1993).

A caatinga propriamente dita é uma vegetação seca que perde as folhas durante a estação de estiagem (ROSS, 1998). O domínio das depressões interplanálticas semiáridas do Nordeste é

revestido por diferentes tipos de caatingas com fraca decomposição da necromassa vegetal, frequentes afloramentos rochosos, solo pedregoso, drenagens intermitentes e numerosos campos de inselbergs (AB'SÁBER, 1970). As precipitações nas depressões interplanálticas correspondem a médias que variam entre 200 e 700 mm e as temperaturas médias anuais estão na ordem de 25° – 27 °C. A forte deficiência hídrica sazonal faz com que o período úmido seja do tipo sub-úmido e que o período seco seja quase que totalmente árido, implicando num período seco de cinco a sete meses a cada ano e típico de regiões semiáridas ou sub-desérticas (AB'SÁBER, 1977).

Além da evidente relação positiva entre a cobertura vegetal regional e o aumento do número de espécies, também é importante reconhecer quais atributos numa escala local, restrita às características dos corpos d'água, que são bons preditores da riqueza de espécies e da presença de uma determinada espécie (HAZELL et al., 2001). Portanto, numa escala local, restrita aos tipos de corpos d'água mais importantes na manutenção da riqueza de anuros, corpos d'água temporários com hidroperíodo intermediário a longos (BABBITT, 2005, BURNE; GRIFFIN, 2005, WEYRAUCH; GRUBB JR, 2004) comportam maior número de espécies. O aumento da quantidade da vegetação no interior do corpo d'água também é importante no aumento da riqueza de espécies, pois o número de micro-habitats aumenta e, conseqüentemente, aumenta a probabilidade de uma poça suportar um número adicional de espécies (BURNE; GRIFFIN, 2005).

No Nordeste brasileiro, em locais com características de semi-árido são conhecidas atualmente 48 espécies de anfíbios anuros (RODRIGUES, 2003), porém com o elevado número de novas espécies publicadas para o Brasil nos últimos dez anos, é possível que este número esteja subestimado (SBH, 2014). A Caatinga é um dos domínios morfoclimáticos mais pobremente amostrados em relação à anurofauna (LEWINSSOHN; PRADO, 2002; ABRANTES et al., 2011). Com base em estudos pontuais, conhecemos até o momento, para as áreas xeromórficas, 51 espécies de anfíbios, sendo 48 espécies de anuros e três são cecílias (BORGES – NOJOSA; ARZABE, 2005). Na Paraíba, Rodrigues (2003) relatou a presença de 19 espécies típicas de caatinga. Vieira et, al. (2007) registraram 16 espécies de anfíbios anuros para a região do cariri

paraibano e mais recentemente Abrantes et al. (2011), publicou o registro 17 espécies para a região do curimataú paraibano. Estes trabalhos demonstram a carência de estudos com amostragens representativas das comunidades de anfíbios em áreas de caatinga, e levando em conta o caráter da cobertura geográfica, existem ainda importantes lacunas de conhecimento a serem preenchidas (RODRIGUES, 2003).

Alguns autores (HEYER, 1990; RODRIGUES 2003, LEWINSHON; PRADO 2002; VIEIRA et al. 2007; ABRANTES et al. 2011) justificam a carência de informações sobre a anurofauna das áreas de Caatinga a falta de revisões sobre sistemática de anuros neotropicais, a carência de informações naturalísticas sobre esta área, como também a falta de informações sobre os aspectos reprodutivos de anuros nestes ambientes (SANTOS; OLIVEIRA, 2007). Segundo estes mesmo autores, as imprevisibilidades das chuvas nas regiões de semi-árido dificultam a execução de estudos ecológicos sobre as comunidades de anuros desta nesta região. Muitas espécies são ativas unicamente durante o período de chuvas e estas são muito irregulares nessa região, tornando difícil o planejamento das pesquisas (HEYER, 1990; RODRIGUES 2002, LEWINSHON; PRADO 2002; VIEIRA ET AL. 2007).

Desta forma, levando-se em consideração a importância deste grupo na manutenção e equilíbrio dos ambientes e considerando a escassez de informações referentes ao conhecimento dos padrões reprodutivos e suas relações com o ambiente Caatinga, estudos que visam avaliar os aspectos reprodutivos de espécies de anuros destas áreas são de extrema importância, pois não só serão levantadas informações sobre os aspectos ecológicos das taxocenoses de anfíbios, como também promover a criação de modelos biológicos que poderá gerar alternativas para um melhor manejo e exploração desta região. Além disso, contribuem com informações relevantes para a tomada de decisões que visem tanto à conservação e o manejo adequado das comunidades de anuros e em áreas de semi-árido onde estas espécies ocorrem (SCHLAEPFER; GAVIN 2001; VITT; CALDWELL, 2001).

***Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926)**

Pertencente a ordem Anura, a família Leptodactylidae é representada por 99 espécies distribuídas em quatro gêneros (*Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*), sendo *Leptodactylus* o mais numeroso, composto por 88 espécies (FROST, 2016). Destas, destaca-se *Leptodactylus macrosternum* (Figura 1), espécie amplamente distribuída em toda a América do Sul, a leste dos Andes, ocorrendo da Venezuela à Argentina, incluindo o Brasil (HEYER, et al., 2010; FROST, 2016).



Figura 1. Exemplar de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926).

Popularmente conhecida como “rã manteiga”, *L. macrosternum* é uma rã de grande porte em relação às outras espécies de rãs que ocorrem no Brasil, podendo medir em média 11 cm e chegar a pesar 350 g. Possui dorso acinzentado com pregas longitudinais proeminentes, hábito noturno e tem como habitat preferencial corpos de água lânticos como banhados, arroios, e canais onde vive em meio às gramíneas (FROST, 2016). Esta espécie é utilizada algumas vezes para fins de consumo humano, onde no nordeste é alvo de caça para fins alimentícias (ALVES et al., 2009) podendo ser usada como alternativa ao uso de espécies exóticas na ranicultura local.

L. macrosternum é considerada uma espécie generalista, ocorrente em diversos tipos de habitats, desde ambientes secos abertos a florestas tropicais úmidas, habitando todas as variedades de lagoas, rios e lagos sendo também, bem adaptadas as modificações de habitat e perturbação antrópicas, tendo em vista que também são encontradas em áreas fortemente antropofizadas nas zonas rurais ou urbanas (SOLÉ, et.al., 2009; HEYER, et al., 2010).

Sua reprodução ocorre em corpos d'água temporários, sendo comumente encontradas, em lagoas, pequenos lagos ou áreas alagadas. Depositam seus ovos em ninhos de espumas na superfície de lagos onde os seus girinos se desenvolvem. A espuma auxilia na proteção contra a dessecação e predadores, fornecendo também a oxigenação dos ovos (PRADO et al., 2005), sendo um possível adaptação a ambientes secos. São animais com dorso acinzentado, com marcas longitudinais proeminentes, sendo representados em geral por animais de pequeno e médio porte, insetívoros, e de atividade noturna, vivendo sob o solo ou em corpos d'água (HEYER, et al., 2010; FROST, 2016).

As características anatômicas e morfológicas do sistema reprodutor desta espécie correlacionadas aos fatores climáticos permitem assim, avaliar os aspectos reprodutivos destes animais, ampliando o conhecimento da biologia reprodutiva dos anuros neotropicais como também o conhecimento destes grupos apresentam um caráter de alta importância, uma vez que estas populações possuem uma alta especificidade microambiental e pequena capacidade de adequar-se a interferência humana torna-se extremamente vulneráveis às mudanças ambientais (DUELLMAN; TRUEB, 1994; SCHLAEPFER; GAVIN 2001; VITT; CALDWELL, 2001).

A área de estudo

Este estudo foi executado em uma área composta por lagoas permanentes e temporárias na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) situado no município de Cuité, região do Curimataú do Estado da Paraíba (Figura 2). O município de Cuité está localizada na mesorregião do

Agreste paraibano e na microrregião do Curimataú Ocidental ($6^{\circ}29'06''S/36^{\circ}9'24''O$), com altitude de 667 metros acima do nível do mar e uma área total de $758,6\text{km}^2$.

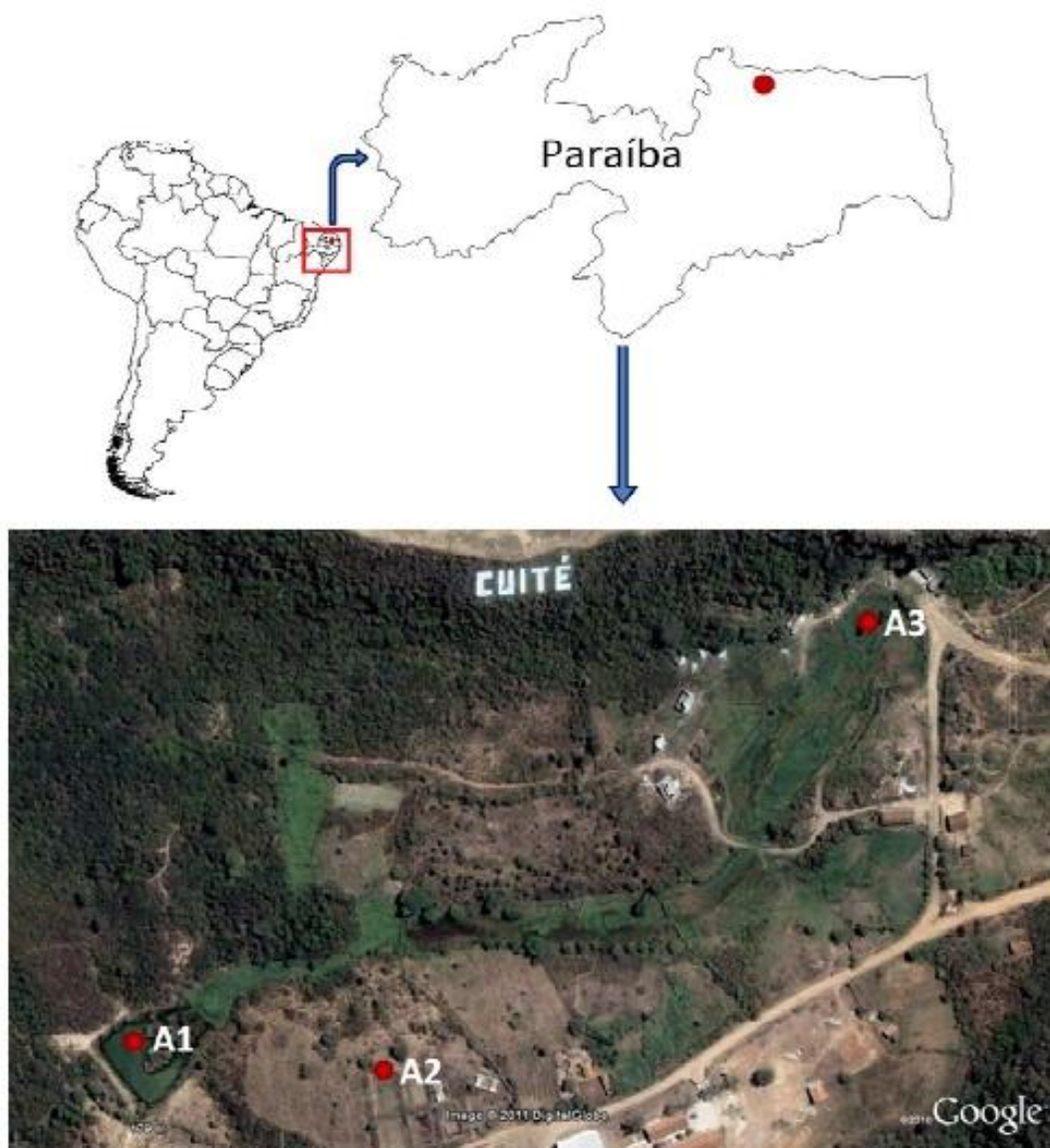


Figura 2. Localização da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) situado no município de Cuité, estado da Paraíba e distribuição dos corpos d'água no interior da área de coleta, Cuité-Paraíba. A1 – área 1; A2 – área 2 e A3 – área 3.

A região apresenta clima quente e seco, com temperatura oscilando entre 17° e 28°C , pluviosidade média mensal de $76,35\text{ mm}$ e umidade relativa em torno de 70% . Possui uma

hidrografia peculiar, com rios efêmeros, açudes, além de fontes d'água naturais. Dentre essas fontes, está o Olho D'água da Bica, manancial perene localizado próximo ao Campus de Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) que dá nome a região do Horto Florestal Olho D'água da Bica. A região é composta de 70 hectares de caatinga arbórea e arbustiva, com presença de córregos, barragens, áreas úmidas e áreas de encosta de onde brotam a nascente d'água (Abrantes et al. 2011). Para a execução deste trabalho foram selecionadas três áreas. A **ÁREA 1 (A1)** (Figura 3) compreende uma lagoa permanente localizada entre as coordenadas geográficas 6°29'37.83"S e 36° 9'43.75"O, com uma área média total de 63m² e profundidade máxima em torno de 2,5 m. É caracterizada pela presença de inselbergs nas proximidades e margeada por caatinga arbórea e arbustiva com presença de representantes das seguintes espécies botânicas: oiticaria (*Clarisia racemosa*), ingá (*Inga Alba*), juazeiro (*Zizyphus joazeiro*), mororó (*Bauhinia forficata*), paudárco (*Tabebuia serratifolia*), mulungu (*Erythrina sp.*) Pereiro (*Pyrus sp.*) marmeleiro (*Cydonia oblonga*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), baraúna (*Schinopsis brasiliensis*), craiberas (*Tabebuia caraíba*), catingueiras (*Caesalpinia pyramidalis*), algaroba (*Prosopis juliflora*) e diversas espécies de frutíferas.



Figura 3- Vista frontal da lagoa correspondente a área 1 localizado da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba.

A **ÁREA 2 (A2)** (Figura 4) compreende uma lagoa temporária, localizada nas seguintes coordenadas geográficas: 36° 9'38.39"O e 6°29'38.30". Caracteriza-se por ser uma lagoa de pequeno porte com uma extensão de aproximadamente 15 m², com uma profundidade máxima de 0,7m. Apresenta iselbergs nas proximidades e flora caracterizada por caatinga arbórea e arbustiva com exemplares botânicos citados na área acima.



Figura 4- Vista frontal da lagoa correspondente a área 2 localizado da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba.

A **ÁREA 3 (A3)** (Figura 5) representa uma lagoa artificial permanente de pequeno porte, com uma área de 3m² e uma profundidade média de 1,5m e caracterizada pela presença de alto grau de impacto antrópico. Está localizada à 6°29'29.29"S e 36° 9'28.62"O e tem como vegetação característica a grande presença de bromeliáceas.



Figura 5- Vista frontal da lagoa correspondente a área 1 localizado da área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), município de Cuité, estado da Paraíba.

Objetivo Geral

Descrever o ciclo reprodutivo anual espécies da espécie *Leptodactylus macrosternum* com base nos parâmetros histológicos e morfométricos das gônadas e as relações com as circunstâncias ambientais na área de estudo, bem como verificar os efeitos da sazonalidade em seu processo reprodutivo em áreas de semi-árido da Região do Curimataú paraibano avaliando também, os efeitos da sazonalidade sobre essas comunidades.

Objetivos Específicos

- Caracterizar morfologicamente as gônadas e anexos e o comportamento reprodutivo da espécie *L. macrosternum*;
- Avaliar os níveis de hormônios sexuais das fêmeas de da espécie *L. macrosternum*;

- Correlacionar às alterações climáticas com as possíveis alterações dos hormônios sexuais das fêmeas, com os achados histológicos e morfométricos da espécie da espécie *L. macrosternum*;

Referências

- ABRANTES, S. H. F et al. **Fauna de Anfíbios Anuros em Três Lagoas da Área de Implantação do Horto Florestal, Campus da UFCG, Cuité-PB**. Revista Nordestina de Zoologia. 5, (2): 19-36, 2011.
- Abe, A.B. **Estivation in South America amphibian and reptiles**. Braz Jour Med Biol Res. 28: 1241- 1247, 1995.
- AB'SÁBER, N.S. 1970. **Províncias geológicas e domínios morfoclimáticos no Brasil**. Geomorfologia 3: 1-26, 1970.
- AB'SÁBER, N.S. **Problemática da desertificação e da savanização no Brasil intertropical**. Geomorfologia, 53: 1–19, 1977
- AB'SABER, A.N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. Ateliê Editorial, São Paulo. 151 p, 2005.
- ALVES, R.R.N. et al. **Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil**. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 5: 1-50, 2009.
- AZZOUZI, K; TEKAYA, S. **Adaptation aux facteurs climatiques de l'ovogenèse chez le discoglosse en Tunisie (AMPHIBIEN, ANOURE)**. Bull. Soc. zool. Fr., 132(1-2): 57-66, 2007.
- ARAK. A. **Sexual selection by male-male competition in Natterjac toad chourse**. Nature. 306. 261-262, 1983.
- BABBITT, K.J. **The relative importance of wetland size and hydroperiod for amphibians in southern New Hampshire, USA**. Wetlands Ecology and Management, 13: 269 – 279, 2005

- BALDWIN, R.F; et al. **Conservation planning form amphibian species with complex habitat requirements: a case study usin movements and habitat selection of the wood frog *Rana sylvatica***. Journal of Herpetology, 40 (4): 442 – 453, 2006
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M. T. **Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil**. Amphibia-Reptilia, 23:161-167 , 2002.
- BIONDA, C. L.et al. **Reproductive Ecology of the Common South American Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive Effort, Clutch Size, Fecundity, and Mate Selection** . Journal of Herpetology, 45 (2): 261–264, 2011.
- BLAUSTEIN, A. R; WAKE, D. B. **Declive de las poblaciones de anfibios**. Investigaçã o e Ciência: 8-13, 1995.
- BORGES - NOJOSA, D. M.; ARZABE, C. **Diversidade de anfibios e répteis em áreas prioritárias para a conservação da Caatinga**. In: Araújo, F.S. et al (Orgs). **Análise das variações da biodiversidade do Bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação**. Ministério do Meio Ambiente: 227-241, 2005.
- BURNE, M.R.; GRIFFIN, C.R. **Habitat associations of pool-breeding amphibians in eastern Massachusetts, USA**. Wetlands Ecology and Management, 13: 247 – 259, 2005.
- CARDOSO, A.J; MARTINS, J. E. **Diversidade de anuros durante o turno de vocalização em comunidades Neotropicais**. Papeis Avulsos de Zoologia, 36: 279-285, 1987.
- CARDOSO,A.J.; HADDAD, C.F.B. **Diversidade e turno de vocalização de anuros em comunidades Neotropicais**. Acta Zool. Lilloana, 41: 93-105, 1992.
- CEI, J.M., et al. **Divergent male androgen patterns in two sympatric species of *Leptodactylus* from subtropical South America**. Amphibia-Reptil, 17:1-6, 1996.
- COSTA, C. L. S. et al. **Caracterização Morfológica dos Estádios de Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor Masculino da Rã-Touro, *Rana catesbeiana*, no Sistema Anfigranja de Criação Intensiva**. Revista Brasileira de Zootecnia, 27 (4): 651-657, 1998.

- DE LA RIVA, I., MALDONADO. M. **First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species.** Graellsia 55: 193-197, 1999.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians.** Johns Hopkins University press. 789p, 1994.
- FERREIRA, A., et al. **Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil.** Biocel 1, 32, 185-194, 2008.
- FERREIRA A; ROSA, A.B.S; MEHANNA, M. **Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil).** Acta Scientiarum. Biological Sciences, 31(4): 447-452. 2009
- FERREIRA, A.; MEHANNA, M. **Seasonal testicular changes in *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura, Hylidae).** Biocell, 36 (2): 57-62, 2012.
- FELLERS, G. M. **Aggression, territoriality, and mating behaviour in North American treefrogs.** Animal Behavior, 27:107-119, 1979.
- FORESTER, D. C.; D. V. LYKENS. **Significance of satellite males in a population of Spring peppers (*Hyla crucifer*).** Copeia: 719–724, 1986.
- FROST, D.R. 2016. Amphibians species of the world, [online]. Base de dados disponível em <http://www.research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php> [acesso disponível em: em 11.11.2016].
- GOSNER, K. L. **A simplified table for staging anuran embryos and larvae notes on indentification.** .Herpetologica 43:467-481, 1960.
- GUERRY, A.D.; HUNTER Jr., M.L. **Amphibian distributions in a landscape of forests and agriculture: an examination of landscape composition and configuration.** Conservation biology, 16 (3): 745 – 754, 2002.

- HADDAD, C. F. B.; CARDOSO, A. J. **Elección del macho por la hembra de *Hyla minuta* (Amphibia: Anura)**. Acta Zoologica Liloana, 41: 81-91, 1992.
- HADDAD, C.B.F; PRADO, C.P.A. **Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil**. Bioscience 55:207–217, 2005.
- HACZKIEWICZ, K.; OGIELSKA, M. **Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries**. Zoological Science 30: 125–134, 1013.
- HAZELL, D.; R. et al. **Use of farm dams as frog habitat in an Australian agricultural landscape: factor affecting species richness and distribution**. Biological Conservation, 102: 155 – 169, 2001.
- HEYER, W.R.; et al. **Frogs of Boracéia**. Arquivos de Zoologia, 31(4): 231 – 410, 1990.
- HERMOSILLA, I. B.; et al. **Espermatogénesis em la rana Chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae)**. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, 54 (1): 103-115, 1983.
- HERMOSILLA, I.B.; et al. **Caracterización del ovario de la "rana Chilena" *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae)**. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, 57: 37-47, 1986.
- HOCKEY, P. A. R.; CURTIS, O. E. **Use of Basic Biological Information for Rapid Prediction of the Response of Species to Habitat Loss**. Conservation Biology, 23(1): 64-71, 2009.
- HOWARD, R. D. **The evolution of mating strategies in bullfrogs, *Rana catesbeiana***. Evolution, 32(4): 850-871, 1978.
- JANSEN, D. H. **Florestas tropicais secas**. In: WILSON, E. O. (ed.) Biodiversidade. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, p. 166-176, 1997.
- JIM, J. **Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 332p, 1980.

- KNUSTON, M.G.; et al. **Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, USA.** Conservation biology, 13 (6): 1.437 – 1.446, 1999.
- KREBS, J. R. 1982. **Territorial defence in the great tit (*Parus major*): do residents always win?** Behav. Ecol. Sociobiol., 11:185-194, 1982.
- LEIVAS, P.T. et al. **The Reproductive Biology of the Invasive *Lithobates catesbeianus*.** Froglog, 104: 57-58, 2012.
- LEONARD, J.L. **Introduction: celebrating and understanding reproductive diversity.** In: Leonard JL, Co'rdoba-Aguilar A (eds) **The evolution of primary sexual characters in animals.** Oxford University Press, New York, p 1–5, 2010.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento.** Editora Contexto, São Paulo. Levins. 2012.
- LOFTS, B. **Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog, *Rana esculenta*.** General and Comparative Endocrinology, 4 (2): 550-562, 1974.
- MAGNUSSON, W.E.; HERO, J.M. **Predation and the evolution of complex oviposition behaviour in Amazon rainforest frogs.** Oecologia 86: 310-318, 1991.
- MARAGNO, F. P.; CECHIN, S. Z. **Reproductive biology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) in the subtropical climate, Rio Grande do Sul, Brazil.** Iheringia, Sér. Zool., 99 (3): 237-241, 2009.
- MARTINS, M., et al. **Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, *Hyla faber*.** Amphibia-Reptilia, 19: 65-73, 1998.
- MOORE, F.L. et al.. **Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians.** Hormone and Behavior. 48: 373 – 383, 2005.
- MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. 1986. Ecology of tropical dry forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 17, p. 67-88.

- OLIVEIRA, C.; ANDRADE, U.J.A. **Anatomia dos ovários e corpos adiposos de *Scinax fuscovaria* (Anura, Hylidae)**. Acta Biologica Leopoldensia, 19 (2): 173-183, 1997.
- OLIVEIRA, C., et al. 2002. **Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura)**. Revista Chilena de Anatomia, 20: 263-268, 2002.
- OLIVEIRA, C., et al. **Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae)** .Caryologia, 56 (1): 75-83, 2003a.
- OLIVEIRA, C.; et al. **Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius***. Biociências, 11 (1): 39-46, 2003b.
- OLIVEIRA, C; SANTOS L, R, S. **Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae)**. Revista Brasileira de Zoologia 21 (4): 919–923, 2004.
- PERRIL, S. A. et al. **Sexual parasitism in the green tree frog (*Hyla cinerea*)**. Science, 200:1179-1180, 1978.
- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M. **Reproductive biology of *Lysapsus limellus* Cope, 1862 (Anura, Pseudidae) in the pantanal, Brazil**. Zoocriaderos, 3(1): 25-30, 2000.
- PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. **Patterns of species distributions in the dry seasonal forest of South America**. Annals of the Missouri Botanical Garden, 80: 902-927, 1993.
- PRADO, C. P. A.; HADDAD, C. F. B. **Testes size in Leptodactylid frogs and occurrence of multiale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil**. Journal of Herpetology, 37(2): 354-362, 2003.
- PRADO, C.P.A., et al.. **Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil**. Amphibia-Reptilia, 26 (2): 211-221, 2005.

- RODRIGUES, M.T.. **A fauna de répteis e anfíbios. In Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios de biodiversidade brasileira.** Ministério do meio ambiente. 144 – 145, 2002.
- RODRIGUES, M. T. **Herpetofauna da caatinga.** In: I. R. Leal; M. Tabareli ; J. M. C. Silva. Ecologia e Conservação da Caatinga. Universidade Federal de Pernambuco, ed. Universitária. 181-236, 2003.
- RYAN, M. J. **The t'ngara frog. A study in sexual selection and communication.** Chicago, The University of Chicago. 230p, 1985.
- Robertson, J. G. M, **Acoustic spacing by breeding males of Uperoleia rugosa (Anura: Leptodactylidae).** Z. Tierpsychol., 64:283-297, 1986.
- ROSS, J.L.S. **Geografia do Brasil.** EDUSP-Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 549p, 1998.
- SANTOS, L.R; OLIVEIRA, C. **Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae).** Revista Brasileira de Zoologia 24 (1):64-70, 2007.
- Santos, L.R.S , et al. **Germ Cell Dynamics during the Annual Reproductive Cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae).** Zoological Science, 28, 840-844, 2012.
- SBH (Sociedade Brasileira de Herpetologia). **Lista de espécies de anfíbios do Brasil.** Disponível em: <[http:// www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm](http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm)>. Acesso em 21 de outubro de 2016.
- Sasso-Cerri, E.; et al. Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the Bulfrog *Rana catesbiana*. **Journal of Experimental Zoology** 301: 249-260, 2004.
- SCHLAEPFER, M. A.; T. A. GAVIN. **Edge effects on lizards and frogs in tropical forest fragments.** Conservation Biology 15:1079–1090, 2001.

- SCHWARTZ, J. J. **Male calling behavior, female discrimination and acoustic interference in the neotropical treefrog *Hyla microcephala* under realistic acoustic conditions.** Behavior Ecology. Sociobiology, 32:401-414, 1993.
- Segalla, M.V., U. et al. **Brazilian amphibians—List of species.** Herpetologia Brasileira 3(2): 37–48, 2014.
- SOLÉ, M.; I.R. et al. **Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil.** Herpetology Notes, 2: 9-15, 2009.
- TABORSKY M, et al. **The evolution of alternative reproductive tactics: concepts and questions.** In: Oliveira RF, Taborsky M, Brockmann HJ (eds) Alternative reproductive tactics: an integrative approach. Cambridge University Press, Cambridge, p 1–21, 2008.
- TABOGA, S. R., DOLDER, H. **Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae).** Rev. Bras. Cien. Morfol., 8: 66-71, 1991.
- TABORSKY, M; BROCKMANN, HJ. **Alternative reproductive tactics and life history phenotypes.** In: Kappeler P (ed) **Animal behaviour: evolution and mechanisms.** Springer, Heidelberg, p 537–586, 2010.
- TOLEDO L F; et al. **Alternative reproductive modes of Atlantic forest frogs.** **Journal of Ethology**, 30: 331–336, 2012.
- VELLOSO, A.L.et al. **Ecorregiões propostas para o bioma Caatinga. Associação plantas do nordeste;** Instituto de conservação ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 2002.
- VIEIRA, W.; et al. **Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no cariri paraibano, nordeste do Brasil.** Oecol. Bras., 11(3): 383-396, 2007.
- VILLAGRA, A.L.I., et al. **Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study.** Zygote, Cambridge University Press, p. 1-9, 2012.
- VILLAGRA A L I, C; et al. **Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study.** Zygote, 22: 291-299, 2014.

- VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **The effects of logging on reptiles and amphibians of tropical forests.** *In:* The cutting edge: conservation wildlife in logged tropical forest, 2001.
- WELLS, K.D.. **The courtship of frogs.** Pp. 233-262. *In:* D.H. Taylor & S.I. Guttman (Eds.). The Reproductive Biology of Amphibians. Plenum Press, New York and London, 1977.
- WELLS, K.D.. **Territoriality in the green frog (*Rana clamitans*): vocalizations and agonistic interactions.** *Animal Behavior*, 26:1051-1063, 1978.
- WELLS, K.D. **The Ecology & Behavior of Amphibians.** Chicago and London: The University of Chicago Press, p.1148, 2007.
- WERNECK, F. P.; COLLI, G. R. **The lizard assemblage from seasonally dry forest enclaves in the Cerrado biome, Brazil, and its association with the Pleistocenic Arc.** *Journal of Biogeography*, 33: 1983-1992, 2006.
- WEYRAUCH, S.L.; GRUBB JR, T.C. **Patch and landscape characteristics associated with the distribution of woodland amphibians in an agricultural fragmented landscape: an information-theoretic approach.** *Biological conservation*, 115: 443 – 450, 2004.
- WOODWARD, B. D. **Paternal effects on juvenile growth in *Scaphiopus multiplicatus* (the New Mexico spadefoot toad).** *Amer. Nat.*, 128: 58-65, 1986.

Artigo submetido a *Anais da Academia Brasileira de Ciências*

ISSN: 1678-2690

Correlações do fator de condição (K1) e das relações gonadossomáticas, hepatossomáticas e lipo-somáticas de *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae) no semiárido brasileiro

Correlations of condition factor (K1) and gonadosomatic, hepatosomatic and lipo-somatic relations of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA, Leptodactylidae) in the Brazilian Semi-arid

Marcio Frazão Chaves^{1,2*}; Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório³; Igor Luiz Vieira de Lima Santos²; Valeria Wanderley Texeira¹; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto¹; Geraldo Jorge Barbosa de Moura⁴; Álvaro Aguiar Coelho Texeira¹

¹Histology Laboratory of the Department of Animal Morphology and Physiology at the Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, <http://www.ufrpe.br/br>; ²Amphibian Biosystematics Laboratory of the Federal University of Campina Grande, Cuité, Paraíba, <http://ufcg.edu.br>; ³Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia. Recife Pernambuco ; ⁴ Laboratory of Herpetological and Paleo Herpetological Studies of the Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, <http://www.ufrpe.br/br>.

Correlações do fator de condição (K1) e das relações gonadossomáticas, hepatossomáticas e lipo-somáticas de *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae) no semiárido brasileiro

Abstract

The objective of this study was to assess variations of the condition factor (K1) against the gonadosomatic- RGS relations and energy reserves (hepatosomatic - RWL and liposomatic – RFB relations) of *Leptodactylus macrosternum* and their relationship to climate variation in the Horto Florestal Olho d'Água da Bica- HFOB region, Caatinga area of the municipality of Cuité, state of Paraíba. The animals were captured fortnightly through active collecting, between January and December 2013. Significant differences were observed ($p < 0.05$ Kruskal-Wallis) in the monthly variations of RGS, RFB and K1 of male and female *L. macrosternum* over the months of collection. The monthly variation of RWL showed no significant differences between their values in males and females, and no notable correlations between RGS, RWF, WFB and K1 observed in males. In females, the RGS values only relate significantly with the RWF and K1 values. The K1 values showed significant correlations with all other weight and length ratios. Climate change in the HFOB showed significant relationships with the variation of the indexes evaluated, with the exception of RWF. The variation of RGS values, RWL, RFB and K1 over the months of collection as well as their relation with the local climatic variation, showed a short reproductive activity for the species.

Key Words: Reproduction, seasonality, fatty bodies, anurans, Northeast.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações do Fator de Condição (K1) em relação as relações gonadossomáticas– RGS e de reserva energética (relações hepatossomáticas- RWL e lipossomáticas - RFB) da espécie *Leptodactylus macrosternum* e suas relações com a variação climática da região do Horto Florestal Olho d'água da Bica (06°49'20''S/36°15'85''W), área de caatinga do município de Cuité, Estado da Paraíba. Os animais foram capturados quinzenalmente, através de coleta ativa, entre janeiro e dezembro de 2013. Apenas entre os meses de maio-agosto e novembro-dezembro foram realizados registros e conseqüentemente capturas. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$ Kruskal-Wallis) na variação mensal dos índices RGS, RFB e K1 de machos e fêmeas de *L. macrosternum* ao longo dos meses de coleta. A variação mensal da RWL não apresentou diferenças significativas entre seus valores em machos e fêmeas. Não foram observadas correlações significativas entre seus valores em machos e fêmeas. Não foram observadas correlações significativas entre RGS, RWL, WFB e K1 nos machos. Nas fêmeas os valores de RGS correlacionam-se significativamente apenas com os valores de RWL e K1. Os valores de K1 demonstraram correlações significativas com todas as outras relações de peso e comprimento. A variação climática (precipitação e de temperatura) da região do HFOB demonstrou relações significativas com a variação dos índices avaliados a exceção da RWL. A variação dos valores RGS, RWL, RFB e do K1 ao longo dos meses de coleta, bem como suas relações com a variação climática local demonstram uma curta atividade reprodutiva para a espécie.

Palavras chave: Reprodução, sazonalidade, corpos gordurosos, anuros, nordeste.

Introdução

A condição corporal de um animal tem se mostrado uma importante ferramenta utilizada na conservação e manejo da biodiversidade (Anderson e Neumann, 1996), uma vez que refletem aspectos nutricionais recentes ou gastos de reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-los ao estresse ambiental, disponibilidade de presa (Sztatecsny e Schabetsberger, 2005), investimento reprodutivo (Castellano, Cucco e Giacoma, 2004) e desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (Green, 2001), escolha de parceiros (Uetz, Papke e Kilincz, 2002), sobrevivência (Hoey e McCormick, 2004), a vulnerabilidade à predação (Murray, 2002; Wirsing, Steury e Murray, 2002), e capacidade de luta (Bee, Perill e Owen, 2000).

A utilização da relação entre o peso e o comprimento animal, fator de condição (K_1), é um índice muito utilizado em estudos de biologia animal, pois indica as taxas de reserva energética e de crescimento de uma população frente ao ambiente (Vazzoler, 1982; Braga, 1986). A interpretação deste índice, relacionados à variação climática pode ser utilizada como dado adicional ao estudo dos ciclos sazonais dos processos de alimentação e reprodução (Braga, 1986; Lima-Junioret al., 2002; Satake et al., 2009).

A relação entre o peso de uma estrutura por determinada dimensão corpórea é um parâmetro que também pode ser empregado na determinação de alterações morfológicas ontogenéticas, fornecendo importantes informações sobre o estado reprodutivo e ou nutricional de indivíduos em uma população (Tavares-Dias et al., 2008; Satake et al., 2009). A interpretação das relações entre o peso de órgãos como fígado, tecido adiposo e gônadas podem gerar importantes informações sobre a dinâmica energética bem como o estado reprodutivo de anfíbios em regiões neotropicais (Huang et al., 1997; Oliveira e Zieri, 2005; Ebert et al., 2011; Franco-Belussi1 et al., 2012).

Em regiões tropicais, onde a sazonalidade é expressiva, a adaptação a esses ambientes requer controles da atividade reprodutiva para a produção da prole em um período do ano mais adequado a sobrevivência da maioria (Taborsky et al. 2008; Taborsky & Brockmann, 2010). Em

áreas de caatinga, a quantidade limitada de chuvas determina o padrão reprodutivo e energético dos anfíbios anuros. Durante a estiagem, as espécies de anuros que ocorrem nesta região apresentam adaptações fisiológicas e comportamentais às variações térmicas, de escassez de alimentos e água nos corpos aquáticos (Prado et al., 2000; Bertoluci & Rodrigues, 2002).

Nesses ambientes os animais estão reprodutivamente ativos por dois ou três meses durante o ano (Rodrigues, 2003), período este determinado pelo aumento nas taxas de pluviosidade da região. Brow (2011) em estudos realizados em áreas de semi-árido demonstrou que ajustes comportamentais e fisiológicos ocorrem durante diferentes períodos ao longo de um ano. Animais com os maiores tamanhos corporais, taxas de crescimento e maiores massas de corpos gordurosos coincidem com a estação chuvosa e período reprodutivo dos anuros (Brow, 2011) o que pode refletir numa maior associação entre as condições corporais K1 e relações do peso corporal com órgãos como fígado, tecido adiposo e gônadas determinando o desenvolvimento das características sexuais secundárias, a manutenção do comportamento sexual e o início da gametogênese dos anuros.

Assim, este trabalho adota a espécie *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) como modelo biológico para a interpretação da dinâmica reprodutiva e energética de anuros em região da caatinga do Estado da Paraíba. Por ser uma espécie generalista e bem adaptada a áreas perturbadas, *L. macrosternum* destaca-se por ser uma rã de grande porte em relação às outras espécies que ocorrem no Brasil sendo utilizada para fins de produção, como alternativa ao uso de espécies exóticas na ranicultura. Apresenta hábito noturno e ocupa preferencialmente corpos de água lânticos como banhados, arroios, e canais onde vive em meio às gramíneas (Frost, 2015). É considerada uma espécie generalista, ocorrente em diversos tipos de habitats, desde ambientes secos abertos a florestas tropicais úmidas. Sua reprodução ocorre em corpos d'água temporários, sendo comumente encontradas, em lagoas, pequenos lagos ou áreas alagadas. Depositam seus ovos em ninhos de espumas na superfície de lagos onde os seus girinos se desenvolvem (Prado et al., 2005), sendo um possível adaptação a ambientes secos.

Para tanto objetivou-se avaliar a correlação do Fator de condição (K1) em relação as relações gonadosomáticas – RGS e de reserva energética (relações hepatossomáticas - RWL e lipossomática - RFB) da espécie modelo; assim como as variações destes índices ao longo dos meses de amostragem e suas relações com os parâmetros ambientais (precipitação e temperatura) da área de estudo.

Material e Métodos

Área de estudo

As coletas ocorreram no Horto Florestal Olho d'Água da Bica- HFOB (06°49'20''S/36°15'85''W/667 m) localizada no município de Cuité-Paraíba com prévia autorização do IBAMA (44134-1). A área de HFOB (Fig. 1) é composta por lagoas permanentes e temporárias, fazendo parte da mesorregião do Agreste paraibano e na microrregião do Curimataú Ocidental. Apresenta clima quente e seco, com temperatura oscilando entre 17° e 28°C, pluviosidade média mensal de 76,35 mm e umidade relativa em torno de 70% (Abrantes et al. 2011).



Fig. 1 - Localização dos pontos de amostragem de *L. macrosternum* inseridos na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), Município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil; entre janeiro a dezembro de 2013.

Procedimento de campo e laboratório

Para a execução deste trabalho, foram realizadas expedições noturnas a cada 15 dias no período de janeiro a dezembro de 2013.

No Laboratório de Biossistemática de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cuité-PB, os indivíduos capturados foram eutanasiados através de hiperdosagem do anestésico Lidocaína 5%, e posteriormente foram coletados dados biométricos, como o comprimento total (cm), comprimento rostro-cloacal (CRC) e o massa total (g). Com a utilização de materiais cirúrgico-oftalmológicos, foram removidos as gônadas, fígado e os corpos adiposos (Fig. 2), que foram posteriormente medidos (comprimento maior - mm). As medições

foram realizadas através paquímetro digital (0,05 mm) e depois pesados (g) em balança analítica de precisão (0,001g).

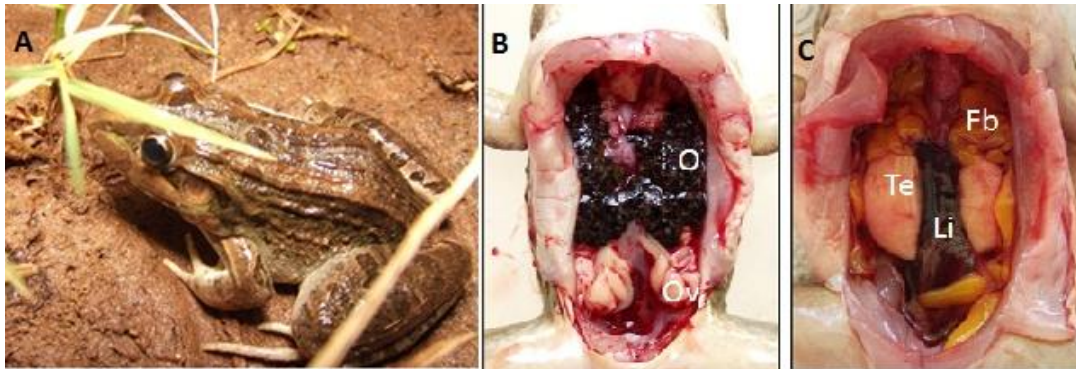


Fig. 2- A- *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926). (Legenda: B- Vistaventral de fêmea; O- Ovulos; Ov- Ovários; C- Vistaventral de macho; Te- testículos, Li- fígado, Fb- corpos gordurosos).

Cálculos do fator de condição (K1), relação gonadossômática (RGS), hepatossômática (RWL) e lipossômática (RFB)

Os valores de peso corporal (WT), peso das gônadas (WG), peso do fígado (WL) e peso dos corpos gordurosos (WFB) foram utilizados para o cálculo da relação gonadossômática [$RGS = WG(100)/WT$], hepatossômática [$RWL = WL(100)/WT$] e lipossômática [$RFB = WFB(100)/WT$] (Vazzoler, 1982).

O Fator de Condição dos animais (K1) foi calculado pelo método alométrico, a partir da expressão $K1 = W/L^b$, na qual W representa a massa total do corpo e L, o comprimento padrão dos indivíduos. Para estimar o valor do coeficiente b, ajustou-se uma única equação de relação peso-comprimento ($W = aL^b$), a partir do conjunto de todos os indivíduos coletados (Lima-Junior et al., 2002).

Dados climáticos

Os dados meteorológicos mensais de temperatura (°C), e pluviosidade (mm) foram adquiridos através do banco de dados do Centro de Agência Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESAs).

Análise dos dados

A normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk. Os resultados obtidos para as variáveis RGS, RWL, RFB e K1 ao longo dos meses de coleta foram submetidos à comparação mensal, pela aplicação do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com aplicação a posteriori do teste de Dunn. A correlação existente entre a variável K1 e RGS, RWL e RFB foi testada pela aplicação do Coeficiente de Correlação de Spearman. A dependência das variáveis K1, RGS, RWL e RFB e variáveis climáticas (pluviosidade e temperatura) da área do HFOB foi testada através da análise de regressão linear múltipla stepwise (backward). O nível de significância de 0,05 foi estabelecido para todos os tratamentos estatísticos citados (Zar,1999).

Resultados

Foram coletados 53 indivíduos de *L. macrosternum* (29 machos e 24 fêmeas) distribuídos entre os meses de maio (9 exemplares- 5 machos e 4 fêmeas), junho (15 exemplares- 11 machos e 4 fêmeas), julho (8 exemplares- 3 machos e 5 fêmeas), agosto (8 exemplares- 4 machos e 4 fêmeas), novembro (7 exemplares- 4 machos e 3 fêmeas) e dezembro (6 exemplares- 2 machos e 4 fêmeas) de 2013. Nos meses entre janeiro-abril e setembro-outubro não foram avistados indivíduos de *L. macrosternum* durante as saídas de campo.

O valor do coeficiente angular de regressão entre peso e comprimento (b) da população de *L. macrosternum* amostrada foi de 3.012 (Fig. 3).

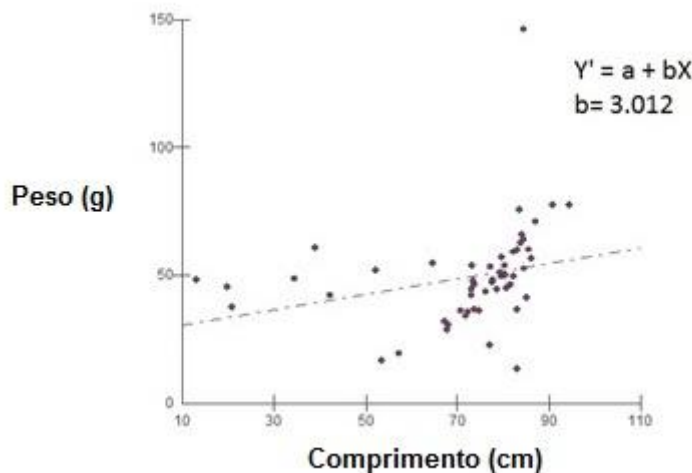


Fig. 3- Relação peso total /comprimento dos indivíduos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil, no período de maio a dezembro de 2013.

O Fator de Condição (K1) dos machos e fêmeas de *L. macrosternum*, distribuídos ao longo dos meses de coleta apresentaram diferenças significativas em seus valores. Os maiores valores do K1 encontrados nos machos de *L. macrosternum* foram verificados no mês de dezembro ($p=0.04$) (Fig. 4). Com relação às fêmeas, os menores valores significativos ($p=0.03$) foram observados no mês de julho (Fig. 5). Ao longo do período de coleta, os machos apresentaram significativamente os menores valores da Relação Gonadossomática (RGS) no mês de junho ($p=0.04$) (Fig. 4). Os maiores valores da RGS encontrados nos machos de *L. macrosternum* foram verificados no mês de dezembro ($p=0,03$) (Fig. 4). Com relação às fêmeas, os meses de maio ($p=0,02$) e junho ($p=0,05$) apresentaram os maiores picos de RGS (Fig. 5).

A variação mensal da Relação Hepatossomática (RWL), não apresentou diferenças significativas entre seus valores, tanto para machos (Fig. 4) quanto para fêmeas (Fig. 5), nos meses em que os animais foram coletados. Os machos e fêmeas de *L. macrosternum* apresentaram os

maiores valores para a RWL nos meses de julho e dezembro (Fig. 4 e Fig. 5). A variação mensal dos valores da Relação Lipossomática (RFB) entre machos e fêmeas de *L. macrosternum* apresentou diferenças significativas entre os meses amostrados. Os menores valores observados para este parâmetro correspondem nos machos para o mês de junho ($p=0,04$) e agosto ($p=0,03$) (Fig. 4). Os maiores valores de RFB nas fêmeas de *L. macrosternum* foram observados nos meses de agosto ($p=0,05$) e novembro ($p=0,04$) (Figura 5). O mês de dezembro ($p=0,04$) foi o que apresentou os menores valores médios para este parâmetro avaliado (Fig; 5).

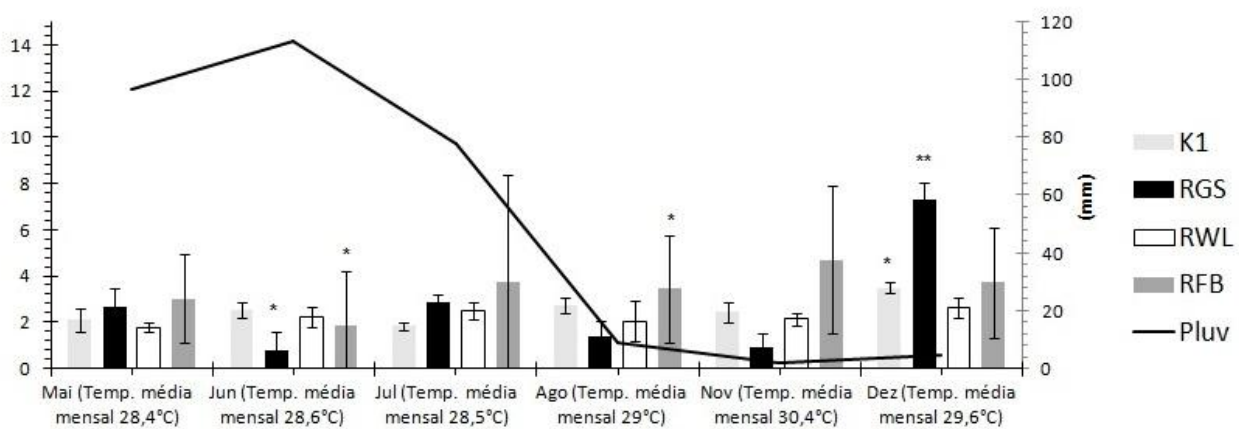


Fig. 4- Média e desvio padrão do fator de condição (K1), da Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatossomática (RWL) e da Relação Lipossomática (RFB) de machos de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) e variação climatológica - Precipitação (Prec, mm) e variação média da temperatura mensal (°C) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil, no período de maio a dezembro de 2013. (Legenda- * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p<0,05$).

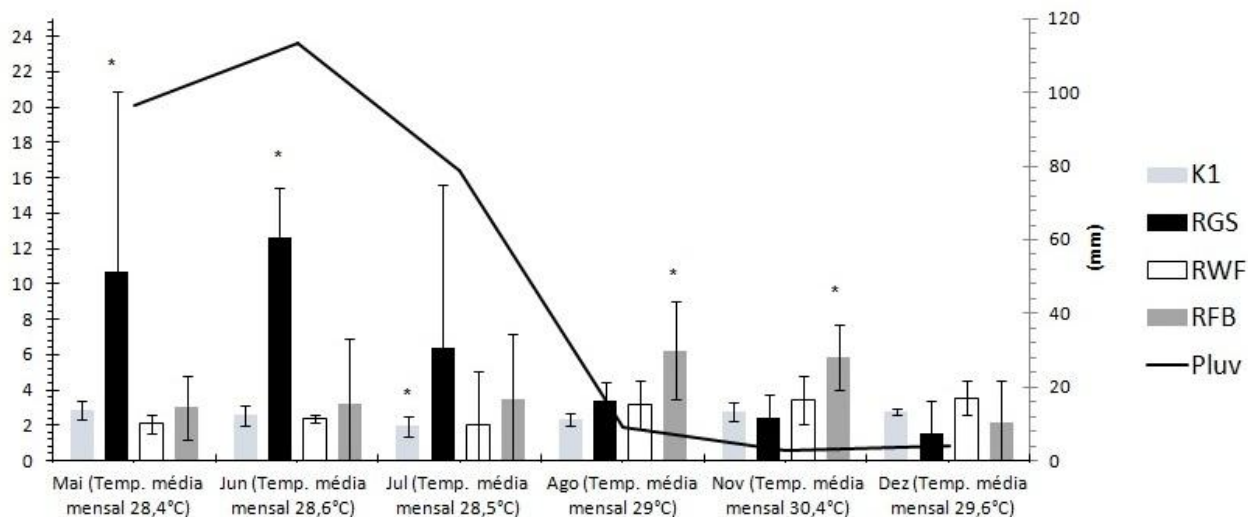


Fig. 5- Média e desvio padrão do fator de condição (K1), da Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatosomática (RWF) e da Relação Lipossomática (RFB) de fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) e variação climatológica - Precipitação (Prec, mm) e variação média da temperatura mensal (°C) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil, no período de maio a dezembro de 2013. (Legenda- * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p < 0,05$).

Observando os resultados apresentados pelo teste de correlação de Spearman, o fator de condição (K1) não apresentou relações significativas com as variáveis RGS, RWF e RFB, ao longo do período de coleta nos machos de *L. macrosternum* (Tabela 1). Contudo, em fêmeas observa-se que os valores de K1 correlacionaram-se positivamente com as variáveis RGS ($p = 0,03$; $r = 0,12$) e RFB ($p = 0,05$; $r = 0,30$) e apresentando correlações negativas com a variável RWF ($p = 0,05$; $r = -0,30$) (Tabela1).

Tabela 1- Coeficiente de correlação de Spearman comparando o Fator de Condição (K1) com as variáveis Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatossomática (RWF), Relação Lipossomática (WFB) de machos e fêmeas da espécie de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil no período de maio a dezembro de 2013.

| | Machos | | Fêmeas | |
|------------|---------------|---|---------------|--------|
| | K1 | | K1 | |
| | p | R | p | r |
| RGS | ns | - | 0.03 | 0.12 |
| RWF | ns | - | 0.05 | - 0.30 |
| RFB | ns | - | 0.05 | 0.30 |

ns- relações não significativas

A variação do Fator de Condição (K1) dos machos de *L. macrosternum* não demonstrou relações significativas com o regime de chuvas e variação de temperatura da área do HFOB. O regime de chuvas da região apresentou relações significativas com a variação da K1 ($p=0,05$) e WFB ($p=0,05$) em de fêmeas de *L. macrosternum*. Também foram observadas relações significativas entre a variação do K1 ($p=0,04$) com a temperatura da área do HFOB entre as fêmeas de *L. macrosternum*. A variação do regime de chuvas e de temperatura da região do HFOB demonstrou relações significativas com a variação da RGS de machos ($p=0,02$) e fêmeas ($p=0,03$) de *L. macrosternum* ao longo dos meses de coleta. Em contrapartida, não foram observadas relações significativas entre a variação da RWF com estes parâmetros climáticos na área de estudo. (Tabela 2).

Tabela 2- Relações entre as variáveis: Relação Gonadossomática (RGS), Relação Hepatosomática (RWF), Relação Lipossomática (WFB) e Fator de Condição (K1) com a variação climática (pluviosidade- Pluv. E temperatura- Temp.) de machos e fêmeas da espécie de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba- Brasil no período de maio a dezembro de 2013.

| | Machos | | Fêmeas | |
|------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | Pluv | Temp | Pluv. | Temp |
| K1 | b=-0,09 ^{ns} | b=-0,68 ^{ns} | b=0,08* | b=-1,76* |
| RGS | b=-0,04* | b=-1,80* | b=0,07* | b=-1,95 ^{ns} |
| RWF | b=-0,01 ^{ns} | b=-0,07 ^{ns} | b=0,08 ^{ns} | b=1,12 ^{ns} |
| WFB | b=0,01 ^{ns} | b=1,15 ^{ns} | b=0,01* | b=1,25 ^{ns} |

^{ns} relações não significativas; * relações significativas.

Discussão

A irregularidade de chuvas, a formação e duração dos corpos de água limitam vários aspectos de vida dos anuros como aquisição de recursos, acúmulo de reservas e principalmente, atividade reprodutiva (Dayton e Fitzgerald, 2001). As baixas ocorrências das chuvas bem como a sua imprevisibilidade em ambientes semi-áridos podem determinar alguns ajustes fisiológicos nos anuros (Rossa-Feres e Jim, 1994; Santos et al., 2007; Giaretta et al., 2008).

Os exemplares de *Leptodactylus macrosternum* aqui estudados apresentaram aumento de massa corporal proporcional ao aumento do tamanho corporal, apresentando coeficiente angular de regressão entre peso e comprimento (b) 3,02 (Figura 3). Segundo Vazzoler, (1996), populações de

animais que apresentam a variação coeficiente angular de regressão entre peso e comprimento (b) entre 2,5 a 4,0 apresentam um padrão de crescimento isométrico.

Observa-se um forte *outlier* presente no eixo referente ao peso total da população amostrada de *L. macrosternum* (Figura 3). Este valor discrepante está fortemente associado a presença de animais com as maiores massas corporais concentrados no período de maior pluviosidade da região (maio, junho e julho de 2013), decorrente de um maior acúmulo de reservas energéticas e desenvolvimento gonadal, principalmente nas fêmeas (Figura 4). Na estação chuvosa, anuros podem apresentar um maior tamanho corporal, uma maior taxa de crescimento e maior acúmulo de reservas energéticas, bem como um maior desenvolvimento gonadal (Brown et al., 2011).

O fator de condição (K1) é um importante indicador do grau de hígidez de um indivíduo e seu valor reflete as condições nutricionais recentes e/ou gastos das reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies (Gomiero et al., 2010). Neste estudo, fêmeas da espécie *L. macrosternum* demonstraram correlação significativa entre os valores de K1 e os valores de RGS, o que pode refletir um maior gasto energético para a produção de gametas. Em áreas de caatinga os anuros estão reprodutivos por dois ou três meses durante o ano (Rodrigues, 2003) e algumas espécies mantêm a atividade de forrageio e o consequente acúmulo de energia durante o restante do ano (Duellman e Trueb, 1999).

Os maiores picos observados para K1 podem estar relacionados com uma maior intensidade da atividade alimentar da espécie *L. macrosternum* com subsequente acúmulo dos corpos gordurosos e carboidratos no fígado, podendo assim, sofrer alterações tanto em função dos fatores intrínsecos (reservas orgânicas, desenvolvimento gonadal e tamanho dos exemplares) quanto dos fatores extrínsecos, como temperatura, regime de chuvas e disponibilidade alimentar (Botelho et al., 2007). Dessa forma, a variação do K1 na referida espécie também pode estar relacionada à disponibilidade e aproveitamento de alimentos pelos indivíduos durante os meses em que se realizaram as coletas.

A hipótese da relação do K1 com fatores extrínsecos pode ser corroborada pela relação entre a sua variação com as variáveis climáticas observadas na região do HFOB nas fêmeas de *L. macrosternum*. Somam-se a este fato, as relações apresentadas a variação do regime de chuvas e de temperatura da região com a variação da RGS e WFB nas fêmeas e entre relação da variação da RGS com a pluviosidade nos machos de *L. macrosternum* na região do HFOB.

O resultado do teste de correlação entre a variação sazonal do K1 e RGS em macho de *L. macrosternum* observados neste trabalho demonstrou que estas duas variáveis podem apresentar ciclos independentes, ou seja, não há uma associação significativa entre elas.

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula, é um órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos (Hipolito, 2001). O arranjo do tecido hepático é diretamente relacionado com as características fisiológicas dos animais, tais como ectotermia e reprodução (Bruslè e Anadon, 1996), desta forma o RWF também pode ser utilizado como indicador do período reprodutivo de *L. macrosternum*, correlacionado a outros fatores como o K1 e RGS. Esse índice pode estar relacionado com a mobilização das reservas energéticas necessárias para o processo de vitelogênese, reprodução ou também de preparação para um período de baixa disponibilidade alimentar (Navarro et al., 2005). Confirmando o resultado da correlação significativa dos valores de RGS e RWF nas fêmeas de *L. macrosternum* observados neste trabalho.

Nos anuros, os corpos gordurosos são depósitos lipídicos de grande importância para a sobrevivência destes animais, pois desempenham papéis fundamentais no metabolismo, especialmente de reserva energética (Saidapure et al., 1989; Saidapur, 2001). Em espécies que apresentam períodos de atividades curtos e relacionados à estação de chuvas ou períodos quentes, os lipídios precisam ser bem equacionados entre os gatos com reprodução e reservas (Duellman e Trueb, 1999). Um exemplo disso é que durante a maturação dos óvulos as fêmeas elevam significativamente o gasto de tecidos adiposos gonadais, podendo se observar a diminuição destas durante este período (Saidapur et al. 1989; Saidapur, 2001; Brow, 2011).

Conclusão

A avaliação dos valores de RGS, RWF, WFB e K1 ao longo dos meses onde os exemplares de *L. macrosternum* foram coletados, demonstra uma curta atividade reprodutiva para a espécie, provavelmente concentrada entre os meses de maio, junho e dezembro de 2013. Na estação chuvosa, anuros podem apresentar um maior tamanho corporal, maior taxa de crescimento, maior acúmulo de reservas energéticas, bem como um maior desenvolvimento gonadal.

Referências

- ABE, AB. 1995. Estivation in South America amphibian and reptiles. *Braz Jour Med Biol Res.* 28: 1241- 1247.
- AESA, Agência Executiva de Águas do Estado da Paraíba. 2014. Estações Agrometeorológicas. <http://pcd.aesa.pb.gov.br/> (last access on 11/08/2014).
- ABRANTES SH F, ABRANTES MMR, OLIVEIRA JCD, OLIVEIRA WM, HENRIQUES IGN, SILVA PF AND CHAVES MF. 2011. Fauna de anfíbios anuros em três lagoas da área de implantação do Horto Florestal, campus da UFCG, Cuité – PB. *Rev. Nord. Zoo*, 5 (2): 19 - 36.
- BIONDA CL, LAJMANOVICH RC, SALAS NE, MARTINO AL AND DI TADA IE. 2011. Reproductive Ecology of the Common South American Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive Effort, Clutch Size, Fecundity, and Mate Selection . *J Herpetol*, 45 (2): 261–264.

- BOJSEN BH. 2005. Diet and condition of three fish species (Characidae) of the and ean foot hills- in relation to deforestation. *Environ Biol Fishe*, 73: 61-73.
- BOTELHO MLLA, GOMIER LM AND BRAGA FMS. 2007. Feeding of *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) (Characiformes) in the Serra do Mar State Park - Santa Virgínia Unit, São Paulo, Brazil. *Braz. J Biol.* 67 (4): 741-748.
- BRAGA FMS. 1986. Estudo entre o fator de condição e relação peso-comprimento para alguns peixes marinhos. *Rev Bra Biol*, 46 (2): 339-346.
- BROWN GP, SHILTON CM AND SHINE R. 2011. Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Met Ecol Evol.* 2 (4): 341 – 348.
- BRUSLÉ J AND ANADON GG. 1996. The Structure and Function of Fish Liver. In: FISH MORPHOLOGY..., Sci Publishers, p 77-93.
- DAYTON GH AND FITZGERALDA LA. 2001 Competition, predation and distribution of four desert anurans. *Oecologica*, 129:430-435.
- DE LA RIVA I AND MALDONADO M. 1999. First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species. *Graellsia* 55: 193–197.
- DUELLMAN WE AND TRUEB L. 1999. *Biology of Amphibians*, the Johns Hopkins University press, Baltimore and London, 670 p.
- DUPONCHELLE F, LINO F, HUBERT N, PANFILI J, RENNO JF, BARAS E, TORRICO JP, DUGUE R AND NUÑEZ J. 2007. Environment- related life-history trait variations of the red-bellied piranha *Pygocentrus nattereri* in two river basins of the Bolivian Amazon. *J Fish Biol*, 71: 1113-1134.

- EBERT TA, HERNANDEZ JC AND RUSSELL MP. 2011 Problems of the gonad index and what can be done: analysis of the purple searuch in *Strongylo centrotuspurpuratus*. Mar Biol. 158:47–58.
- FRANCO-BELUSSI L, SANTOS, LRS, ZIERI R, VICENTINI CA, TABOGA SR AND OLIVEIRA C. 2012. Liver Anatomy, Histochemistry and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. Zool Sci. 29: 844-848.
- FROST, DARREL R. 2015. AmphibianSpeciesofthe World: an Online Reference. Version 6.0 (Acesso em 23/09/2015, 10h47m). Endereço eletrônico disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GIARETTA AA, MENIN M, FACURE KG, KOKUBUM MNC AND OLIVEIRA FIHO JC. 2008. Species richness, relative abundance and habitat of reproduction of terrestrial frogs in the Triângulo Mineiro region, Cerrado biome, Southeastern Brazil. Iheringia, Série Zoologia, 98(2):181-188.
- GOMIERO LM, VILLARES-JUNIOR, GA AND BRAGA FMS. 2010. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. Biota Neotrop 10 (1):101-105.
- GRORUD-COLVERT K. AND SPONAUGLE S. 2006. Influence of condition on behavior and survival potential of a new lysettled coral reef fish, the blue head wrasse *Thalassoma bifasciatum*. Mar Eco Prog Series. 327: 279-288.
- HIPOLITO M, LEME MCM AND BACH EE. 2001. Lesões anátomo-histopatológicas em rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) associadas à deterioração da ração. Arq. Inst. Biol. .68(1):111-114
- HOCKEY PAR AND CURTIS OE. 2009. Use of Basic Biological Information for Rapid Prediction of the Response of Species to Habitat Loss. Conserv Biol, 23(1): 64-71.

- HUANG WS, LIN JY AND YU JYL. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zool Sci*, 14: 497-503.
- KORTET R AND TASKINEN J. 2004. Parasitism, condition and number of front head breeding tubercles in roach (*Rutilus rutilus* L.). *Ecol Fres Fish*, 13: 119-124.
- LIMA-JUNIOR SE, CARDONE IB AND GOITEIN, R. 2002 Determination of a method for calculation of Allometric Condition Factor of fish. *Acta Scientiarum, Maringá*,24: 397-400
- NAVARRO RD, RIBEIRO FILHO OP, YASUI GS, MACIEL ECS AND SANTOS LC. 2005. Efeito do hormônio 17- α -metil-testosterona nos índices somáticos de *Rana catesbeiana*. *Zoo Trop* 23: 319-325
- OLIVEIRA C AND ZIERI R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. *Rev Bras Zoo*, 22(2): 454-460.
- RODRIGUES MT. 2003. Herpetofauna da caatinga. In: ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA CAATINGA. Universidade Federal de Pernambuco, ed. Universitária. p 181-236.
- ROSSA-FERES DC AND JIM J. 1994. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia: Anura). *Rev Bras Biol*, 54(2):323-334.
- SAIDAPUR SK. 1989. Reproductive cycle of Amphibians: in Reproductive cycles of Indian vertebrates. Ed SK Saidapur. New Delhi. Allied Press: p 165-223.
- SAIDAPUR SK. 2001. Behavioral ecology of Anuran Tadpoles: The Indian scenario. *Proc Indian Natn Sci Acad (Pinsa) B* 67,(06): 311-322

- SANTOS TG, ROSSA-FERES, DC AND CASATTI, L. 2007. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 97 (1):37-49.
- SATAKE F, ISHIKAWA MM, HISANO H, PADUA SB, TAVARES-DIAS M. AND TAVARES-DIAS M. 2009. Relação peso-comprimento, fator de condição e parâmetros hematológicos do dourado *Salminus brasiliensis* cultivados em condições experimentais. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Ed 1. EMBRAPA, 22 p.
- TOLEDO LF, GAREY MV, COSTA TRN, LOURENÇO-DE-MORAES R, HARTMANN M AND HADDAD CF. 2012. Alternative reproductive modes of Atlantic forest frogs. *J Etho*, 130: 331–33
- VAZZOLER AEAM. 1982. Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes. Reprodução e crescimento. Brasília, Publ. do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 106 p.
- VAZZOLER AEAM. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: NUPELIA, 169 p.
- ZAR JH. 1999. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 663p.

Artigo submetido à The Herpetological Journal

ISSN: 0268-0130 (Print)

Biologia reprodutiva de fêmeas de *Leptodactylus Macrosternum* (Anura, Leptodactylidae)

Reproductive biology of *Leptodactylus macrosternum* females (Anura, Leptodactylidae)

**Marcio Frazão Chaves^{1,5*}; Geraldo Jorge Barbosa de Moura²; Fernanda das Chagas Angelo
Mendes Tenório³; Josemberg da Silva Baptista⁴; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto⁵; Valeria
Wanderley Texeira⁵; Álvaro Aguiar Coelho Texeira⁵**

¹Unidade Acadêmica de Biologia e Química, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Olho d'água da Bica, s/n, Cuité, PB, CEP- 58175-000, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP- 52171-900, Brasil

³Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Moras Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife- PE, CEP- 5067901, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, n. 1468 Maruípe, CEP- 29040-090, Vitória, ES, Brasil

⁵Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP- 52171-900, Brasil

Biologia reprodutiva de fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae)

Abstract- In tropical regions with severe seasonal variations, the reproductive activity of many species involves a number of physiological and behavioral adjustments. These adjustments result in control of the reproductive cycle for the production of offspring in a period of the most appropriate year for the survival of the majority. In frogs, the physical environmental conditions that most influence the occurrence of reproductive activity is the interaction between the temperature and pluviometric index of the area of occurrence of these animals. Thus, this study aims to evaluate possible changes in histologic and morphometric parameters of the ovaries as well, in estrogen and progesterone of *Leptodactylus macrosternum* females and their relationships with temperature and precipitation. The specimens were collected in the area of Horto Florestal Olho d'Água da Bica - HFOB (06 ° 49'20 "S / 36 ° 15'85"W), municipality of Cuité- Paraíba, through active search at nocturnal expeditions held every 15 days from January to December 2013. The quantification of population density of oocyte types and dosages of progesterone and estrogen levels were used to determine the reproductive activity of the species. The dependence between climate variables (rainfall and temperature), and the density of oocytes III and IV was verified by the simple linear regression test. The population density of the types of oocytes III and IV showed dependence on the variation in rainfall and temperature of the region, determining to the species a short breeding season. Thus, we can say that *L. macrosternum* has a reproductive cycle of the potentially continuous type.

KEYWORDS. oocyte, seasonal variation, sex hormones, semiarid, frogs.

Resumo- Em regiões tropicais com intensas variações sazonais, a atividade reprodutiva de muitas espécies envolve uma série de adequações fisiológicas e comportamentais, resultando no controle do ciclo reprodutivo para a produção da prole em um período do ano mais adequado a sobrevivência da maioria. Desta forma, este trabalho objetiva avaliar possíveis alterações nos parâmetros histológicos e morfométricos dos ovários bem como, nos níveis de estrógeno e progesterona de fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* e suas relações com a temperatura e precipitação. As coletas ocorreram entre janeiro e dezembro de 2013 no Horto Florestal Olho d'Água da Bica-HFOB (06°49'20''S/36°15'85''W), estado da Paraíba-BR, através de busca ativa, sendo duas expedições noturnas por mês. A quantificação da densidade populacional dos tipos de ovócitos e as dosagens dos níveis de progesterona e estrogênio foram utilizadas para determinar a atividade reprodutiva da espécie. A dependência entre as variáveis climáticas (precipitação e temperatura), e a densidade dos tipos ovocitários foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Foram registrados animais entre os meses de maio a agosto e novembro a dezembro. As densidades populacionais das ovogônias e ovócitos II não variaram significativamente durante os meses em que os animais foram amostrados. A densidade populacional dos ovócitos I foi significativamente maior nos meses de junho ($p=0,04$) e agosto ($p=0,03$) de 2013. Os maiores valores para a densidade populacional dos ovócitos III e ovócitos IV foram encontrados para os meses de maio ($p=0,04$) e junho ($p=0,04$) de 2013. Os valores das concentrações de estrógeno (pg/mL) e progesterona (pg/mL) não apresentaram variações significativas ao longo dos períodos de amostragens. A densidade populacional dos tipos de ovócitos III ($r=0,11$; $p=0,04$) e IV ($r=0,16$; $p=0,04$) demonstraram dependência com a variação da precipitação (Ov3: $r=0,11$; $p=0,04$ e Ov4: $r=0,16$; $p=0,04$) e temperatura (Ov3: $r=0,27$; $p=0,01$ e Ov4: $r=0,19$; $p=0,03$) da região, determinando para a espécie um curto período reprodutivo.

PALAVRAS-CHAVE. ovócitos, variação sazonal, hormônios sexuais, semiárido, anuros.

Introdução

Fatores que determinam o sucesso reprodutivo dos vertebrados envolvem a adaptação de seus ciclos reprodutivos ao ambiente em que vivem (HADDAD & PRADO, 2005). Em regiões tropicais, onde as variações climáticas são imprevisíveis, a adaptação a esses ambientes requer controles do ciclo reprodutivo para a produção da prole em um período do ano mais adequado a sobrevivência da maioria (TABORSKY et al. 2008; TABORSKY & BROCKMANN, 2010). Desta forma, os organismos percebem as variações ambientais e promovem ajustes fisiológicos para determinar os seus ciclos reprodutivos de acordo com as condições ambientais necessárias (DUELLMAN, 1985; POMBAL Jr. & HADDAD, 2005).

No que se refere especificamente aos anfíbios anuros, as condições físicas do ambiente que mais interferem na ocorrência de sua atividade reprodutiva são a temperatura do ar e a umidade relativa: ambas altamente relacionadas ao índice pluviométrico (SASSO-CERRI et al, 2004). Entretanto, o período reprodutivo pode ocorrer também na estação seca, quando há disponibilidade de ambientes apropriados como os corpos d'água permanentes (BASTOS et al.,2003). Estes fatores associados ao ritmo endógeno são responsáveis pelo controle da gametogênese em diversas espécies de anuros (SASSO-CERRI et al 2004).

Em regiões semiáridas, a ocorrência e a reprodução da maioria das espécies estão associadas a estação chuvosa (PRADO et al.,2000; BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002). Sendo assim, estas variáveis determinam a época favorável do ano em que os anuros se mantêm ativos, determinando a sua distribuição estacional (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Nessas áreas, os maiores picos de produção de hormônios sexuais coincidem com a preparação fisiológica para o período reprodutivo (WILCZYNSK et al, 2005), onde as maiores taxas de produção de andrógenos determinam o desenvolvimento das características sexuais

secundárias, a manutenção do comportamento sexual e o start da gametogênese dos anuros (MOORE, 2005).

Como modelo biológico para testar a hipótese da influência das variações estacionais na dinâmica reprodutiva de anuros em áreas do bioma Caatinga, destaca-se a espécie *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926), pois por ser amplamente distribuída no semiárido, apresenta comportamento generalista e bem adaptada às áreas perturbadas (DE LA IVÃ & MALDONADO, 1999), no nordeste é alvo de caça para fins alimentícias (ALVES et al., 2009) e utilizada algumas vezes para fins de produção como alternativa ao uso de espécies exóticas na ranicultura (eg.: *L. catesbiana*, Shaw 1802) (CUNHA & DELARIVA, 2009). Desta forma, este trabalho objetivou avaliar possíveis alterações nos aspectos histológicos dos ovários e nos níveis de estrógeno e progesterona em fêmeas da espécie alvo (*L. macrosternum*) e suas relações com as variações das chuvas e temperatura da área de estudo.

Material e Métodos

Área de estudo e amostragem. Para verificar a atividade reprodutiva das fêmeas de *L. macrosternum*, foram realizadas expedições noturnas quinzenais no período entre janeiro e dezembro de 2013. As fêmeas de *L. macrosternum* foram coletadas manualmente na área do Horto Florestais Olho d'Água da Bica-HFOB (06°49'20''S/36°15'85''W) localizada no município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil (Figura 1), com prévia autorização do IBAMA (44134-1). Os espécimes coletados foram depositados na Coleção de Herpetologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE.

A área do HFOB está situada no domínio das caatingas brasileiras e caracteriza-se por apresentar clima quente e seco, com temperatura oscilando entre 17° e 28°C, pluviosidade média mensal de 76,35 mm e umidade relativa em torno de 70%. Possui uma hidrografia peculiar, com rios efêmeros, açudes, córregos, barragens, áreas úmidas e áreas de encosta de onde brota a

nascente d'água; a região é composta de 70 hectares de caatinga arbórea e arbustiva (ABRANTES et al 2011).

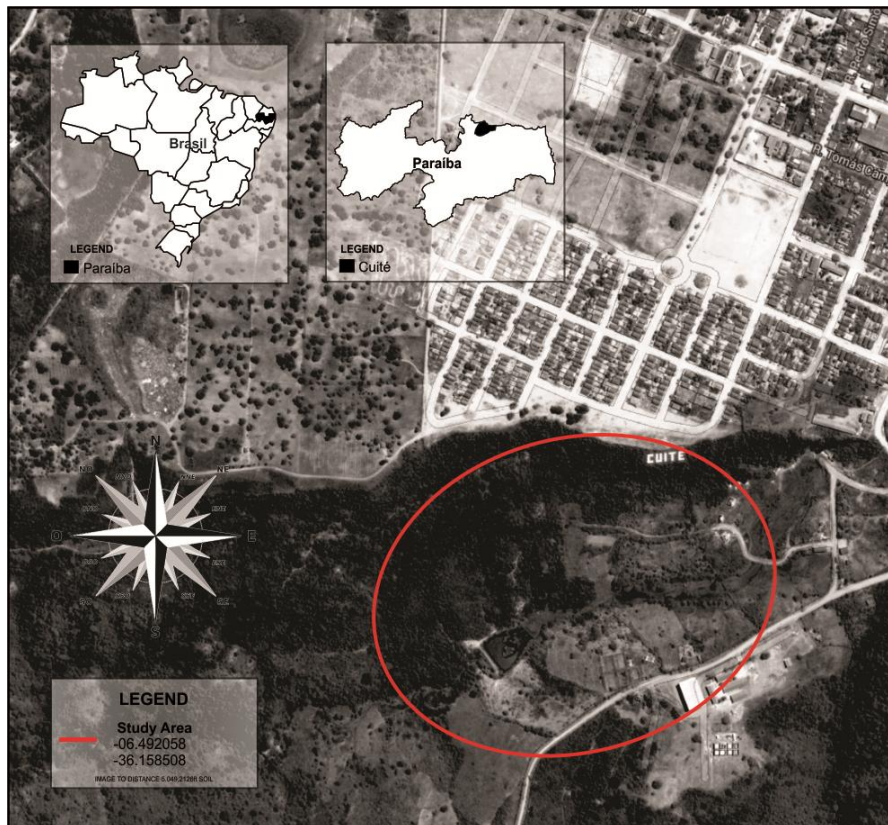


Figura 1- Localização dos pontos de amostragem de *L. macrosternum* inseridos na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), Município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil; entre janeiro a dezembro de 2013.

Os dados meteorológicos mensais de temperatura (°C), e pluviosidade (mm) foram adquiridos através do banco de dados do Centro de Agencia Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESA), através da estação meteorológica vizinha do local de amostragem.

Análise Histológica. Os animais foram levados ao Laboratório de Biossistemática de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cuité, estado da Paraíba, Brasil, os quais foram eutanasiados através de hiperdosagem de anestésico (lidocaína 5%). Com a utilização de materiais cirúrgicos oftalmológicos procedeu-se a dissecação e remoção dos ovários.

Os ovários foram fixados em solução de formalina 10% por 24 horas e depois desidratados em série crescente de álcool (HOPWOOD, 1990). A inclusão foi procedida com parafina e secções transversais de 5µm para obtenção dos cortes que posteriormente foram corados com Hematoxilina e Eosina- H/E (ROBINSON & GRAY, 1990). A análise qualitativa foi procedida em microscópio convencional, trinocular e de bancada (Olympus AX70, Tóquio, Japão – Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo), acoplado a um sistema digital de aquisição de imagem (câmera ERc 5s e Axiovision 6.3, Carl Zeiss, Jena, Alemanha - UFES). A quantificação dos tipos de ovócitos foi realizada através do método de densidade populacional numa área teste de 88mm² (Axiovision 6.3, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Os tipos celulares foram identificados de acordo com trabalhos descritos por PRADO et al., (2004) e OLIVEIRA & SANTOS (2004).

Dosagem hormonal. As amostras de sangue foram coletadas com seringas previamente heparinizadas (solução 0,1% Liquemine-Roche). Após as coletas as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga para micro hematócrito de 1,5 mL, prosseguindo à centrifugação a frio por 10 minutos a uma rotação de 300 rpm. Após centrifugação, o plasma foi separado em novos tubos e armazenado em freezer a -20°C. As dosagens dos níveis de progesterona e estrogênio foram realizadas através do método ELISA.

Análise dos dados. Os valores da densidade das células da linhagem reprodutiva e dos níveis de progesterona e estrogênio foram analisados entre os meses que ocorreram coletas pelo teste de Kruskal- Wallis com aplicação a posteriori do teste de Dunn.

A dependência entre as variáveis climáticas (precipitação e temperatura), densidade populacional das ovogônias e ovócitos foi verificada por meio do teste de regressão linear simples. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como referência para se atribuir significância estatística ZAR (1999).

Resultados

Ao final das coletas, foram amostradas 24 fêmeas de *L. macrosternum*, distribuídas entre os meses de maio (4 indivíduos), junho (4 indivíduos), julho (5 indivíduos), agosto (4 indivíduos), novembro (3 indivíduos) e dezembro (4 indivíduos) de 2013, coincidindo com os meses que apresentou chuvas na região. Nos meses entre janeiro-abril e setembro-outubro não foram avistados indivíduos de *L. macrosternum* durante as saídas de campo.

Foi possível verificar todos os tipos celulares que constituem os ovários de *L. macrosternum* (Figura 2). As ovogônias (Figura 2 A) foram confirmadas como as menores células da linhagem ovogênica; localizam-se na periferia e organizam-se em agrupamentos. Os ovócitos I (Figura 2 B) apresentam um volume celular um pouco maior que as ovogônias com mais citoplasma volumoso, de aspecto levemente granuloso e basófilo, com núcleo grande, claro e de contorno bem definido.

Os ovócitos II (Figura 2 B) apresentaram citoplasma abundante, de aspecto mais granuloso e menos basófilo em comparação com os ovócitos I, apresentando também um núcleo grande com nucléolo bem evidente e cromatina dispersa,

Os ovócitos III (Figura 2 B) caracterizaram-se pelo aumento de vitelo, com aspecto claro nas colorações com H/E e acúmulo crescente de grânulos eosinófilos (grânulos de vitelo), que ocuparam grande parte de sua extensão. O núcleo é grande, granuloso, centralizado e levemente basófilo.

Os ovócitos IV (Figura 2 C) são as maiores células dos tipos ovocitários presentes nos ovários de *L. macrosternum*. Nesta fase de desenvolvimento foi nítido o processo de polarização celular (pólos animal e vegetal). O núcleo é grande deslocando-se em direção ao pólo animal, apresentando em seu interior nucléolo grande, entremeados à cromatina que por sua vez, apresentaram um aspecto levemente basófilo. Já o citoplasma apresentou intenso processo vitelogênico (pólo vegetal) que permanece cheio vitelo, com aspecto acidófilo.

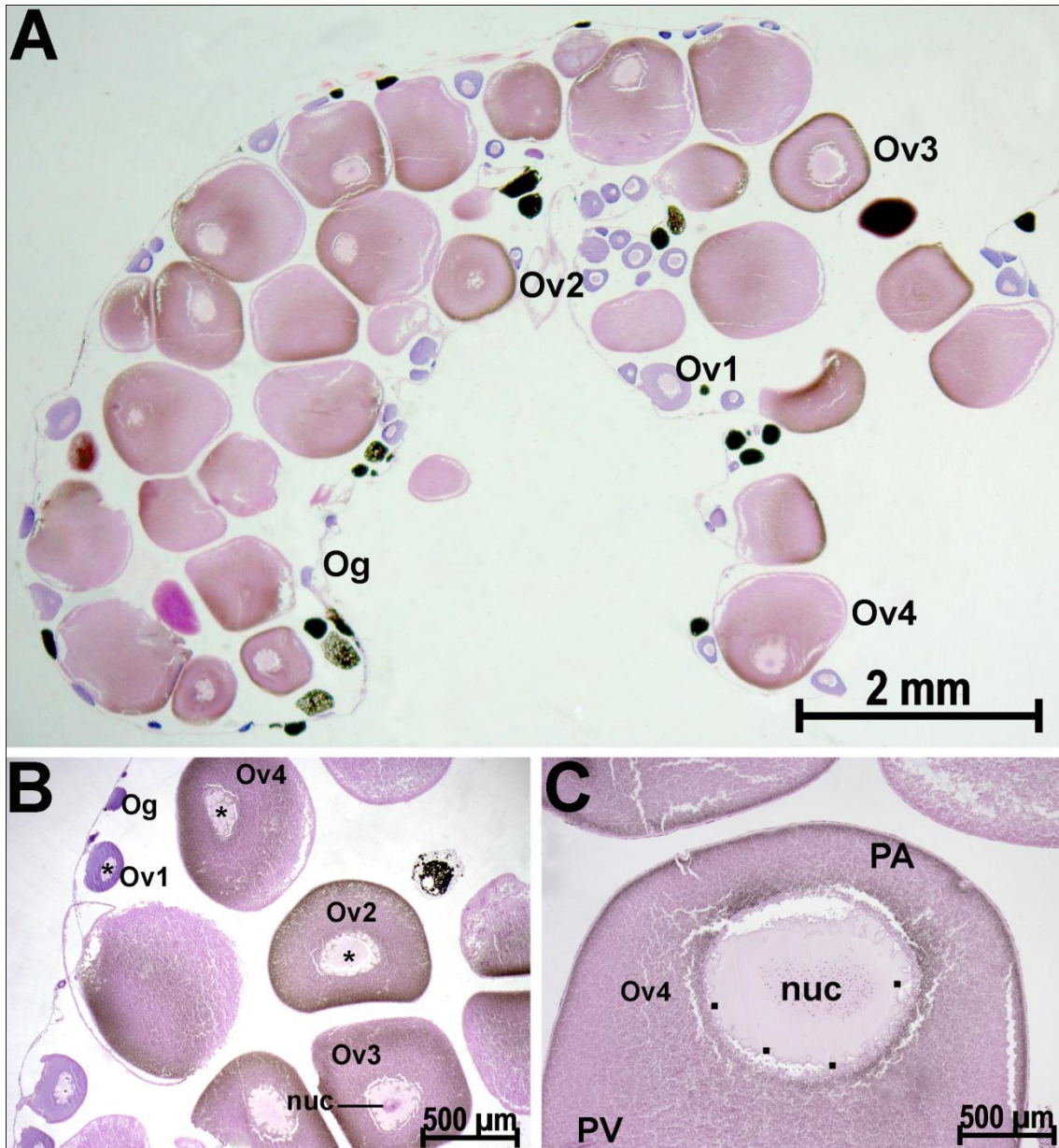


Figura 2. Cortes histológicas corado em HE dos ovários de *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba-Brasil. [A- Corte transversal do ovário de *Leptodactylus macrosternum* (H/E); Ovogônias (Og), ovócitos I (Ov1), ovócitos II (OV2), ovócitos III (Ov3) e ovócito IV (Ov4); B- Detalhe do ovócito I (Ov1), *- núcleo; Detalhe do ovócito II (Ov2), *- núcleo, --- cromossomos dispersos na periferia da carioteca; Detalhe do ovócitos III, *- núcleo, nuc- nucléolo; C- Detalhe do ovócito IV(Ov4), PA- pólo animal, PV- pólo vegetal, n- núcleo, nuc- nucléolo.]

As densidades das populações celulares ovocitárias apresentaram variações significativas ($p < 0,05$, Kruskal- Wallis) ao longo dos meses de coleta (Tabela 1). As densidades populacionais das ovogônias e ovócitos II não variaram significativamente durante os meses em que os animais foram amostrados. A densidade populacional dos ovócitos I foi significativamente maior nos meses de junho ($p= 0,04$) e agosto ($p= 0,03$). Os maiores valores para a densidade populacional dos ovócitos III e ovócitos IV foram encontrados para os meses de maio ($p=0,04$) e junho ($p=0,04$) de 2013.

Tabela 1- Valores mensais (média e erro padrão) da densidade populacional (mm^2) de células presentes nos ovários da espécie *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba- Brasil. N- número mensal de fêmeas; Og- ovogônias; Ov1- ovócitos I; Ov2- ovócitos II; Ov3-ovócitos III; Ov4- ovócito IV. *valores estatisticamente significativos

| | N | Og | Ov I | Ov II | Ov III | Ov IV |
|------------|---|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Mai | 4 | 0,03± 0,01 | 0,09± 0,02 | 0,03± 0,01 | 0,21± 0,03* | 0,14± 0,02* |
| Jun | 4 | 0,02± 0,01 | 0,18± 0,02* | 0,06± 0,01 | 0,17± 0,01* | 0,15± 0,01* |
| Jul | 5 | 0,01± 0,01 | 0,03± 0,01 | 0,02± 0,01 | 0,05± 0,01 | 0,08± 0,05 |
| Ago | 4 | 0,01± 0,01 | 0,14± 0,01* | 0,05± 0,01 | 0,09± 0,01 | 0,06 ± 0,01 |
| Nov | 3 | 0,02± 0,01 | 0,12± 0,01 | 0,05± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 0,07± 0,02 |
| Dez | 4 | 0,01± 0,01 | 0,06 ± 0,02 | 0,02± 0,01 | 0,05 ± 0,02 | 0,07± 0,02 |

Os valores das concentrações de estrógeno (pg/mL) e progesterona (pg/mL) não apresentaram variações significativas ao longo dos períodos de amostragens ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis). Os níveis de Estrógeno (pg/mL) variaram entre 25 a 27 pg/mL entre os meses de maio e dezembro de 2013 (Figura 3 A). Os níveis de Progesterona variaram entre 43 a 45 pg/mL entre os meses de maio e dezembro de 2013 (Figura 3 B).

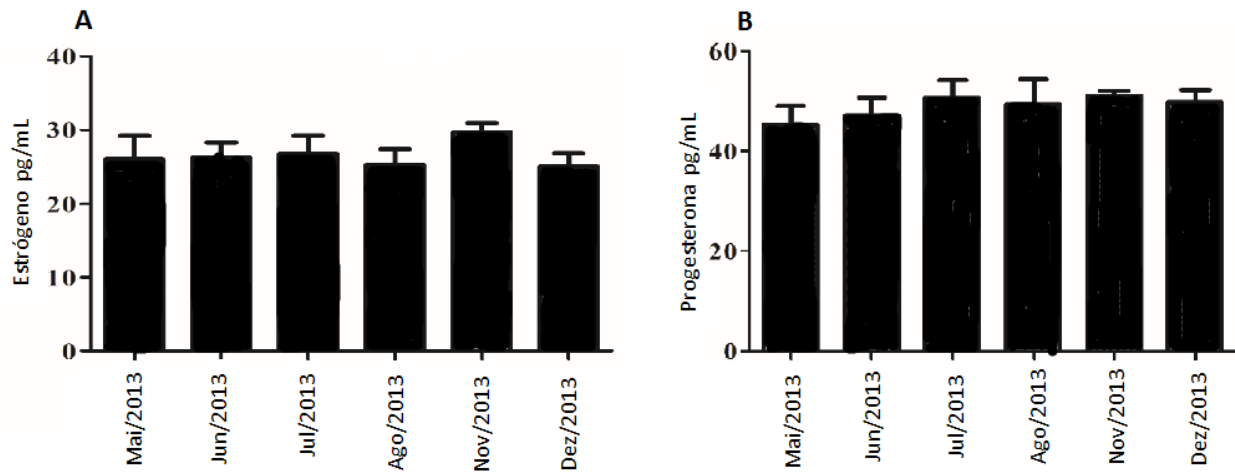


Figura 3 –A- Valores mensais (média e erro padrão) dos níveis de estrógeno (pg/mL) e; B- progesterona (pg/mL) de fêmeas da espécie *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba- Brasil.

Como observado na Tabela 2, apenas a densidade populacional dos ovócitos III ($r = 0,11$; $p = 0,04$) e ovócitos IV ($r = 0,16$; $p = 0,04$) apresentaram relações significativas com os níveis de precipitação da área do HFOB. Da mesma forma, foram observadas relações significativas entre a variação da temperatura da área do HFOB e densidade populacional dos ovócitos III ($r = 0,27$; $p = 0,01$) ovócitos IV ($r = 0,19$; $p = 0,03$).

Tabela 2 –Relações entre a densidade populacional de ovogônia (Og); ovócito I (Ov1); ovócito II (Ov2); ovócito III (Ov3) e ovócito IV (Ov4) em fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* em relação a precipitação e a temperatura na área do Horto Florestal Olho d Água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013.

| | Precipitação | | Temperatura | |
|------------|--------------|------|-------------|------|
| | R | P | R | P |
| Og | 0,04 | 0,4 | 0,04 | 0,77 |
| Ov1 | 0,02 | 0,7 | 0,01 | 0,2 |
| Ov2 | 0,21 | 0,5 | 0,05 | 0,5 |
| Ov3 | 0,11 | 0,04 | 0,27 | 0,01 |
| Ov4 | 0,16 | 0,04 | 0,19 | 0,03 |

Discussão

A identificação e caracterização das células presentes nos ovários da espécie *L. macrosternum* foram semelhantes às observadas na literatura: HERMOSILLA et al., (1983) avaliando os ovários de *Caudiverbera caudiverbera* (Linnaeus, 1758); OLIVEIRA & ANDRADE (1997) em trabalhos avaliando os ovários de *Scinax fuscovarius* (Peters, 1871); PRADO et al., (2004) em trabalhos com os ovários de *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824); OLIVEIRA & SANTOS (2004) avaliando os ovários de *Scinax fuscovarius*; AZZOUZI & TEKAYA, (2007) em trabalhos realizados com o gênero *Dicoglossus*. Logo, pode-se perceber que essas características são bastante conservativas em anuros, uma vez que espécies diferentes e filogeneticamente distantes mostram-se similares.

Neste estudo, os baixos níveis de precipitação observados associados às altas temperaturas registradas para o ano de 2013 (AESAs, 2014) são fatores que justificam a ausência e a baixa amostragem das fêmeas de *L. macrosternum*. A ocorrência e a reprodução da maioria das espécies

de anuros estão associadas à presença de chuvas, determinando assim este padrão de distribuição dos anuros (PRADO et al.2000; BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002).

Os baixos volumes de chuvas bem como as altas temperaturas são fatores que controlam as populações de anuros em seus ambientes (PRADO et al., 2000; BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002;). Em áreas de caatinga a imprevisibilidade e distribuição temporal e espacial das chuvas, agravadas muitas vezes por temperaturas anuais elevadas (VELLOSO et al., 2002; RODRIGUES, 2003; AB'SABER, 2005) são fatores que afetam diretamente o início e a duração da estação reprodutiva dos anuros (GOTTSBERGER & GRUBER, 2004). Nestas áreas são esperadas adaptações por partes das populações de anuros tais como atividade reprodutiva concentrada na estação chuvosa com curtos períodos de reprodução (ARZABE, 1999).

Desta forma, a concentração das maiores médias dos ovócitos em estágio mais avançado de diferenciação (ovócitos III e IV) nos meses de maio e junho (meses com os maiores taxas de precipitação e temperatura mais amenas da área do HFOB) confirmam que *L. macrosternum* apresenta um curto período reprodutivo, com picos gametogênicos concentrado nos meses de maio e junho tendo o mês de julho como o de maior potencial reprodutivo. Na estação chuvosa, anuros podem apresentar um maior desenvolvimento gonadal bem como maior tamanho corporal, maior taxa de crescimento e maior acúmulo de reservas energéticas (BROWN et al., 2011).

Em regiões tropicais de clima sazonal, a atividade reprodutiva de anuros está relacionada ao período chuvoso (SANTOS & OLIVEIRA, 2008), corroborando que o fato da ausência de registros entre os meses de janeiro a abril, período seco da região, que destaca-se pelas menores taxas de umidade e precipitação zero na macroregião Curimataú do estado da Paraíba.

Contudo, observando a ocorrência destes folículos ovarianos nos meses de agosto, novembro e dezembro de 2013 na área de estudo, é possível afirmar que nesse período ocorreu graus distintos de fecundidade, não parando completamente sua atividade reprodutiva, em relação aos outros meses aferidos por esse estudo, muito embora não tenha ocorrido captura desses espécimes nos meses de setembro e outubro de 2013. Desta forma, é lícito afirmar que em

ambientes sazonais esses animais apresentam produção constante da gametogênese, contudo com interrupção parcial desta atividade quando os ambientes de ocorrência destes animais não apresentam as melhores condições climáticas para a atividade reprodutiva. Desta forma, esta informação corrobora com os trabalhos LOFT (1974) que classifica este tipo de ciclo reprodutivo como “potencialmente contínuo” e típico de ambientes tropicais sazonais.

Apesar dos valores das concentrações de estrógeno e progesterona não apresentarem variações significativas nos meses amostrados, presume-se que estes hormônios estão constantemente relacionados ao processo de maturação gonadal, independentemente dos demais fatores. Este fato confirma a hipótese de que o processo de maturação gamética desses animais, em áreas de caatinga, sofrem interrupção no seu processo de desenvolvimento. Trabalhos realizados por SCHERER (1999); MOORE (2005) demonstraram que em anfíbios, os esteróides sexuais exercem um importante papel no desenvolvimento gonadal e na maturação dos oócitos.

A análise de regressão linear foi efetiva para ratificar a relação entre as densidades dos folículos ovarianos em estágio mais avançado de desenvolvimento (ovócitos III e IV) com os níveis de chuvas e médias mensais de temperatura confirmam que *L. macrosternum* apresenta ciclos reprodutivos curtos. A variação das médias mensais de temperatura apresentou relação significativa tanto com a densidade dos ovócitos III quanto com os ovócitos IV confirmando que em áreas de caatinga as variações de temperatura são determinantes na atividade reprodutiva destes animais.

Desta forma, em ambientes onde a sazonalidade é expressiva as condições físicas do ambiente que mais interferem na atividade reprodutiva dos anuros é a relação entre a temperatura do ar e o índice pluviométrico (JIM, 1980; SASSO-CERRI et al. 2004), determinando desta forma, a época favorável do ano em que os anuros se mantêm ativos, bem como a sua distribuição estacional, limitando vários aspectos de vida dos anuros influenciando os seus padrões reprodutivos e determinando o seu ciclo de vida. (DUELLMAN & TRUEB, 1994; MOORE, 2005), aprovando a hipótese inicial da pesquisa.

Especificamente nesses animais e na região e no período estudado, os processos de maturação ovocitária são determinados pelos padrões climáticos, estando a atividade reprodutiva da espécie classificada como “potencialmente contínua”, entretanto, com um pico gametogênico delimitado entre 30-60 dias nos meses de maio e junho.

Referências

- Ab'saber, A.N. (2005). Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas. São Paulo. Ateliê Editorial. 153p.
- Abrantes, S. H. F., Abrantes, M. M. R., Oliveira, J. C. D., Oliveira, W. M., Henriques, I. G. N., Silva, P. F., Chaves, M. F. (2011). Fauna de anfíbios anuros em três lagoas da área de implantação do Horto Florestal, campus da UFCG, Cuité – PB. *Revista Nordestina de Zoologia* **5**, 19 - 36.
- AESA, Agência executiva de águas do estado da Paraíba. 2014. Estações Agro meteorológicas. <<http://pcd.aesa.pb.gov.br/>> accessed in: 11.08.2014.
- Alves, R.R.N., Mendonça, L.E.T., Confessor, M.V.A., Vieira, W.L.S., Lopez, L.C.S., (2009). Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **5**, 1-50.
- Arzabe, C. (1999). Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia* **16** (3), 851-864.
- Azzouzi, K. & Tekaya, S. (2007). Adaptation aux facteurs climatiques de l'ovogenèse chez le discoglosse en Tunisie (AMPHIBIEN, ANOURE). *Bulletin de la Société Zoologique de France* **132**(1-2), **57**-66.
- Bastos, R. P., Motta, J. A. O., Lima, L. P., Guimarães, L. D. (2003). Anfíbios da floresta nacional de Silvânia, Estado de Goiás. Stylo. Goiânia, 82p.

- Bertoluci, J. & Rodrigues, M. T. (2002). Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* **23**, 161-167.
- Brown, G. P., Shilton, C. M., Shine, R. (2011). Measuring amphibian immune competence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. [*Methods in Ecology and Evolution* **2**\(4\), 341 – 348.](#)
- Cunha, E. R. & Delariva, R. L. (2009). Introdução da rã-touro, *Lithobates cetesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. *Revista Saúde e Biologia* **4**(2), 34-36.
- De La Riva, I. & Maldonado, M. (1999). First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species. *Graellsia* **55**, 193–197.
- Duellman, W.E. (1985). Reproductive modes in anuran amphibians: phylogenetic significance of adaptive strategies. *South Africa Journal Science* **81**, 174-178.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. Baltimore: The John Hopkins University Press, 670 p.
- Gottsberger, B. & Gruber, E. (2004). Temporal partitioning of reproductive activity in a neotropical anuran community. *Journal of Tropical Ecology* **20**(3), 271-280
- Haddad, C. B. F. & Prado, C. P. A. (2005). Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *Bioscience* **55**, 207–217.
- Hermosilla, I. B., Coloma, L. S., Weigertt, G. H., Reyes, E.T., Gomez, V. O. (1986). Caracterización Del ovario de la "rana Chilena" *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* **57**, 37-47.
- Hopwood, D. (1990). Fixation e fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practice of histological techniques*. New York, Churchill Livingstone, 3rd ed., pp 21-42.
- Lofts, B. 1974. Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. *General and Comparative Endocrinology* **4** (2), 550-562.

- Madelaire, C.B. & Gomes, F.R. (2016) Breeding Under Unpredictable Conditions: Annual Variation in Gonadal Maturation, Energetic Reserves and Plasma Levels of Androgens and Corticosterone in Anurans From the Brazilian Semi-Arid, *General and Comparative Endocrinology*, doi: [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.ygcen.2016.01.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.011)
- Moore, F. L., Boydb, S. K., Kelleyc, D. B. (2005). Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Hormones and Behavior* **48**, 373 – 383.
- Oliveira, C., Andrade, U. J. A. 1997. Anatomia dos ovários e corpos adiposos de *Scinax fuscovaria* (Anura, Hylidae). *Acta Biologica Leopoldensia* **19**(2), 173-183.
- Oliveira, C. & Santos, L. R. S. 2004. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **21**(4), 919–923
- Prado, C. P. A. & Uetanabaro, M. (2000). Reproductive biology of *Lysapsus limellus* Cope, 1862 (Anura, Pseudidae) in the pantanal, Brazil. *Zoocriaderos* **3**(1), 25-30.
- Prado, C. P. A., Abdalla, F. C., Silva, A. P. Z., Zina, J. (2004). Late Gametogenesis In *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. *Brazilian Journal of morphological Science* **21**(4), 177-184.
- Robinson, G. & Gray, T. (1990). Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining. *In: Bancroft, J. D., Stevens, A., Foreword B. Y., David, R. T. Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. Edinburgh London Melbourne and New York, p. 525-562.
- Rodrigues, M. T. (2003). Herpetofauna da caatinga. *In: Leal, I. R. ; Tabareli, M., Silva, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga*. Universidade Federal de Pernambuco, ed. Universitária. p. 181-236.
- Scherer, G. (1999). Introduction: vertebrate sex determination and gonadal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**, 821–823
- Sasso-Cerri, E., Faria, F.P., Freymuller, E., Miraglia, S.M. (2004). Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the Bulfrog *Rana catesbiana*. *Journal of Experimental Zoology* **301**, 249-260.

Santos, L.R. & de Oliveira, C. (2008). Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron* **39**: 1266–1270.

doi:10.1016/j.micron.2008.03.006

Taborsky, M., Oliveira, R. F., Brockmann, H. J. (2008). The evolution of alternative reproductive tactics: concepts and questions. *In*: Oliveira, R.F.; Taborsky, M., Brockmann, H. J. (eds) *Alternative reproductive tactics: an integrative approach*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 1–21

Taborsky, M., Brockmann, H. J. (2010). Alternative reproductive tactics and life history phenotypes. *In*: Kappeler, P. (ed) *Animal behaviour: evolution and mechanisms*. Springer, Heidelberg. p. 537–586.

Wilczynski, W., Lynch, K. S., O'Bryant, E. L. (2005). Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Hormone and Behavior* **48**, 440 - 450.

Velloso, A. L. E., Sampaio V. S. B., Frans, G. C. (2002). Ecorregiões propostas para o bioma Caatinga. Associação plantas do nordeste; Instituto de conservação ambiental The Nature Conservancy do Brasil. 110 p.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 663 p.

Artigo submetido a Zoologia

ISSN: 984-4670 *versão online*

INFLUENCIA DA PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA NA ESPERMATOGÊNESE DE

Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

INFLUENCE OF RAINFALL AND TEMPERATURE ON THE SPERMATOGENESIS OF

Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

Marcio Frazão Chaves^{1,5*}; Geraldo Jorge Barbosa de Moura²; Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório³; Josemberg da Silva Baptista⁴; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto⁵; Valeria Wanderley Texeira⁵; Álvaro Aguiar Coelho Texeira⁵

¹Unidade Acadêmica de Biologia e Química, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Olho d'água da Bica, s/n, Cuité, PB, CEP- 58175-000, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP- 52171-900, Brasil

³Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Moras Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife- PE, CEP- 5067901, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP- 52171-900, Brasil

INFLUENCIA DA PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA NA ESPERMATOGÊNESE DE

Leptodactylus macrosternum (ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

ABSTRACT

In the semi-arid environment, the reproductive success of anurans depends on adaptations of its cycle of life, which, synchronized with the environment's ideal conditions, maximize the number of offspring. Therefore, the aim of this study is to characterize changes in the histologic and morphometric aspects of *Leptodactylus macrosternum* testes as well as to evaluate the influence of rainfall and temperature related to the aforementioned analyzed aspects. Specimens were collected in the Horto Florestal Olho d'Água da Bica - HFOB (06°49'20''S/36°15'85''W) area in the municipality of Cuité, state of Paraíba, every 15 days through active search in night expeditions from January to December 2013. The densities of spermatids (primary and secondary), sperm and area of the seminiferous locules of *L. macrosternum* testes were registered. The influence of climate variables (rainfall and temperature) in relation to the density of primary and secondary spermatids, sperm and locular area was verified using a Simple Linear Regression test. Registers, and consequently collections, only occurred between the months of May to August and November to December. Primary spermatids presented the lowest density in July ($57,90 \pm 51,54 \text{ mm}^2$), with a peak in November ($300,32 \pm 117,35 \text{ mm}^2$); secondary spermatids showed lowest density in December ($287,87 \pm 79,05 \text{ mm}^2$), with a peak in May ($135727, \pm 301,13 \text{ mm}^2$); sperm presented lowest density in July ($237,37 \pm 121,1 \text{ mm}^2$), with a peak in June ($2270,45 \pm 602,62 \text{ mm}^2$) and locular area showed lowest density in December ($40292,9 \pm 8174,2 \text{ }\mu\text{m}^2$) and highest density in

June ($338875,01 \pm 2262, 1 \mu\text{m}^2$). An expressive decrease in sperm density is evident between the months of June and July which, associated to the larger locular area in June, allows us to identify this month as the peak of spermatogenesis and the following month as the most potentially reproductive. The density of secondary spermatids ($r=0,02$), sperm ($r=0,21$) and locular area ($r=0,01$) showed dependency on rainfall whereas only sperm ($r=0,09$) showed dependency on temperature. Therefore, we can affirm that *L. macrosternum* presents a potentially continuous type of reproductive cycle, with a reproductive peak in the month of July.

KEY WORDS. Anuran; spermatids; spermatozoa; semi-arid.

RESUMO

Em ambiente semi-árido, o sucesso reprodutivo dos Anuros depende de adaptações do seu ciclo de vida, que sincronizado com as condições ideais do ambiente, maximizam o tamanho da prole. Desta forma, objetiva-se caracterizar histologicamente e morfométricamente os testículos de *Leptodactylus macrosternum*, bem como avaliar a influencia da precipitação e temperatura em relação aos aspectos analisados. As coletas ocorreram entre janeiro e dezembro de 2013 no Horto Florestal Olho d'Água da Bica-HFOB (06°49'20''S/36°15'85''W), estado da Paraíba-BR, através de busca ativa, sendo duas expedições noturnas por mês. Foram registradas as densidades das espermatídes (primárias e secundárias), espermatozóides e área dos lóculos seminíferos. A influência da pluviosidade e temperatura em relação à densidade das espermatídes primárias, secundárias, espermatozóides e área locular foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Apenas entre os meses de maio-agosto e novembro-dezembro foram realizados registros e conseqüentemente capturas. As espermatídes primária apresentaram menor densidade em julho ($57,90 \pm 51,54 \text{ mm}^2$) e pico em novembro ($300,32 \pm 117,35 \text{ mm}^2$); as espermatídes secundária menor densidade em dezembro ($287,87 \pm 79,05 \text{ mm}^2$) e pico em maio ($135727, \pm 301,13 \text{ mm}^2$); os espermatozóides menor densidade em julho ($237,37 \pm 121,1 \text{ mm}^2$) e pico em junho ($2270,45 \pm 602,62 \text{ mm}^2$) e a área locular menor em dezembro ($40292,9 \pm 8174,2 \mu\text{m}^2$) e maior em junho ($338875,01 \pm 2262, 1 \mu\text{m}^2$). Torna-se evidente a expressiva diminuição da densidade de espermatozóides entre os meses de junho e julho, que associada à maior área locular no mês de junho, permite identificar o mês de junho como de maior pico espermiogênico e o mês sucessivo como o de maior potencial reprodutivo. A densidade das espermatídes secundária ($r=0,02$), espermatozóides ($r=0,21$) e área locular ($r=0,01$) demonstraram dependência com pluviosidade, e apenas espermatozóides ($r=0,09$) com temperatura. Desta forma, pode-se afirmar que *L. macrosternum* apresenta um ciclo reprodutivo do tipo potencialmente contínuo com pico reprodutivo no mês de julho.

Palavras chave: Anfíbios; espermatídeos; espermatozóides; semiárido.

Introdução

A ocorrência e principalmente os mecanismos envolvidos na dispersão e no sucesso reprodutivo dos vertebrados são promovidos por meio da interação de vários aspectos adaptativos e fisiológicos, envolvendo a adaptação de seus órgãos, sistemas e ciclos reprodutivos aos ambientes onde estes animais ocorrem (SANTOS & OLIVEIRA 2007).

Desta forma, o controle da espermatogênese e conseqüentemente dos ciclos reprodutivos dos anuros é mediado pela interação entre os ritmos endógenos do animal e influência dos fatores ambientais (SASSO-CERRI et al. 2004). Os principais fatores climáticos que determinam os ciclos reprodutivos dos anuros são a temperatura e precipitação (CARDOSO & MARTINS 1987, CARR 2011).

Os ciclos reprodutivos dos anuros são classificados com base no somatório das características histológicas de gônadas e padrões comportamentais em: contínuo, potencialmente contínuo e descontínuo (LOFTS 1974). Os ciclos descontínuos, típicos de zonas climáticas temperadas, apresentam um discreto período de reprodução com pronunciadas mudanças no tamanho das gônadas, produção de gametas e estruturas sexuais acessórias. Os ciclos contínuo e potencialmente contínuo, típicos das regiões tropicais, são caracterizados pela produção constante de gametas. No entanto neste último ocorre uma interrupção parcial da gametogênese.

Típicos de regiões semiáridas, os ciclos potencialmente contínuo são determinados pela irregularidade e quantidade limitada de chuvas (DULLEMAN & TRUEB 1994, MOORE 2005, SASSO-CERRI et al. 2004) e desta forma, limitados a um curto período durante o ano (BERTOLUCI & RODRIGUES 2002, RODRIGUES 2003, PRADO et al. 2000).

Assim, nessas regiões de clima semiárido, a pluviosidade e a temperatura vão atuar na maturação dos testículos e conseqüente produção de espermatozóides (SASSO-CERRI et al. 2004) bem como, que coincidem com os maiores picos de hormônios sexuais, seja de forma pontual

(reprodução explosiva) ou permanente (reprodução prolongada) (WILCZYNSK et al. 2005), determinando também a cronologia do desenvolvimento das características sexuais secundárias e start e manutenção do comportamento sexual dos anuros (MOORE 2005).

Leptodactylus macrosternum (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) é uma espécie amplamente distribuída em ambientes semiáridos, com comportamento generalista e bem adaptada à áreas perturbadas (DE LA IVÁ & MALDONADO 1999). Vem sendo alvo de caça para fins alimentícios (ALVES et al. 2009) e utilizada algumas vezes para fins de produção como alternativa ao uso de espécies exóticas na ranicultura (eg.: *L. catesbiana*, SHAW 1802) (CUNHA & DELARIVA 2009). Esta espécie foi adotada como modelo biológico, pois além apresentar robustez para fins comerciais, é abundante e de fácil detectabilidade; tornando-se ideal para testar a seguinte hipótese: em regiões semiáridas, a precipitação e a temperatura regulam prioritariamente o processo de espermiogênese em Anfíbios Anuros. Desta forma, objetivou-se caracterizar histologicamente e morfométricamente os testículos de *Leptodactylus macrosternum*, bem como avaliar a influencia da precipitação e temperatura em relação aos aspectos analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

Para verificar a atividade reprodutiva de indivíduos machos de *L. macrosternum*, foram realizadas expedições noturnas quinzenais no período entre janeiro e dezembro de 2013, pois segundo ARZABE (1999) em trabalho desenvolvido em ambiente semiárido no estado da Paraíba, os anuros submetidos a extremo estresse hídrico apresentam um curto e explosivo período reprodutivo, exigindo um desenho amostral com coletas espaçadas no mínimo por 15 dias; o que minimiza muito as chances do não registro das etapas de espermatogênese.

Os machos de *L. macrosternum* foram coletados manualmente na área do Horto Florestais Olho d'Água da Bica- HFOB (06°49'20''S/36°15'85''W) localizado no município de Cuité-

Paraíba-Brasil. A área do HFOB está situada no domínio das caatingas brasileiras e caracteriza-se por apresentar clima quente e seco, com temperatura oscilando entre 17° e 28°C, pluviosidade média mensal de 76,35 mm e umidade relativa em torno de 70%. Possui uma hidrografia peculiar, com rios efêmeros, açudes, córregos, barragens, áreas úmidas e áreas de encosta de onde brota a nascente d'água; a região é composta de 70 hectares de caatinga arbórea e arbustiva (ABRANTES et al 2011).

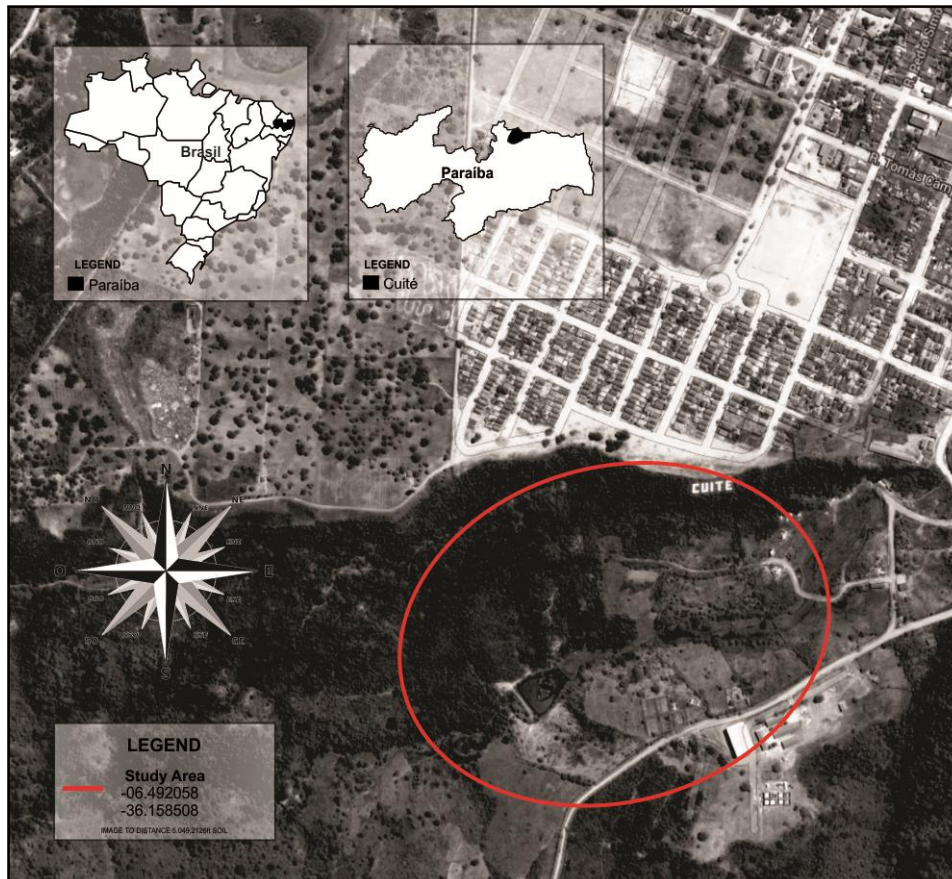


Figura 1- Localização dos pontos de amostragem de *L. macrosternum* inseridos na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), Município de Cuité, estado da Paraíba, Brasil; entre janeiro a dezembro de 2013.

Os dados meteorológicos mensais de temperatura (°C), e pluviosidade (mm) foram adquiridos através do banco de dados do Centro de Agencia Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESAs), através da estação meteorológica vizinha do local de amostragem.

Procedimento de laboratório.

Os indivíduos machos de *L. macrosternum* capturadas foram levadas ao Laboratório de Biossistemática de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cuité-PB, eutanasiados através de hiperdosagem do anestésico lidocaína 5%.

Os testículos foram fixados em solução Bouin (mistura de 71% ácido pícrico, 24 % e formol puro e 5% volumes de ácido acético glacial) por 24 horas e depois desidratados em série crescentes de álcool (70%-30min, 80%-30min, 90%-30min, 95%30min, 100%-30min e 100%-30min) (HOPWOOD, 1990), posteriormente incluídos em parafina seccionados a 5,0 µm e corados com Hematoxilina e Eosina (ROBINSON & GRAY, 1990). A análise qualitativa das lâminas montadas foi procedida em microscópio convencional, trinocular e de bancada (Olympus AX70, Tóquio, Japão – Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo), acoplado a um sistema digital de aquisição de imagem (câmera ERc 5s e Axiovision 6.3, Carl Zeiss, Jena, Alemanha - UFES). Os tipos celulares foram identificados de acordo com trabalhos descritos por HEMOSILLA et al (1983) e OLIVEIRA et al (2003a; 2003b). Para a análise da área dos lóculos seminíferos, foram selecionados aleatoriamente (sorteio) um total de vinte e sete lóculos, sendo analisados três animais por mês e nove lóculos em cada um; totalizando 162 medidas de área (SANTOS & OLIVEIRA 2007).

Análise estereológica para a determinação da densidade das espermátides espermatozoides

Essa análise foi baseada nos preceitos de MANDARIM-DE-LACERDA (1991) e Weibel (1979). Foi calculada a densidade de volume (V_V) das espermátides e espermatozóides, por estas representarem excelentes modelos celulares para bioindicar o estágio de maturação sexual dos indivíduos, uma vez que as espermatogônias e os espermatócitos, por serem estágios celulares iniciais, não trazem informações necessariamente sobre o período reprodutivo próximo ao momento

da coleta. O cálculo da amostra foi realizado com utilização da fórmula de HALLY (1964) e devidamente corrigida para o resultado que represente os preceitos estereológicos (MANDARIM-DE-LACERDA 1991). Por fim, para quantificar a densidade de perfis (Q_A , espermátides primária, secundária e espermatozoides) foram contados respectivamente 14, 5 e 6 campos em uma Área Teste (AT) com $0,044 \text{ mm}^2$ para cada animal de cada grupo de estudo. O resultado final (mm^2) foi adquirido após utilização da média para cada perfil e aplicação da seguinte fórmula: $Q_A = \sum \text{perfis} / A_T$.

Análise dos dados

Os valores da densidade das células da linhagem reprodutiva, área dos lóculos seminíferos foram analisados entre os meses pelo teste Kruskal- Wallis e quando necessário completado pelo Teste de Dunn.

A dependência entre as variáveis climáticas (pluviometria e temperatura), a densidade da população das células da linhagem reprodutivas e a área dos lóculos seminíferos foram verificadas por meio do teste de Regressão Linear Simples. Foi considerado $p < 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

Resultados

Foram coletados 29 machos *L. macrosternum* distribuídos entre os meses de maio (5 exemplares), junho (11 exemplares), julho (3 exemplares), agosto (4 exemplares), novembro (4 exemplares) e dezembro (2 exemplares) de 2013, coincidindo com os meses que apresentaram chuvas na região. Nos meses entre janeiro-abril e setembro-outubro não foram avistados indivíduos de *L. macrosternum* durante as saídas de campo.

Foi possível verificar com facilidade todos os tipos celulares que constituem os testículos de *L. macrosternum* nos animais coletados durante o período amostral, com cada lóculo

apresentando vários cistos de células espermatogênicas (Figura 2 A). Cada cisto se apresentou como um agrupamento de células germinativas em um mesmo estado de diferenciação. Delimitando os lóculos se observam a túnica albugínea (Figura 2 A, TA) e ao centro da estrutura testicular a região do mediastino (Figura 2 A, Med), ambas as estruturas sendo formadas por tecido conjuntivo.

As espermatogônias primária (Figura 2 C, SG1) foram registradas como células localizadas na periferia locular, margeando a túnica albugínea e apresentando cromatina granular. As espermatogônias secundária (Figura 2 C, SG2) apresentaram coloração mais intensa que os demais cistos, sendo células situadas imediatamente após as espermatogônias primária no sentido lúmen do lóculo seminífero, ambas as células com tamanho similar.

As espermatídes primária (Figura 2 B, St1) são células arredondadas, com núcleo ligeiramente compactado e com formato ligeiramente fusiforme. As espermatídes secundária (Figura 2 B, St2) são células cujo núcleo sofre alongamento concomitantemente a uma progressiva compactação nuclear, se desfazendo a organização cística para se arranjar em feixes sustentados pelas células de Sertoli, embora ainda seja considerada como um cisto germinativo.

Os espermatócitos primário (Figura 2 B, Sp1) apresentam-se como células grandes, embora menores que as espermatogônias primária possuindo uma cromatina mais frouxa. Os espermatócitos secundário (Figura 2 C, Sp2) são levemente menores que as células anteriores com núcleo bem mais denso e com uma grande área citoplasmática eosinófila ao redor. Os espermatozóides (Figura 2 C e D, Z) apresentarem como células caracterizadas por compactação nuclear e redução citoplasmática muitas vezes livres no centro dos lóculos.

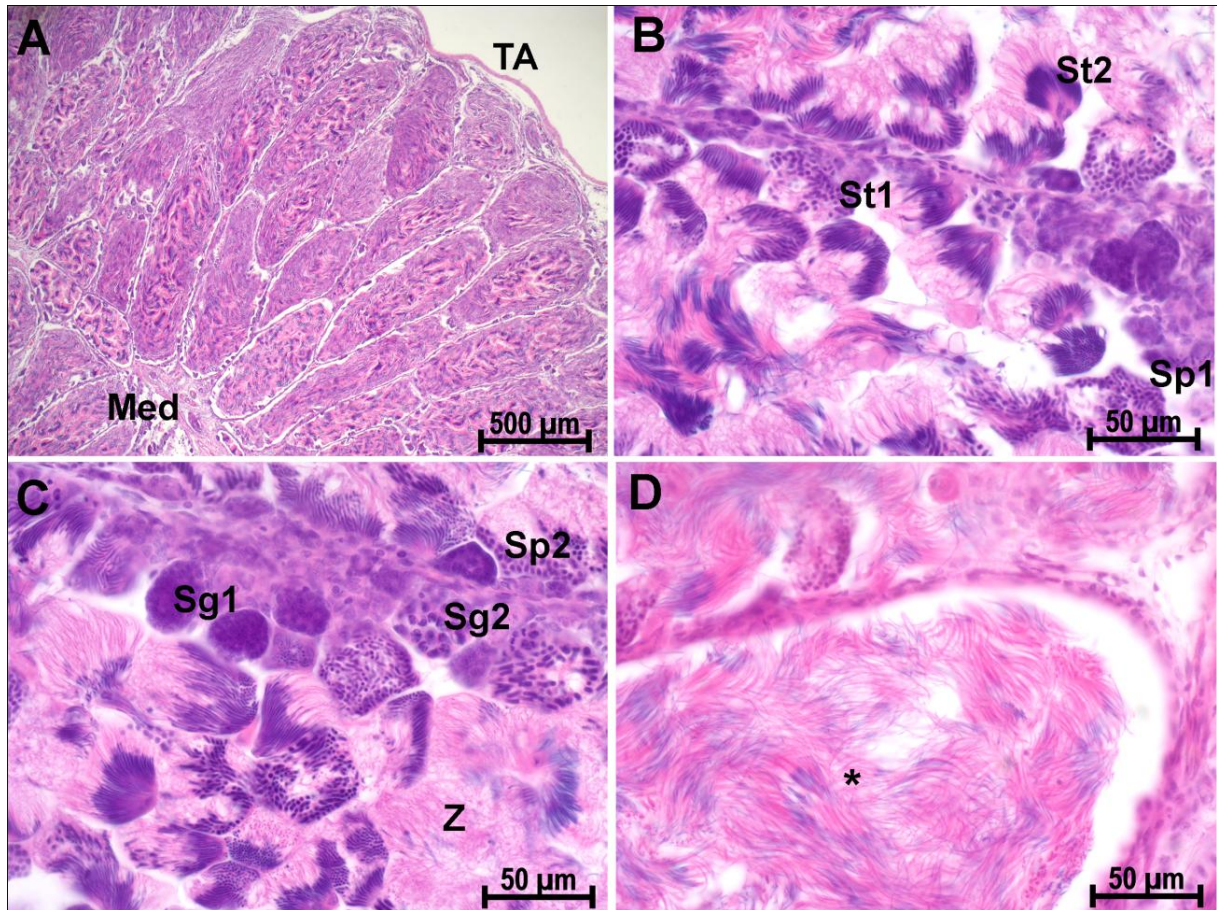


Figura 2- Cortes histológicos corado em HE do testículo de *Leptodactylus macrosternum* coletados entre maio-agosto e novembro- dezembro na área do Horto Florestal Olho d' Água da Bica, Município de Cuité, Estado da Paraíba-Brasil. [A- Corte em 4x; TA- túnica albugínea, Med- mediastino; B- Corte em 40x; St1-espermátide primária, ST2- espermátide secundaria, Sp1-espermatócito primário; C- Corte em 40x; Sg1- espermatogônia primária, SG2 espermatogônia secundaria, Sp2 espermatócito secundário, Z espermatozóides; D- Corte em 40x; * lumen com espermatozóides.]

Os valores mensais das densidades das espermatídes primária (St1), espermatídes secundária (St2), espermatozóides (Z) e da variação da área locular dos lóculos seminíferos apresentaram variações significativas ($p < 0,05$, Kruskal- Wallis) ao longo dos meses de coleta (Tabela 1). As densidades espermatídes primária (St1) foram significativamente maiores no mês de novembro ($p=0,01$), apresentando os menores valores significativos no mês de julho ($p=0,03$). Os maiores valores para a densidade das espermatídes secundárias (St2) foi significativamente maior para os meses de maio ($p=0,01$) e junho ($p=0,02$), contudo o mês de dezembro ($p=0,03$) apresentou os valores significativamente menores para as densidades das espermatídes secundárias (St2). As densidades dos espermatozóides (Z) também apresentaram os maiores valores significativos para os meses de maio ($p=0,04$) e junho ($p=0,04$) com os valores significativamente menores presentes no mês de julho ($p=0,02$). Com relação à variação da área locular dos lóculos dos testículos analisados, aqueles amostrados no mês de junho apresentou significativamente os maiores valores ($p=0,01$). Os meses de julho ($p=0,03$) e dezembro ($p=0,04$) apresentaram significativamente os menores valores para este parâmetro (Tabela 1).

Tabela 1- Valores mensais (média e erro padrão) densidade das espermatídes primária (St1), espermatídes secundária (St2), espermatozóides (Z) (mm^2) e área locular (μm^2) dos testículos da espécie *Leptodactylus macrosternum* coletados na área do HFOB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013. *=valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$, Kruskal- Wallis).

| | St1 (mm^2) | St2 (mm^2) | Z (mm^2) | AL (μm^2) |
|------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| Mai | 176,29 ± 46,64 | 135727, ± 301,13* | 1121,97 ± 189,2 * | 227688,7 ± 1274,1 |
| Jun | 93,18 ± 58,35 | 1301,81 ± 117,64* | 2270,45 ± 602,62* | 338875,01 ± 2262, 1* |
| Jul | 57,90 ± 51,54* | 633,33 ± 619,74 | 237,37 ± 121,1* | 96968,4 ± 464,2* |
| Ago | 83,19 ± 37,12 | 770,45 ± 298,04 | 1007,57 ± 370,52 | 206367,2 ± 7197,3 |
| Nov | 300,32 ± 117,35* | 628,4 ± 3090,36 | 602,27 ± 212,83 | 281801,9 ± 47368,6 |
| Dez | 139,06 ± 26,22 | 287,87 ± 79,05* | 356,06 ± 179,46 | 40292,9 ± 8174,2* |

Como observado na Tabela 2, só foram observadas relações significativas entre a pluviosidade e a densidade dos espermátócitos secundário (St2) ($r= 0,02$; $p=0,04$), densidade de espermatozóides (Z) ($r= 0,21$; $p=0,04$) e área ocupada pelos lóculos nos túbulos seminíferos (AL) ($r= 0,01$; $p=0,04$) dos testículos com os índices de pluviosidade. A variação mensal da temperatura da área do HFOB só apresentou relações significativas com a densidade de espermatozóides (Z) ($r= 0,09$; $p=0,03$).

Tabela 2- Relações entre a densidade dos espermátócitos primário (St1), espermátócitos secundário (St2), espermatozóides (Z) e a área ocupada pelos lóculos seminíferos (AL) de machos da espécie *Leptodactylus macrosternum* em relação a pluviometria e a temperatura na área do Horto Florestal Olho d'Água da Bica (HFOB), município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013.

| | Pluviometria | | Temperatura | |
|------------|--------------|------|-------------|------|
| | r | p | r | p |
| St1 | 0,03 | 0,4 | 0,01 | 0,77 |
| St2 | 0,02 | 0,04 | 0,05 | 0,2 |
| Z | 0,21 | 0,04 | 0,09 | 0,03 |
| AL | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,75 |

Discussão

Os resultados corroboram com SANTOS & OLIVEIRA (2008), os quais ressaltam que de forma geral o processo de espermatogênese em anuros é cístico, com a organização de células germinativas sempre em mesmo estágio de diferenciação. Contudo, a organização destes cistos pode variar entre famílias diferentes de anuros e principalmente de acordo com o ambiente onde

estes animais ocorrem, como afirmam FERREIRA et al. (2009) em trabalho desenvolvido com *Dendropsophus nanus* (Boulenger 1889), *Pseudis limellum* (Cope 1862) e *P. paradoxa* (Linneus 1758) pertencentes a família Hylidae e das espécies *Leptodactylus chaquensis* (Ceil 1950) e *L. podicipinus* (Cope 1862) da família Leptodactylidae, na região do Pantanal.

Os indivíduos de *L. macrosternum* coletados neste trabalho apresentaram características das células germinativas bem como o processo de espermatogênese semelhantes às espécies *L. podicipinus* (PRADO et al. 2002), *L. chaquensis* e *L. podicipinus* (FERREIRA et al 2009) *L. fuscus* (Schneider, 1799) (MARAGNO & CECHIN 2009) e *L. chaquensis* (VILLAGRA et al, 2014), demonstrando um padrão de organização das células germinativas dependentes da variação sazonal de cada região.

Esta caracterização morfológica do padrão de espermatogênese supracitada, caracteriza um processo de espermatogênese acíclico, aparentando ser uma característica dos anuros do Grupo Fuscus da família Leptodactylidae (FERREIRA et al. 2009), não sendo observado todos os estágios da diferenciação celular, mas sim a presença de espermátides alongadas com disposição em leque (figura 2 B) e espermatozoides livres são constantes (Figura 2 D). Logo, essa variação observada no processo gametogênico de *L. macrosternum*, com produção constante e interrupção parcial desta atividade quando não há condições climáticas favoráveis para a reprodução corroboram com os trabalhos Loft (1974) que classifica este tipo de ciclo reprodutivo como “potencialmente contínuo”, típicos de ambientes tropicais sazonais. MADELAIRE & GOMES (2016) relatam que em áreas de caatinga do estado do Rio Grande do Norte- Brasil, durante a estação reprodutiva, os testículos dos machos de anuros apresentam um estágio avançado de maturação, com grandes cistos germinativos e feixes de espermatozóides livres no lúmen dos cistos, corroborando com os resultados aqui apresentados (figura 2 D).

No que se refere às sucessivas alterações histológicas dos testículos analisados, os valores mensais das densidades das espermátides primária (St1), espermátides secundária (St2), espermatozóides (Z) e a variação da área locular dos túbulos seminíferos, variaram

significativamente entre os meses de coleta, além de uma sequência cronológica concordante com as etapas evolutivas da espermatogênese (Tabela 1).

Em regiões tropicais de clima sazonal, a atividade reprodutiva de anuros está relacionada ao período chuvoso (Santos & Oliveira, 2008), corroborando que o fato da ausência de registros entre os meses de janeiro e abril, período seco da região, que destaca-se pelas menores taxas de umidade e precipitação zero na macroregião Curimataú do estado da Paraíba.

Neste estudo, a densidade dos espermatozóides secundário (St2), a densidade de espermatozóides (Ez) e a variação mensal da área locular dos túbulos seminíferos (AL) (Tabela 2) dos testículos dos indivíduos coletados de *L. macrosternum* apresentou relações significativas com os índices de pluviosidade da área do HFOB. Estas informações corroboram com os trabalhos de Prado et al. (2002), Prado e Haddad (2003) e Ferreira et al (2009) que afirmam que o período reprodutivo dos anuros da família Leptodactylidae coincide com o período de maior precipitação de suas áreas de ocorrência. Este fato pode indicar que a pluviosidade em áreas de caatinga é responsável pela estimulação da espermatogênese em anuros que ocorrem em ambientes semiáridos (MADELAIRE & GOMES 2016), o que determina vários ajustes fisiológicos nos anuros, em especial aqueles relacionados com o metabolismo basal, com destaque ao ciclo reprodutivo (Giaretta et al. 2008).

A variação mensal da temperatura da área do HFOB só apresentou relações significativas com a densidade de espermatozóides (Z) (Tabela 2) não apresentando relações significativas com os demais parâmetros avaliados. Desta forma, fica evidente que em ambientes semiáridos a condição física do ambiente que mais interfere na atividade reprodutiva dos anuros é prioritariamente a pluviosidade e secundariamente a temperatura, o que determinam a época mais favorável para a reprodução e com isso o padrão espaçotemporal da reprodução dos anuros em regiões semiáridas (Duellman & Trueb, 1994; Sasso-Cerri et al. 2004; Moore, 2005).

Mediante o exposto e em concordância com os trabalhos de Prado et al., (2000); Bertoluci & Rodrigues (2002); Rodrigues, (2003) pode-se concluir que em ambientes onde a sazonalidade é

expressiva, os animais estão reprodutivamente ativos por dois ou três meses durante o ano, a depender dos meses com pico de pluviosidade e conseqüentemente disponibilidade de sítios reprodutivos para o amplexo e posterior desenvolvimento dos girinos. A instabilidade cronológica dos períodos semiáridos, impossibilita uma demarcação mensal dos meses mais propícios a reprodução, permitindo conclusões em relação as situações climáticas idéias.

Referências

- ABRANTES SH F, ABRANTES MMR, OLIVEIRA JCD, OLIVEIRA WM, HENRIQUES IGN, SILVA P F, CHAVES, MF (2011) Fauna de anfíbios anuros em três lagoas da área de implantação do Horto Florestal, campus da UFCG, Cuité – PB. **Revista Brasileira de Zoologia** 5 (2): 19 - 36.
- AESA, Agência Executiva De Águas Do Estado Da Paraíba. 2014. Estações Agro meteorológicas. Available on line: <<http://pcd.aesa.pb.gov.br/>> [accessed 20 July 2014]
- ALVES RRN, MENDONÇA LET, CONFWSSOR MVA, VIEIRA WLS, LOPEZ LCS (2009) Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 5: 1-50. doi: 10.1186/1746-4269-5-12
- BERTOLUCI J, RODRIGUES MT (2002) Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia** 23:161-167.
doi: 10.1163/156853802760061804
- CARDOSO AJ, MARTINS JE (1987) Diversidade de anuros durante o turno de vocalização em comunidades Neotropicais. **Papeis Avulsos Zoologia** 36: 279-285.
- CUNHA ER, DELARIVA RL (2009) Introdução da rã-touro, *Lithobates cetesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. **Revista Saúde e Biologia** 4 (2): 34-36.
- DE LA RIVA I, MALDONADO M (1999) First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species. **Graellsia**, 55: 193–197.

DUELLMAN WE, TRUEB L (1994) **Biology of amphibians**. Johns Hopkins University press. 696 pp.

FERREIRA A, ROSA ABS, MAHMOUD MEHANNA M (2009) Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). **Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá** 31(4): 447-452.

Dóí:10.4025/actascibiolsci.v31i4.3332

HERMOSILLA IB, COLOMA LS, WEIGERTT GH, REYES ET, GOMEZ VO (1986) Caracterizacion Del ovario de la "rana Chilena" *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae). **Boletin de la Sociedad de Biología de Concepción** 57: 37-47.

HOPWOOD D (1990) Fixation e fixatives. *In*: Bancroft JD, Stevens A. **Theory and practice of histological techniques**. New York, Churchill Livingstone, 3rd ed., pp 21-42.

LOFTS B (1974) Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. **General and Comparative Endocrinology** 4 (2): 550-562.

Madelaire, C.B., Gomes, F.R., Breeding Under Unpredictable Conditions: Annual Variation in Gonadal Maturation, Energetic Reserves and Plasma Levels of Androgens and Corticosterone in Anurans From the Brazilian Semi-Arid, *General and Comparative Endocrinology* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.011>

MANDARIM-DE-LACERDA CA (1995) **Métodos quantitativos em morfologia**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Eduerj. 131 pp.

MARAGNO FP, CECHIN S Z (2009) Reproductive biology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) in the subtropical climate, Rio Grande do Sul, Brazil. **Iheringia, Série Zoologia** 99 (3): 237-241. doi:10.1590/S0073-47212009000300002

MOORE FL, BOYDB SK, KELLEYC DB (2005) Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. **Hormone Behavior** 48: 373–383. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.05.011

- OLIVEIRA C, VICENTINI CA, TABOGA SR (2003a) Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia** **56** (1):75-83.
- OLIVEIRA C, SANT'ANNA AC, OMENA PM, SANTOS LRS, ZIERI R (2003b) Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências** **11** (1): 39-46.
- PRADO CPA, UETANABARO M (2000) Reproductive biology of *Lysapsus limellus* Cope, 1862 (Anura, Pseudidae) in the pantanal, Brazil. **Zoocriaderos** **3** (1): 25-30.
- PRADO CPA, UETANABARO M, HADDAD CFB (2002) Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of the reproductive specialization toward terrestriality in the genus. **Copeia**: 1128-1133
- PRADO CPA, HADDAD CFB (2003) Testes size in Leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. **Journal of Herpetology** **37**(2):354-362.
- ROBINSON G, GRAY T (1990) Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining. *In*: BANCROFT JD, STEVENS A. **Theory and practice of histological techniques**. 3^a ed. Edinburgh London Melbourne and New York, Capítulo 27, pp. 525-562.
- RODRIGUES MT (2003) Herpetofauna da caatinga. *In*: LEAL I R, TABARELI M, SILVA JMC. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Universidade Federal de Pernambuco, ed. Universitária, pp.181-236.
- Santos, L.R and de Oliveira, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Ver. Bras. Zoo.*, 24 (1):64-70.
- SANTOS LR, DE OLIVEIRA C (2008) Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Micron** **39**: 1266–1270.
doi:10.1016/j.micron.2008.03.006
- SASSO-CERRI E, FARIA F, FREYMULLER E, MIRAGLIA SM (2004) Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the Bulfrog *Rana catesbiana*. **Journal of Experimental Zoology**, **301A**: 249-260. doi: 10.1002/jez.a.20023

VILLAGRA A L I, CISINT S B, CRESPO C A, MEDINA MF, RAMOS I, FERNÁNDEZ SN (2014)

Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study. **Zygote** **22**:2 91-299. doi:

10.1017/S0967199412000494

WILCZYNSKI W, LYNCH KS, O'BRYANT EL (2005) Current research in amphibians: Studies

integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. **Hormone Behavior** **48**: 440 - 450.

doi: [10.1016/j.yhbeh.2005.06.001](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.06.001)

WEIBEL ER (1979) Fleischner Lecture: looking into the lung: what can tell us? **American Journal**

of Roentgenology. **133**(6) 1021-1031.

ZAR JH (1999) Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall.663 pp.

Considerações Finais

- A densidade populacional dos tipos de ovócitos demonstraram dependência com a variação do regime de chuvas e temperatura da região, também determinando para a espécie um curto período reprodutivo, concentrados entre os meses de maio e junho de 2013.
- Os valores mensais das densidades das espermatídes primária, espermatídes secundária e espermatozoides apresentaram variações significativas ao longo dos meses de coleta demonstrando também, dependência com a variação do regime de chuvas e temperatura da região.
- A observação do processo de maturação dos gametas, a observação da variação dos valores de K1, RGS, RWL, RFB e dos valores médios de estrógeno e progesterona, bem como as suas relações com as variáveis climáticas da área demonstram para *L. macrosternum* uma curta atividade reprodutiva, provavelmente concentrada nos meses de junho, julho e dezembro de 2013 sendo coerente afirmar que a espécie apresenta um ciclo reprodutivo típico de ambientes tropicais sazonais do tipo “potencialmente contínuo”.

ANEXOS

Anexo I



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|--|---|
| Número: 44134-1 | Data da Emissão: 29/04/2014 13:34 | Data para Revalidação*: 29/05/2015 |
| * De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: marcio frazao chaves | CPF: 035.782.934-40 |
| Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Leptodactylus macrosternum</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO BRASIL | |
| Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE | CNPJ: 05.055.128/0001-76 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|----|---|------------------|---------------|
| 1 | Coleta e preparação do material biológico | 05/2014 | 05/2014 |
| 2 | Coleta e preparação do material biológico | 06/2014 | 06/2014 |
| 3 | Coleta e preparação do material biológico | 07/2014 | 07/2014 |
| 4 | Coleta e preparação do material biológico | 08/2014 | 08/2014 |
| 5 | Coleta e preparação do material biológico | 08/2014 | 08/2014 |
| 6 | Coleta e preparação do material biológico | 09/2014 | 09/2014 |
| 7 | Coleta e preparação do material biológico | 10/2014 | 10/2014 |
| 8 | Coleta e preparação do material biológico | 11/2014 | 11/2014 |
| 9 | Coleta e preparação do material biológico/ transporte de material para UFRPE | 01/2015 | 01/2015 |
| 10 | Coleta e preparação do material biológico | 02/2015 | 02/2015 |
| 11 | Coleta e preparação do material biológico | 03/2015 | 03/2015 |
| 12 | Coleta e preparação do material biológico | 04/2015 | 04/2015 |
| 13 | Coleta e preparação do material biológico/transporte de material biológico para UFRPE | 05/2015 | 05/2015 |

Anexo II

Parecer do Comitê de Ética Animal



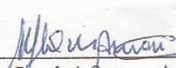
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE


Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

| | |
|--|---|
| Número da licença | 113/2014 |
| Número do processo | 23082.009762/2014 |
| Data de emissão da licença | 08 de Setembro de 2014 |
| Título do Projeto | Caracterização histológica e biologia reprodutiva de leptodactylus macrosternum (Anura, leptodactylidae), nordeste do Brasil. |
| Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão) | Pesquisa |
| Responsável pela execução do projeto | Alvaro Aguiar Coelho Teixeira |
| Colaboradores | Valéria Wanderley Teixeira; Geraldo Jorge Barbosa de Moura; Joaquim Evêncio Neto; Márcio Frazão Chaves. |
| Tipo de animal e quantidade total autorizada | Anfíbio; total de 72 animais |


Prof.ª Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da CEUA-UFRPE)

 Prof.ª Dra. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA