

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE BIOLOGIA E QUÍMICA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA SAZONAL NAS QUANTIDADES DE
CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS PRESENTES NOS TESTÍCULOS
DE *Leptodactylus macrosternum* EM UMA ÁREA DE CAATINGA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

JANAÍNA OLIVEIRA DA COSTA

Cuité - PB

2019

JANAÍNA OLIVEIRA DA COSTA

**INFLUÊNCIA SAZONAL NAS QUANTIDADES DE
CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS PRESENTES NOS TESTÍCULOS
DE *Leptodactylus macrosternum* EM UMA ÁREA DE CAATINGA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, como requisito para aquisição do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Frazão Chaves

Cuité – PB

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE

C837i Costa, Janaína Oliveira da.

Influência sazonal nas quantidades de carboidratos e proteínas presentes nos testículos de *leptodactylus macrosternum* em uma área de caatinga no Nordeste brasileiro. / Janaína Oliveira da Costa. – Cuité: CES, 2019.

37 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2019.

Orientadora: Dr. Márcio Frazão Chaves.

1. Anuros. 2. Metabolismo energético. 3. Áreas abertas. 4. Pluviosidade e temperatura. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 504.75

JANAÍNA OLIVEIRA DA COSTA

**INFLUÊNCIA SAZONAL NAS QUANTIDADES DE CARBOIDRATOS E
PROTEÍNAS PRESENTES NOS TESTÍCULOS DE *Leptodactylus macrosternum*
EM UMA ÁREA DE CAATINGA NO NORDESTE BRASILEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Cuité, Paraíba, como requisito parcial para aquisição do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Frazão Chaves
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Marisa de Oliveira Apolinário
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES

Prof^a. Dr^a. Eline Nayara Dantas da Costa
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES

Prof^a. Dr^a. Francisco José Victor de Castro
(Suplente)
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES

AGRADECIMENTOS

Quando decidi enfrentar o desafio de concretizar meu sonho, sabia que não seria fácil, e que teria que derrubar diversas barreiras para que o mesmo conseguisse ser realizado, mas o desejo de vencer foi maior do que qualquer pensamento que pudesse me fazer mudar de ideia e foi com esse desejo, me nutrindo com maturidade, que consegui chegar a minha tão esperada formatura. Foram com essas experiências que me amadureci e percebi que a realidade é muito mais dura do que as histórias que ouvimos diariamente sobre conquistar sonhos, e então constatei que não existem desejos que se realizam em um estalar de dedos, mas existe determinação e muito foco para se conseguir o que você realmente almeja.

Nesta caminhada passei pelas mais belas experiências, as mais puras pessoas e os mais lindos momentos, que jamais serão esquecidos. E em meio as turbulentas voltas que a vida me dava, esses momentos e essas pessoas me ensinaram a sempre apostar em quem realmente está comigo, e me fizeram perceber que por mais difícil que seja sempre teremos o apoio de quem realmente nos ama. As vezes que eu me sentia triste era sem dúvidas quando chegava em casa de um dia muito cansativo e não podia abraçar, nem conversar e dizer o quanto sou grata a quem eu mais queria, que era minha família. Porém sabia que mesmo estando longe eles torciam pelo meu sucesso, e hoje me orgulho de fazer jus a cada torcida, a cada oração e cada mensagem de força que recebi durante esses quatro anos de caminhada acadêmica.

Para tanto, agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar sabedoria e força para não desistir nos momentos difíceis, agradeço também a minha família em especial a minha madrinha Francisca Moreira e ao meu padrinho Milton Costa, e aos meus irmãos Cleidiane, Cleonilda e José Sebastião, que foram mais do que essenciais para a construção do meu sucesso, são minha base, que me fortaleceram com amor e segurança para eu continuar na luta e não me curvar perante as dificuldades. Agradeço ao meu namorado Jerfeson Januário, que me sustentou emocionalmente e acreditou no meu sonho de maneira singular, além de estar comigo desde do início me apoiando e me ajudando, sempre que precisei você esteve aí me estendendo a mão no que fosse preciso, portanto, serei sempre grata. Aos demais familiares e amigos, e aos meus irmãos de convivência Érica, Natália, Eloisia, Vinícius e Larissa que estiveram me transmitindo paz, amor e muitos momentos proveitosos ao longo da minha caminhada quando me encontrava longe de casa e de minha família, os meus mais sinceros agradecimentos.

E por fim, agradeço aqueles que me embasaram de conhecimento e me ensinaram a ser uma excelente futura profissional, ao meu orientador Marcio Frazão Chaves que me acompanhou em todo meu crescimento científico e me motivou a sempre buscar novas experiências dentro do meu campo e também aos demais excelentes profissionais do curso de Ciências Biológicas, e da minha banca, Marisa de Oliveira Apolinário e Eline Nayara Dantas da Costa que se prontificaram em me nutrir ainda mais de conhecimento quanto a minha pesquisa. Agradeço pelas exigências, broncas e conselhos, a maturidade que consegui ao longo da caminhada em busca de minha realização me fez entender o motivo dessas citadas. Graças aos conselhos e orientações percebi quão significantes vocês foram em minha vida, após as experiências vividas em minha área de trabalho. Enfim termino ressaltando a importância de tudo o que eu absorvi, de cada degrau subido, de cada etapa vencida, e hoje dedico a minha vitória a todos aqueles que seguraram minha mão e me fizeram chegar até o pódio da minha conquista.

*“Somos defensores da vida, dedicamos a
nossa para estudar todas as outras”*

(Autor desconhecido)

RESUMO

Os anuros constituem uma ordem de animais pertencentes à classe Amphibia, que inclui sapos, rãs e pererecas, e no Brasil está a maior biodiversidade mundial desses organismos, as espécies da família dos *Leptodactylidae* desempenham um papel importante em seus habitats, sendo considerados como bioindicadores pois fornecem informações sobre possíveis perturbações dos ecossistemas. Esses animais ocorrem com frequência em áreas de domínio caatinga onde o padrão de distribuição de chuvas determina a atividade energética bem como a reprodução destes indivíduos, portanto estas espécies apresentam uma grande variedade de estratégias fisiológicas e ecológicas ao longo dos períodos de estiagem. Mediante a isso a informação apresentada nesta pesquisa busca mostrar como a sazonalidade interfere no metabolismo energético, e conseqüentemente nos processos reprodutivos destes animais. O material utilizado na pesquisa foi coletado no Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) no município de Cuité-PB, foram coletados quinzenalmente entre os meses de janeiro a dezembro de 2013, indivíduos machos adultos da espécie *L. macrosternum*. Para a realização do experimento, foram removidos, pesados e medidos pequenos fragmentos dos testículos que posteriormente foram encaminhados à rotina histológica, nas análises do material observou-se presença de diferentes tipos celulares. As quantificações das proteínas e dos carboidratos foram analisadas estatisticamente, os valores mensais das quantidades de proteínas apresentaram o maior valor médio significativo no mês de julho, já as quantidades de carboidratos apresentaram os meses de junho, julho, agosto, setembro e dezembro com os maiores valores médios, e o mês de maio com o menor valor. Foram observadas apenas relações significativas entre a pluviosidade e temperatura com as quantidades de carboidratos, e nenhuma relação significativa com as quantidades de proteínas depositadas no testículo de *L. macrosternum*.

Palavras Chave: Anuros; metabolismo energético; áreas abertas; pluviosidade e temperatura.

ABSTRACT

The Anurans constitute an order of animals belonging to the Amphibia class, which includes frogs and descendants, in Brazil is the world's largest biodiversity of these organisms, species of the Leptodactylidae family play an important role in their habitats and are considered as bioindicators because provide information on possible ecosystem disturbances. These animals occur frequently in areas of the caatinga domain where the rainfall pattern determines the energetic activity as well as the reproduction of these individuals, whereas these species present a great variety of physiological and ecological strategies during the periods of drought. Through this the information presented in this research seeks to show how seasonality interferes in energy metabolism, and consequently in the reproductive processes of these animals. The material used in the research was collected in the Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) in the municipality of Cuité-PB, adult males of the species *L. macrosternum* were collected biweekly between January and December 2013. For the accomplishment of the experiment, small fragments of the testicles were removed, weighed and measured, which later were sent to the histological routine, in the analyzes of the material it was observed the presence of different cell types. The protein and carbohydrate quantifications were statistically analyzed, the monthly values of the protein amounts presented the highest mean value in July, while the carbohydrates presented the highest levels of carbohydrates in June, July, August, September and December with the highest values average values, and the month of May with the lowest value. There were only significant relationships between rainfall and temperature with carbohydrate amounts, and no significant relationship with the amounts of proteins deposited in the *L. macrosternum* testis.

Key Words: Anuros, energy metabolism, open areas, rainfall and temperature.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01 - Espécie <i>Leptodactylus macrosternum</i>	15
Figura 02 - Localização da área de coleta, Horto Florestal Olho D'agua da Bica, Cuité, Paraíba.....	21
Figura 03 - Equipamentos utilizados para realização do experimento.	23
Figura 04 - Procedimento de envolvimento do órgão em parafina.....	24
Figura 05: - Cortes histológicos dos testículos de <i>L. macrosternum</i>	25
Figura 06: - Corte histológico do testículo de <i>L. macrosternum</i> referente ao mês de agosto.....	26

LISTA DE GRÁFICOS

Pág.

- Gráfico 01:** Referente aos valores médios e erro padrão mensais das quantidades de proteínas depositadas nos testículos dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013..... 27
- Gráfico 02:** Referente aos valores médios e erro padrão mensais das quantidades de carboidratos depositados no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013..... 28
- Gráfico 03:** Níveis de chuva e variação de temperatura na área do HFODB, Cuité – PB, no período de maio a dezembro de 2013..... 29

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 01: Quantidade de espécimes coletados.....	22
Tabela 02: Relações entre a quantidade de proteínas e carboidratos depositados nos testículos de machos da espécie <i>Leptodactylus macrosternum</i> (MIRANDA-RIBEIRO,1926), em relação à pluviometria e a temperatura na área do Horto Florestal Olho D' Água da Bica, município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período de maio a dezembro de 2013.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Descrição da espécie <i>Leptodactylus macrosternum</i>	14
3.2 Biologia Reprodutiva dos anuros	15
3.3 Características e funções dos testículos	16
3.4 Função de carboidratos e proteínas na reprodução biológica.....	18
3.5 Anuros na Caatinga.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Área de Estudo	21
4.3 Preparação das Lâminas.....	22
4.4 Análises da quantificação de proteínas e carboidratos e variáveis climáticas .	24
4.5 Dados climatológicos.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Análise histológica do tecido testicular de <i>L. macrosternum</i>	25
5.2 Quantificação das proteínas e carboidratos.....	27
5.3 Relações de proteínas e carboidratos com a sazonalidade	28
6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios estão presentes em todos os continentes, com exceção da Antártica, e no Brasil está a maior biodiversidade mundial desses organismos. Esses indivíduos apresentam características e modo de vida peculiares, como permeabilidade cutânea à água e ciclo de vida dependente dos ambientes aquático e terrestre, com uma fase larval aquática e outra adulta terrestre (POUGH et al., 2008), se tornando vulneráveis às alterações ambientais.

Dentro da classe Amphibia está a ordem Anura que inclui sapos, rãs e pererecas. Os anuros ocorrem com frequência na Caatinga. Este bioma se caracteriza pelas altas temperaturas e baixa pluviosidade, com ciclos anuais de seca e chuva que determinam a fase de atividade reprodutiva destes animais, uma vez que dependem absolutamente de condições hídricas apropriadas (MADELAIRE, 2012). Portanto, as espécies de anuros apresentam uma grande variedade de estratégias fisiológicas e ecológicas ao longo dos períodos de estiagem. Uma das estratégias é a estivação que pode ser entendida como um conjunto de mecanismos fisiológicos e comportamentais que ajudam estes animais a sobreviverem em condições áridas.

Durante a estivação ocorre uma diminuição no consumo energético e nas atividades metabólicas que pode resultar na preservação dos carboidratos e em uma queda na produção proteica. Desta forma, os lipídios passam a ser o principal combustível energético, porém os lipídios são importantes na formação dos gametas e na manutenção da atividade vocal nos machos. Diante disso o prolongamento do período de estiagem pode afetar a reprodução dos anuros.

A espécie *Leptodactylus macrosternum* foi utilizada nesta pesquisa como modelo biológico por ser bem adaptada a áreas perturbadas e a mudanças de temperaturas, possibilitando assim uma interpretação mais aprofundada a respeito dos processos reprodutivos e energéticos de anuros em uma região de Caatinga. Além disso, é considerada um bioindicador ambiental, pois esses animais apresentam forte sensibilidade às alterações de parâmetros físicos e químicos da água, bem como alterações na estrutura da vegetação que circundam os corpos d'água. Assim fornece informações sobre possíveis perturbações dos ecossistemas. (HEYER et al., 2008).

Nesta perspectiva, o conhecimento dos padrões energéticos, e dos diferentes fatores que influenciam a biologia destes animais fornecem informações que podem acrescentar no entendimento dos princípios de organização das comunidades em seus ecossistemas (BIONDA; TADA; LAJMANOVICH, 2011). Estes princípios, baseados em informações relacionadas às atividades das populações, contribui para o entendimento da distribuição de grupos de espécies, suas relações internas e suas relações com o meio. Este é um método essencial para estudos mais aplicados, voltados para o levantamento, conservação e manejo da biodiversidade (HOCKEY; CURTIS, 2009).

Considerando que estudos histoquímicos em anfíbios são escassos, assim como análises de proteínas e carboidratos presentes em testículos de *L. macrosternum*. As informações apresentadas nesta pesquisa buscam mostrar como a sazonalidade interfere no metabolismo energético, e conseqüentemente nos processos reprodutivos destes animais. Sendo esse um conhecimento importante, pelo fato desses animais possuírem uma alta especificidade em relação ao ambiente onde vivem, e a interferência humana, podem torna-los extremamente vulneráveis às mudanças ambientais.

Diante disso, o presente trabalho visa explorar e contribuir com o registro de informações sobre o metabolismo energético e a biologia reprodutiva dos anuros através da quantificação das proteínas e dos carboidratos presentes no testículo da espécie *L. macrosternum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as quantidades de carboidratos e proteínas nos testículos da espécie *Leptodactylus macrosternum*, presente na área do Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB), verificando ainda as possíveis relações com as variações de temperatura e pluviosidade da região.

2.2 Específicos

- Analisar a correlação entre carboidratos e proteínas nos testículos;

- Avaliar o balanço quantitativo e qualitativo das proteínas e dos carboidratos presentes nos testículos;
- Relacionar a variação de carboidratos e proteínas com regime de chuvas e temperatura da região;
- Associar a reprodução de *L. macrosternum*, com os níveis de carboidratos e proteínas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Descrição da espécie *Leptodactylus macrosternum*

A família Leptodactylidae é representada por quatro gêneros (*Hydrolaetare*, *Scythrophrys*, *Paratelmatoobius* e *Leptodactylus*) e 99 espécies (FROST, 2016). A maior parte está contida no gênero *Leptodactylus* com 88 espécies, e entre essas destaca-se a espécie *Leptodactylus macrosternum* formada por animais de pequeno e médio porte, insetívoros, terrestres ou semiaquáticos (FROST, 2008).

Leptodactylus macrosternum é conhecida popularmente como rã-manteiga (figura 01). Essa é uma rã de médio porte que suporta diferentes habitats podendo ser encontrada tanto em ambientes de florestas tropicais úmidas e áreas abertas, como em ambientes de savana, campos e áreas seca (HEYER et al., 2008). E é caracterizada por apresentar um padrão de ocelos negros espalhados de forma irregular pelo dorso e uma coloração olivácea a qual permite uma fácil camuflagem no ambiente natural. Esses animais estão adaptados às modificações e perturbações antrópicas, além disso podem ser encontrados em áreas urbanas e em habitats de florestas secundárias (LAVILLA et al., 2010).

A espécie *Leptodactylus macrosternum* possui hábitos noturnos, e tem como habitat preferencial corpos d'água lânticos tais como banhados, arroios, e canais onde vivem em meio as gramíneas (FROST, 2016). Podem chegar a medir 15 cm de comprimento, e apresentam uma dieta preferencialmente carnívora consumindo uma grande variedade de presas terrestres, principalmente artrópodes, e adicionalmente uma pequena quantidade de vertebrados (BRITO, 2011). Além disso, as características anatômicas e morfológicas dos sistemas reprodutores desses indivíduos juntamente com os fatores climáticos

permitem analisar os aspectos reprodutivos destes animais, possibilitando assim, a ampliação do conhecimento a respeito da biologia reprodutiva dos anuros neotropicais.

Figura 01: Espécie *Leptodactylus macrosternum*



Fonte: Mauricio Rivera Correa

3.2 Biologia Reprodutiva dos anuros

Muitos trabalhos que falam a respeito da biologia reprodutiva dos anuros, abordam aspectos morfológicos e comportamentais destes animais em seus ambientes, como o comprimento rosto-cloacal, vocalizações e o número de noites de participação no coro, que também são fatores de seleção sexual em anfíbios anuros (CHAVES, 2016); (WELLS, 1978); (HADDAD, 1995); (MARTINS et al. 1998).

A temporada de reprodução de anuros normalmente está relacionada com a pluviosidade temperatura, umidade relativa e à disponibilidade de água, além disso os anuros podem ser classificados de acordo com a duração dos eventos reprodutivos, alguns possuem reprodução explosiva, na qual os eventos reprodutivos ocorrem por apenas alguns dias. Enquanto outros apresentam reprodução prolongada, cuja duração ultrapassa o período anteriormente relatado. Assim, esses dois padrões reprodutivos influenciam nas estratégias reprodutivas e comportamentais adotadas pela população (WELLS, 1977). Foram identificados 29 modos reprodutivos em anfíbios, que são determinados por uma série de características como o lugar onde os ovos são depositados, características da

ninhada, duração do desenvolvimento, e presença ou não de cuidado parental (HADDAD; PRADO 2005).

Existe outro tipo de classificação proposto por Lofts (1974) de acordo com as características histológicas e comportamentais, na qual as espécies são consideradas como de reprodução contínua, potencialmente contínua e descontínua. Esses ciclos gametogênicos podem ser estabelecidos por mudanças ambientais que interferem na espermatogênese como a temperatura e o fotoperíodo.

Os ciclos “descontínuo” ocorrem em zonas climáticas temperadas e geralmente apresenta um discreto período de reprodução. Enquanto os ciclos “potencialmente contínuo” e “contínuo” são típicos de regiões tropicais e caracterizam-se pela produção constante de gametas, porém no ciclo potencialmente contínuo ocorre uma interrupção parcial da gametogênese.

Estes dois tipos de classificação não são mutuamente exclusivos e podem ser mais ou menos apropriados, dependendo do tipo de estudo conduzido (BERTOLUCI; RODRIGUES, 2002). Entretanto, para definir as características da sazonalidade em relação ao desenvolvimento das células germinativas torna-se necessário a compreensão do ciclo reprodutivo de anuros.

3.3 Características e funções dos testículos

O aparelho reprodutor masculino dos anuros é constituído por pares de testículos que se localizam na cavidade celomática, próximo aos rins. Este órgão é compacto, possui forma arredondada e cor geralmente esbranquiçada, podendo apresentar modificações anatômicas, como variações na forma e no peso de acordo com o período reprodutivo e alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução (ZIERI, 2010). Além disso o controle dos processos de gametogêneses está associado aos fatores climáticos e ao ritmo endógeno desses animais.

Quanto à organização morfológica Oliveira e Vicentini (1998) enfatizam que os testículos dos anuros são revestidos pela túnica albugínea, que retém o parênquima testicular constituído por tecido germinativo, disposto em lóculos seminíferos. Estes são delimitados por tecido conjuntivo frouxo, porém não se observa a presença de septos

intratesticulares, sendo esta uma afirmativa legitimada também por Oliveira e Zieri (2005).

Histologicamente as rãs apresentam os testículos organizados em compartimentos tubular e intertubular. O compartimento tubular é constituído por um agrupamento de túbulos com uma membrana basal acelular associada a células mioídes, as quais contém em seu interior cistos, ou conjuntos de células germinativas, envoltas por células de Sertoli, com função é espermatogênica. Já o compartimento intertubular é formado por células de Leydig (células esteroidogênicas), macrófagos, mastócitos e componentes do tecido conjuntivo, além disso, esse compartimento é bem vascularizado e possui função esteroidogênica (SILVA, 2017).

De acordo com Zieri (2010), na margem anterior dos testículos, encontram-se os corpos adiposos abdominais que constituem uma característica estrutural comum a todos os anfíbios. Essas estruturas apresentam coloração amarelada e muitos prolongamentos digitiformes que estão localizados na parte cranial dos testículos. Os corpos adiposos são ricos em colesterol e triglicérides servindo como uma reserva nutricional para as gônadas (apud DUELLMAN e TRUEB, 1994), que se desenvolvem em testículos ou ovários e também em seus sistemas tubulares condutores de gametas, conforme a influência de fatores ambientais, genéticos e fisiológicos. Desta forma, a função que os testículos exercem é de produção de gametas (espermatogênica) e endócrina (esteroidogênica).

A espermatogênese é um processo cíclico, complexo, altamente organizado e coordenado que se inicia com a divisão da espermatogônia-tronco, resultando em células formadoras de gametas e células comprometidas com a manutenção celular. No parênquima testicular o tecido germinativo apresenta diferentes tipos celulares: espermatogônias no limite do epitélio; espermatócitos e espermátides na sequência da citodiferenciação, e espermatozoides que geralmente são encontrados próximos ao lúmen (OLIVEIRA et al, 2002). Este epitélio apresenta um arranjo cístico, ou seja, grupos de células sexuais germinativas associadas com as células de Sertoli, constituindo cistos espermatogênico, que é uma característica comum dos anfíbios, bem como em outros anamniotas (GRIER, 1992). Durante o período espermatogênico o tecido hepático exerce diversas funções, entre elas está a formação e armazenamento de lipídios, hidratos de carbono e síntese de esteroides associados às proteínas, os quais são utilizados na

atividade metabólica dos testículos durante a ação dos hormônios esteroides (KAO et al., 1993).

Os testículos possuem algumas células específicas que desempenham funções importantes, tendo como exemplo as células peritubulares mióides que são responsáveis por constituir a parede dos túbulos seminíferos, onde participam da regulação parácrina da função testicular, e em associação com as células de Sertoli, sintetizam os componentes da membrana basal.

As células de Leydig que são responsáveis pela produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir do colesterol (ASSIS, 2011). De acordo com estudos realizados em diversas espécies de anfíbios, as células de Leydig passam por várias mudanças morfológicas que estão relacionadas com a sazonalidade, podendo refletir em suas funções e nas variações cíclicas.

E as Células de Sertoli, que têm função de sustentação, nutrição, secreção, fagocitose, e liberação de espermátides maduras (espermição), também atuam na intermediação hormonal da espermatogênese, através de receptores para esteróides (andrógenos e estrógenos) e para FSH (Hormônio Folículo Estimulante), (SCHULZ e MIURA, 2002; NÓBREGA et al. 2009; SCHULZ et al. 2009).

3.4 Função de carboidratos e proteínas na reprodução biológica

Os carboidratos e as proteínas apresentam mecanismos específicos de atuação sobre a eficiência reprodutiva, uma vez que os níveis nutricionais podem afetar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, além de, acarretar em alterações do funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução. Então, pode-se dizer que a condição nutricional é um fator primordial para o desempenho reprodutivo em todas as espécies animais. E nos machos está diretamente relacionada com os parâmetros testiculares e, conseqüentemente, com a qualidade do sêmen e índices de fertilidade (SIQUEIRA FILHO, 2006).

A contribuição de nutrientes, particularmente a proteína produz aumento no metabolismo e na concentração de enzimas microssomais hepáticas. Esses resultados aumentam os níveis metabólicos de estradiol, refletindo nos níveis de FSH (Hormônio

Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante) (Gordon, 1999). O FSH controla a função testicular associado ao LH atuando respectivamente nas células de Leydig e de Sertoli. O FSH atua nos túbulos seminíferos estimulando a espermatogênese e o LH estimula a produção de andrógenos principalmente da testosterona (BETTENCOURT, 1999).

As proteínas atuam diretamente sobre a produção de hormônios e indiretamente na espermatogênese, enquanto os carboidratos fornecem energia para realização das principais funções do organismo, inclusive a reprodução que exige um grande gasto energético, e nos anuros esse processo está atrelado a vocalização dos machos, tornado a reprodução é energeticamente custosa.

3.5 Anuros na Caatinga

A Caatinga forma um domínio morfoclimático exclusivamente brasileiro, que se caracteriza pelas altas temperaturas, por vários meses de estiagem e por chuvas sazonais. Estas características interferem em eventos da vida animal, determinando assim o padrão reprodutivo de anfíbios anuros e alterando o seu metabolismo energético. Na caatinga são encontradas pelo menos 48 espécies de anfíbios (RODRIGUES, 2003) que durante as estações secas apresentam adaptações fisiológica e comportamentais para altas temperaturas e escassez de água. Alguns anuros permanecem em atividade se alimentando e utilizando corpos de água permanente para hidratação, porém outros estavam enterrando-se em solos próximos a fontes de água subterrânea (MADELAIRE, 2012).

A estivação é um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais, que estão relacionadas com a redução do metabolismo e a permanências em micro-habitat específicos durante o período de estiagem. Isso permite a preservação do balanço hídrico que pode aumentar as chances de sobrevivência ao longo dos períodos de seca (CARVALHO; NAVAS; PEREIRA, 2009).

Entretanto a depressão metabólica estar intimamente relacionada com o fenômeno de estivação, que envolve vários ajustes metabólicos, como por exemplo, uma drástica redução na respiração cutânea com conseqüente diminuição da perda evaporativa de água (GUPPY; WITHERS, 1999). Além disso, a interferência no metabolismo reflete na

síntese de proteínas, podendo acarretar na sua diminuição, e este é um dos principais aspectos que parece baixar o consumo energético no estado inativo (HAND; HARDEWING, 1996). Além do mais o sucesso reprodutivo depende diretamente da manutenção dos níveis proteicos durante a fase de reprodução (GUPPY et al., 1994).

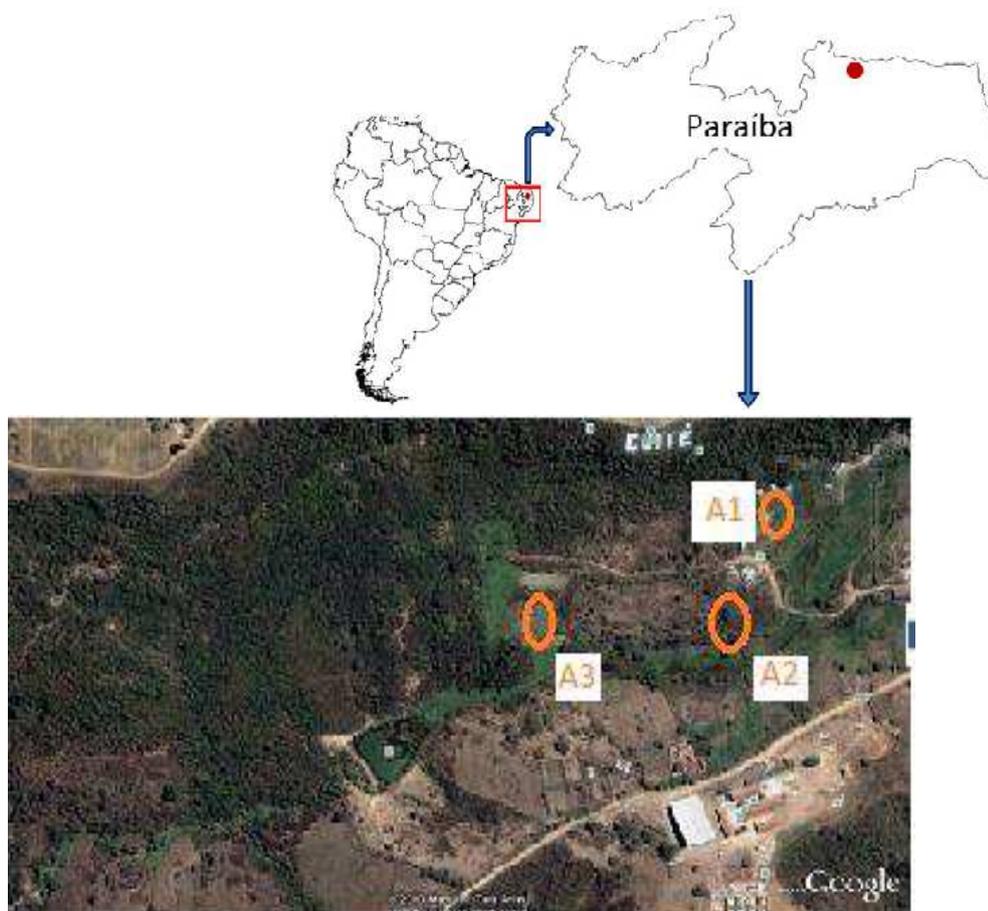
A maioria dos anuros que estiveram em regiões semiáridas possuem comportamento reprodutivo explosivo, e isto implica na manutenção dos estoques de glicogênio e lipídios no início da reprodução, pois a vocalização é energeticamente custosa (GRAFE; THEIN, 2001). Além de todo esse gasto energético na reprodução, há ainda um desafio extra de atrelar a reprodução à imprevisibilidade das chuvas na caatinga.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O material utilizado na pesquisa foi coletado no Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) no município de Cuité-PB (figura02), que atualmente encontrar-se sob a administração da Universidade Federal de Campina Grande. Está localizado na mesorregião do Agreste Paraibano e microrregião do Curimataú Ocidental entre as coordenadas ($6^{\circ}29'06''\text{S}/36^{\circ}9'24''\text{O}$), no planalto da Borborema. É uma área 75 hectares formada por encosta, nascentes, várzea e vegetação do tipo Caatinga arbustiva arbórea, com altitude de 667 metros acima do nível do mar e uma área total de 758,6 km². (COSTA et al 2009).

Figura 02: Localização da área de coleta, Horto Florestal Olho D'água da Bica, Cuité, Paraíba. E distribuição dos corpos d'água no local de coleta.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017

4.2 Espécimes avaliadas

Para a execução deste trabalho foram coletados quinzenalmente entre os meses de janeiro a dezembro de 2013, na área do Horto Florestal Olho d'água da Bica, indivíduos adultos da espécie *L. macrosternum*, com autorização prévia do IBAMA/SISBIO (44134-1). As espécies utilizadas neste estudo haviam sido capturadas para um trabalho anterior, porém os testículos destes animais foram conservadas e desta forma foi possível utilizá-los para fins desta pesquisa, evitando assim outra retirada relevante do seu habitat.

Nos meses, entre janeiro-abril e outubro-novembro não foram encontrados indivíduos machos de *L. macrosternum* durante as saídas de campo. (Tabela 01)

Tabela 01: Quantidade de espécimes coletados

Mês de coleta	Números de exemplares
Maio	6
Junho	11
Julho	6
Agosto	3
Setembro	2
Dezembro	2

Fonte: Dados da pesquisa, 2017

Levando em consideração esses aspectos pode-se dizer que esta pesquisa é de Caráter descritiva e exploratória (GIL, 2002), caracterizada como uma abordagem qualitativa-quantitativa.

4.3 Preparação das Lâminas

Os indivíduos machos de *L. macrosternum* foram levados ao Laboratório de Biossistemática de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cuité-PB, no qual foi realizado esse experimento, para isso foram utilizados

diferentes equipamentos, tais como a capela de exaustão que tem a função de evitar que os gases tóxicos se dissipem, a estufa laboratorial que inibi a ação microbiológica, o micrótomo para realização dos cortes histológicos e o banho maria de laboratório (Figura 03).

Os testículos foram removidos, pesados, medidos e encaminhados à rotina histológica. Estes foram fixados em solução Bouin (mistura de 71% ácido pícrico, 24% 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). Em seguida, foram envolvidos em parafina (Figura 4) e cortados a 7,0 μm . Posteriormente, foi realizada a coloração dos cortes, para corar as proteínas foi utilizado xilidina, e a coloração ácido periódico-Schiff (PAS) para os carboidratos. Além disso, foi feita uma análise histoquímica das proteínas e dos carboidratos.

Foram utilizadas 19 amostras de testículos, para cada amostra realizou-se dois cortes histológicos, as laminas com os cortes foram observadas em um microscópio de luz com sistema de captura de imagens no qual realizou-se 11 imagens de cada lamina, dessas onze imagens uma foi capturada na panorâmica e dez foram capturadas na objetiva de 40x em diferentes ângulos. E para obter a quantificação das proteínas e dos carboidratos presentes nos testículos, foram analisados a área dos tecidos testiculares através de fotomicrográficas de cortes obtidas no programa de manutenção de imagem GIMP 2, onde os valores das quantidades de proteínas e carboidratos foram expressos em pixels.

Figura 03: Referente aos equipamentos utilizados para realização dos experimentos



Fonte: Dados da pesquisa, 2017

Figura 04: Testículo de *L. macrosternum* envolvido em parafina



Fonte: Dados da pesquisa, 2019

4.4 Análises da quantificação de proteínas e carboidratos e variáveis climáticas

Inicialmente foi verificada a existência de valores discrepantes (outliers), em seguida, a normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk, e quando necessários submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$. (Tukey e Dunn, respectivamente). A quantificação de proteínas e carboidratos nos testículos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e quando necessário completado pelo Teste de Dunn.

A relação entre as variáveis climáticas e quantificação de proteínas e carboidratos, foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Sendo necessários a realização dos testes de correlação de Spearman (dados não paramétricos) entre os parâmetros avaliados. Foram considerados $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Krebs (1999).

4.5 Dados climatológicos

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), através da estação meteorológica vizinha do local de amostragem.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise histológica do tecido testicular de *L. macrosternum*

Fica evidente para fins de observação 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 5). Cada cisto se apresentou como um agrupamento de células germinativas em um mesmo estado de diferenciação. Os lóculos são delimitados pela túnica albugínea e ao centro da estrutura testicular a região do mediastino (Figura 5 D, Med), ambas as estruturas sendo formadas por tecido conjuntivo.

Figura 05: Cortes histológicos dos testículos de *L. macrosternum*

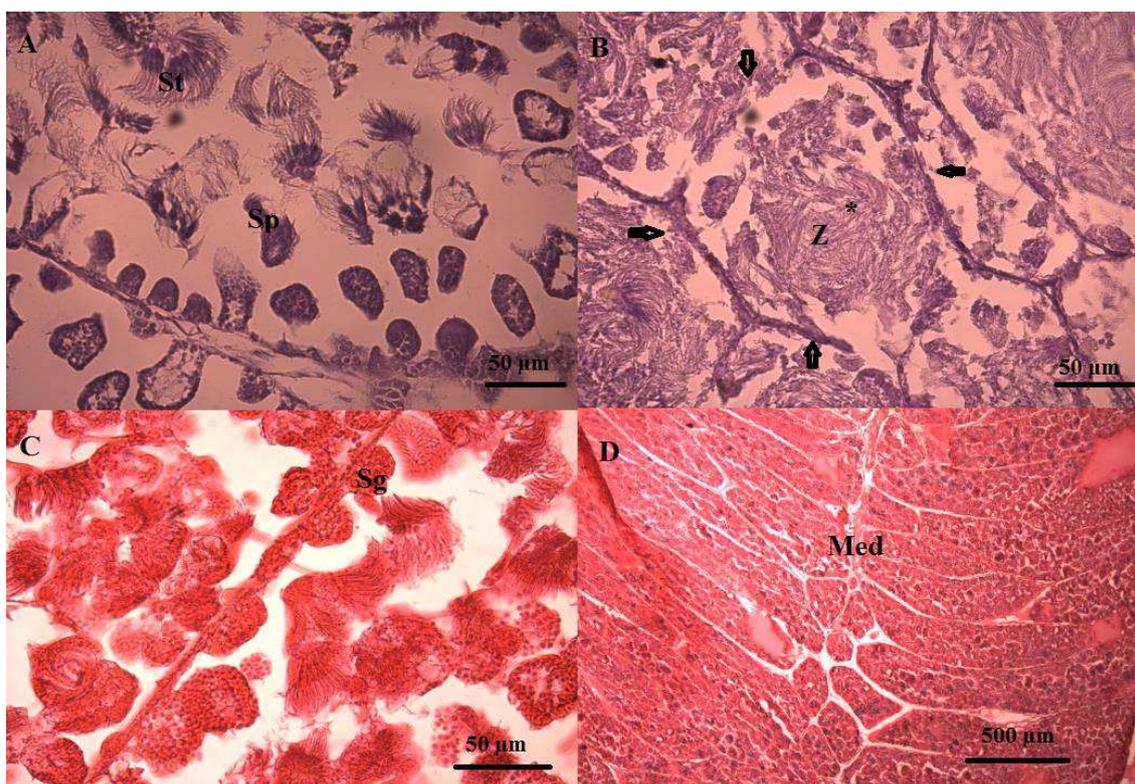


Figura testículo- A- Corte em 4x TA Sp1- espermatócito; St- espermátide; B → Lóculo seminífero; Z- espermatozóides; * lúmen com espermatozóides; C- Sg- espermatogônia; D- Med- mediastino.

As espermatogônias (Figura 5 C, SG) foram registradas como células localizadas na periferia locular, margeando a túnica albugínea e apresentando cromatina granular.

As espermatídes (Figura 5 A, St) 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 5 A, Sp) são levemente menores que as células anteriores com núcleo bem mais denso e com uma grande área citoplasmática eosinófila ao redor. Os espermatozoides (Figura 5 B, Z) apresentam-se como células caracterizadas por compactação nuclear e redução citoplasmática muitas vezes livres no centro dos lóculos.

Nas lâminas observadas ficou evidente a presença constante de espermatozoides livres e espermatídes alongadas com disposição em leque (Figura 6, B). Além disso, também foi verificado que as amostras apresentaram espermatozoides em grande quantidade no interior dos túbulos seminíferos (Figura 6, A).

Figura 06: Corte histológico do testículo de *L. macrosternum* referente ao mês de agosto

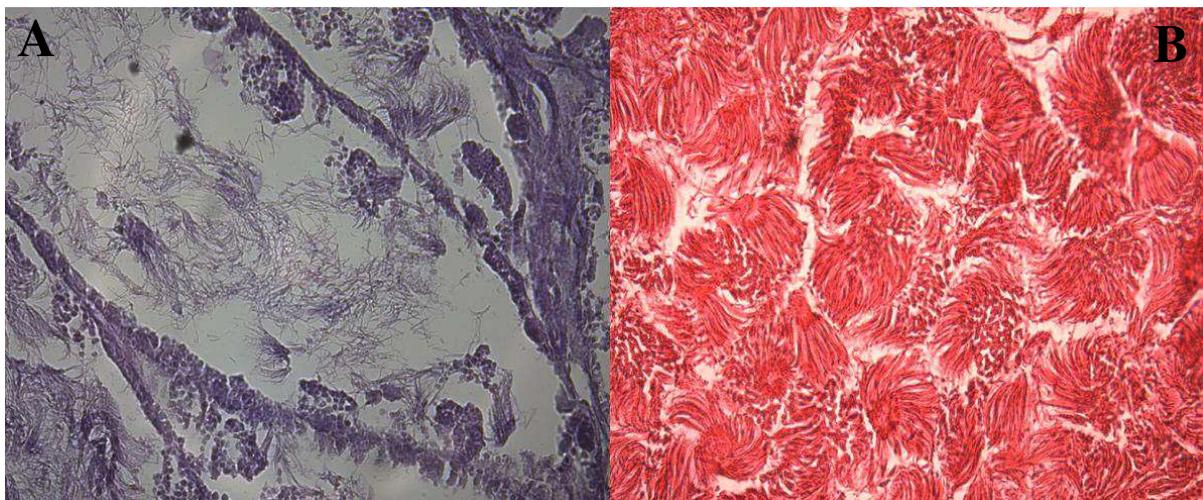


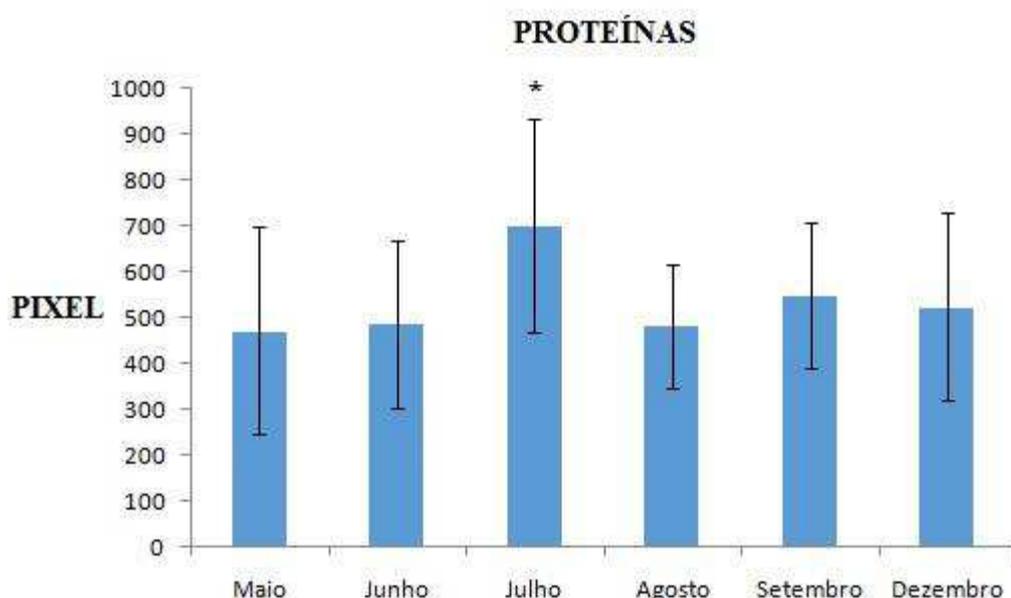
Figura A- espermatozoides no lóculo seminífero; **B** - espermatídes em forma de leque.

Segundo Chaves et al, 2017, é descrito para a espécie que há diferenças na quantidade de espermatozoides no interior dos túbulos, bem como as variações das características no arranjo dos epitélios seminíferos, essas informações evidenciam que a espécie estudada apresenta ao longo do ano formas diferentes no processo de espermetogênese, podendo ser acíclica, com liberação explosiva de espermatozoide, sendo essa uma informação confirmada também na pesquisa de Ferreira, Rosa e Mehanna

(2009). Essa variação observada no processo gametogênico de *L. macrosternum*, com interrupção parcial dessa atividade quando não há condições climáticas favoráveis para a reprodução corrobora com trabalho de Lofts (1974) que classifica esse tipo de ciclo reprodutivo como “potencialmente contínuo”, e típicos de regiões tropicais sazonais.

5.2 Quantificação das proteínas e carboidratos

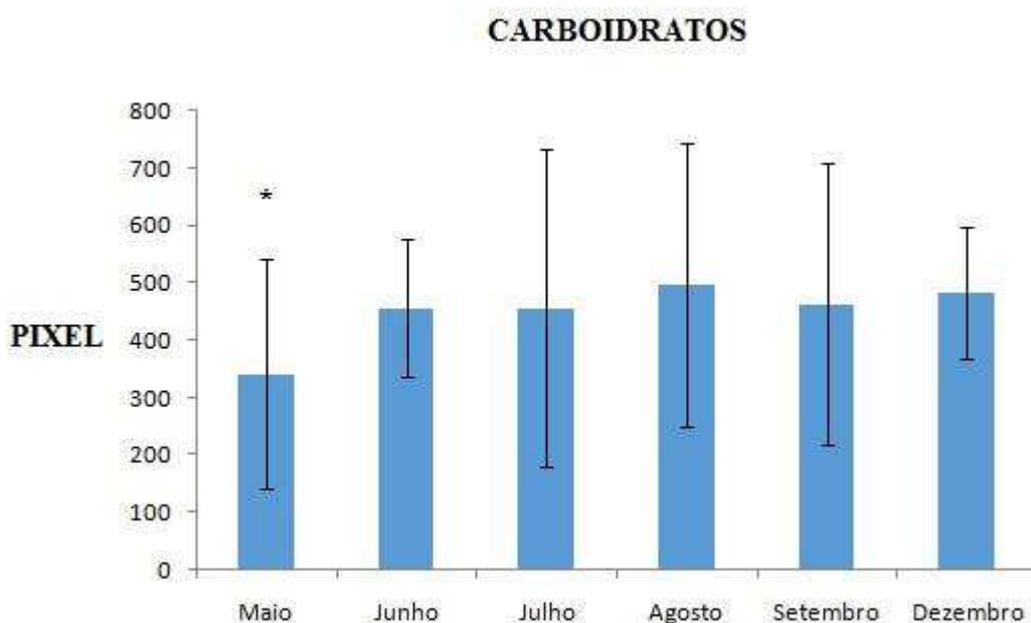
Gráfico 01: Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de proteínas depositadas nos testículos dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013.



Legenda- * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis-
p<0,05).

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Gráfico 02: Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de carboidratos depositados no testículo dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013.



Legenda- * indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

O mês de julho apresentou o maior valor médio significativo observado para a concentração de proteínas nos testículos de *L. macrosternum*, chegando a 700 pixels. Os demais meses de coleta (maio, junho, agosto, setembro e dezembro) apresentaram concentrações de proteínas bem abaixo do apresentado no mês de junho, variando entre 500 e 600 pixels (Gráfico 01). Já as quantidades de carboidratos (Gráfico 2) apresentaram os meses de junho, julho, agosto, setembro e dezembro com os maiores valores médios variando entre 350 e 400 pixels. Contudo o mês de maio apresentou o menor valor significativo ($p < 0,05$) para este parâmetro (310 pixels).

5.3 Relações de proteínas e carboidratos com a sazonalidade

A variação sazonal (pluviosidade e temperatura) da região está apresentada no (Gráfico 3). Foram observadas apenas relações significativas entre a pluviosidade e as quantidades de carboidratos ($r = 0,01$; $p = 0,03$) e temperatura e quantidade de carboidratos

($r=0,02$; $p=0,04$). A variação do regime de chuvas e temperatura não apresentou nenhuma relação significativa com a quantidade de proteínas depositadas no testículo de *L. macrosternum* (Tabela 2).

Gráfico 03: Níveis de chuva e variação de temperatura na área do HFODB, Cuité- PB, no período de maio a dezembro de 2013.

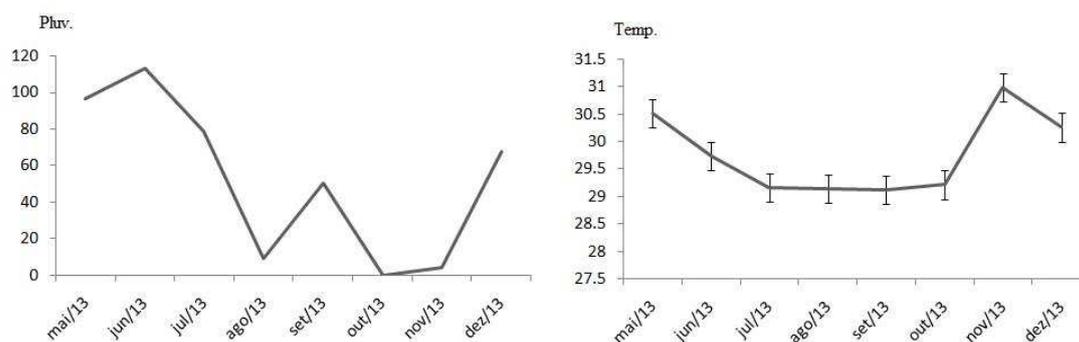


Tabela 02: Referente as relações entre a quantidade de proteínas e carboidratos depositados nos testículos de machos da espécie *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO,1926), em relação à pluviosidade e a temperatura na área do Horto Florestal Olho D' Água da Bica, município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período de maio a dezembro de xxx.

	Pluviometria		Temperatura	
	r	P	r	P
Proteína	0,004	0,24	0,003	0,15
Carboidrato	0,01	0,03*	0,02	0,04*

Legenda - *=Valores estatisticamente significativos.

r = Valor da análise estatística.

p = Teste de significância

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Tendo em vista os dados obtidos nesse trabalho podemos observar que no mês de agosto houve um aumento nas quantidades de carboidratos e uma diminuição nas quantidades de proteínas. Considerando que durante esse mês a pluviosidade na região diminuiu significativamente, podemos deduzir que durante o período de estiagem houve

uma diminuição na produção de proteínas que segundo Hand e Hardewing (1996), isso ocorre para baixar o consumo energético no estado inativo. Ao diminuir a síntese proteica o organismo pode passar a preservar estoques de carboidratos para que ele possa ter energia para realizar suas funções vitais durante os períodos sazonais, talvez seja por esse motivo que resultou num aumento das quantidades de carboidratos durante os períodos de ausência de chuvas.

Além das mudanças metabólicas, a sazonalidade também é capaz de interferir na reprodução dos anuros, pois a diminuição de proteínas e a conservação dos carboidratos durante esse período, pode comprometer o sucesso reprodutivo desses animais, uma vez que a reprodução depende de um grande gasto energético, inclusive na vocalização, o que leva a necessidade da manutenção dos níveis de carboidratos e lipídios que atuam como reserva energética. E durante os períodos sazonais ocorre a escassez de alimentos para os anuros, o que não permite essa manutenção de carboidratos, levando o indivíduo a estivar para evitar gastos energéticos. Além disso, as baixas ocorrências das chuvas bem como a sua imprevisibilidade em ambientes semiáridos podem causar mudanças fisiológicas nos anuros fazendo com que eles entrem em um sono estival, o que justifica o fato dos indivíduos *L. macrosternum* não serem encontrados durante alguns meses nas saídas de campo.

A pesquisa possibilitou também uma avaliação do padrão de atividades de *L. macrosternum* com base no número de capturas na área de estudos do (HFODB), observando que no mês de junho obteve-se o maior número de exemplares coletados (Tabela 1), pois esse mês é caracterizado por uma alta pluviosidade (Gráfico 3), o que permite que esses animais sejam encontrados com maior frequência, uma vez que as condições estão favoráveis para a busca de alimentos e vocalização, que caracteriza o período reprodutivo, o qual depende da disponibilidade de água. Além da pluviosidade, a temperatura do ar também pode influenciar na redução da atividade metabólica dos animais ectotérmicos, fazendo com que o metabolismo diminua, o que permite que esses animais sobrevivam em condições desfavoráveis e conservem energia (OLIVEIRA et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos e nos resultados obtidos a partir da análise histoquímica e da quantificação de proteínas e carboidratos, foi possível observar que o comportamento fisiológico e reprodutivo da espécie *L. macrosternum* está intimamente ligado a sazonalidade da região, variando de acordo com os períodos de chuvas e estiagem. Apesar de não ter sido evidenciadas variações significativas nas quantidades de proteínas, durante o mês em que a pluviosidade na região diminuiu, registraram uma redução nos seus valores médios enquanto as quantidades médias de carboidratos aumentaram, tornando notável a interferência da pluviosidade no metabolismo energético desses animais.

O que nos leva a concluir que a sazonalidade e a imprevisibilidade de chuvas interferem diretamente no metabolismo e indiretamente no processo reprodutivo, uma vez que durante os períodos de estiagem os anuros precisam diminuir os seus gastos energéticos. Contudo, os processos reprodutivos dos anuros necessitam da manutenção dos níveis de carboidratos estocados no testículo desses animais, sendo assim, energeticamente custosa. Além disso existe outros fatores que interferem na reprodução dos anuros que estão ligados a sazonalidade, como a escassez de alimentos e a falta de água, visto que a reprodução desses animais depende de gastos energéticos, e condições hídricas apropriadas.

REFERÊNCIAS

ASSIS, Luiz Henrique de Castro. **ANÁLISE ESTEREOLÓGICA E FUNCIONAL DO TESTÍCULO DE RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) SEXUALMENTE MADURAS, COM ÊNFASE NA CINÉTICA ESPERMATOGONIAL, PROLIFERAÇÃO E NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI POR CISTO ESPERMATOGÊNICO**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BERNADE, Paulo Sérgio; ANJOS, Luiz dos. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DA ANUROFAUNA NO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY, LONDRINA, PARANÁ, BRASIL. (Amphibia: Anura). **Comum. Mus. Cienc**, Porto Alegre, v. 12, p.127-140, out. 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/304353781_Distribuicao_espacial_e_temporal_da_anurofauna_no_Parque_Estadual_Mata_dos_Godoy_Londrina_Parana_Brasil_Amphibia_Anura>. Acesso em: 21 ago. 2018.

BERTOLUCI, Jaime; RODRIGUES, Miguel Trefaut. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Koninklijke Brill Nv**, Leiden, v. 23, p.161-167, 2002. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/trefaut/pdfs/Bertoluci,%20Rodrigues_2002_Seasonal%20patterns%20of%20breeding%20activity%20of%20Atlantic%20Rainforest%20anurans%20at%20Borac%C3%A9ia,%20Southeastern%20Brazil.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2018.

BETTENCOURT, Elisa Maria Varela. **Caracterização de Parâmetros Reprodutivos nas Raças Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça**. 1999. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, Universidade Técnica de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 1999. Disponível em: <http://purl.pt/5480/1/sa-90120-v_PDF/sa-90120-v_PDF_X-C/sa-90120-v_0000_1_tX-C.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2018.

BIONDA, Clarisa de Lourdes; TADA, Ismael Eduardo di; LAJMANOVICH, Rafael C. Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. **Russo Journal Of Herpetology**, v. 18, n. 2, p.93-98, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/258909974_Composition_of_amphibian_assemblages_in_agroecosystems_from_the_central_region_of_Argentina>. Acesso em: 03 jul. 2018.

BRITO, Arthur Luiz Raiol de. **DIETA DE LEPTODACTYLUS MACROSTERNUM (ANURALEPTODACTYLIDAE) EM ÁREAS DE RESTINGA E MANGUEZAL NA PENÍNSULA DE AJURUTEUA, BRAGANÇA, PARÁ, BRASIL**. 2011. 29 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Estudos Costeiros, da Universidade Federal do Pará, Faculdade de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Bragança, 2011. Disponível em:

<http://www.ufpa.br/lama/pub/tcc/arthur_luiz_raiol_de_brito.pdf>. Acesso em: 06 jul. 2018.

CARVALHO, José E.; NAVAS, Carlos A.; PEREIRA, Isabel C. Energy and Water in Aestivating Amphibians. **Aestivation**. p.141-169, 25 set. 2009. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-02421-4_7. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20069408>>. Acesso em: 08 maio, 2018.

CHAVES, Marcio Frazão. **CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLÓGICA DE LEPTODACTYLUS MACROSTERNUM (ANURA LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO BRASIL**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal Tropical, Universidade Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

COSTA. 2009, **PROJETO HORTO FLORESTAL OLHO D'ÁGUA DA BICA/UFMG/CES/UITÉ: Parte 1 - Diagnóstico sócio-ambiental - Relatório técnico final/ Cristiane Francisca da Costa (coord.) et al - Cuité: CES, 2009**. Disponível em: http://www.editorarealize.com.br/revistas/conapesc/trabalhos/TRABALHO_EV070_M D1_SA8_ID527_22032017204207.pdf. Acesso em: 09 jul, 2018.

FERREIRA, Adelina; ROSA, Ana Barbara dos Santos; MEHANNA, Mahmoud. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). **Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 4, p.447-452, ago. 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/269565572_Organizacao_celular_dos_testiculos_em_Hylidae_e_Leptodactylidae_no_Pantanal_Estado_do_Mato_Grosso_do_Sul_Brasil_-_DOI_104025actascibiolsxiv31i43332>. Acesso em: 20 abr. 2019.

FROST, D.R. 2008. **AMPHIBIANS SPECIES OF THE WOLRD 5.1** – an online reference. American Museum of Natural History: Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acesso em: 08 jul. 2018.

FROST, D.R. 2016. **AMPHIBIANS SPECIES OF THE WOLRD** – [online]. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia> Acesso em: 13 jun. 2018.

GIL, Antônio Carlos. **Como Elaborar Projetos de Pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Editora Atlas S.a, 2002. 176 p. Disponível em: <https://professores.faccat.br/moodle/pluginfile.php/13410/mod_resource/content/1/como_elaborar_projeto_de_pesquisa_-_antonio_carlos_gil.pdf>. Acesso em: 25 maio 2018.

GRAFE, T Ulmar; THEIN, J.. Energetics of calling and metabolic substrate use during prolonged exercise in the European treefrog *Hyla arborea*. **Journal Of Comparative Physiology B-biochemical Systemic And Environmental Physiology**. p. 69-76. fev. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263728>>. Acesso em: 16 maio 2018.

GRIER, Harry J. Chordate testis: The extracellular matrix hypothesis. **Journal Of Experimental Zoology**. p. 151-160. 01 fev. 1992. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jez.1402610206>>. Acesso em: 20 set. 2018.

GUPPY, M.; FUERY, C. J.; FLANIGAN, J. E.. Biochemical principles of metabolic depression. **Comparative Biochemistry And Physiology**. Grã-bretanha, p. 175-189. 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049194900019#!>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

GUPPY, Michael; WITHERS, Philip. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biological Reviews: Cambridge Philosophical Society**, Londres, p.1-40, fev. 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00180.x>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

HADDAD, Célio Fb; PRADO, Cynthia Pa. Modos reprodutivos em rãs e sua diversidade inesperada na Mata Atlântica do Brasil. **Bioscience: American Institute of Biological Sciences**, v. 55, p.207-217, 01 mar. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioscience/article/55/3/207/249667>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

HAND, Steven C.; HARDEWIG, Iris. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. **Annual Review Of Physiology**, v. 58, p.539-563, 1996. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ph.58.030196.002543>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

HEYER, R., LANGONE, J., LA MARCA, E., AZEVEDO-RAMOS, C., TADA, I., BALDO, D., LAVILLA, E., SCOTT, N., AQUINO, L. E HARDY, J., 2008. **Leptodactylus latrans**. Banco de dados eletrônico. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/57151/0>. Acesso em: 08 jun. 2018.

HOCKEY, Philip A. R.; CURTIS, Odette E. Use of Basic Biological Information for Rapid Prediction of the Response of Species to Habitat Loss. **Conservation Biology**,

[s.l.], v. 23, n. 1, p.64-71, fev. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.01028.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1523-1739.2008.01028.x>>. Acesso em: 08 ago. 2018.

HOPWOOD, D. Fixação e fixadores. Em: Bancroft JD, Stevens A **TEORIA E PRÁTICA DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**. New York, Churchill Livingstone, 3a ed., Págs. 21-42. 1990.

KREBS, Charles J. **Ecological Methodology**. 2. ed. Colúmbia: Addison Wesley Longman, Inc., 1999. 765 p. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35768621/Ecological_methodology_Krebs.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1554912622&Signature=Szs2TtYJNt7LFRZDZggmx63CfHs%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEcological_Methodology_Second_Edition.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2019.

LAVILLA, E. O.; LANGONE, J. A.; CARAMASCHI, U.; HEYER, R.; DE SÁ, R. O. **The identification of *Rana ocellata* Linnaeus, 1758**. Nomenclatural impact in the species currently known as *Leptodactylus ocellatus* (Leptodactylidae) and *Osteopilus brunneus* (Gosse, 1851) (Hylidae). *Zootaxa*, v. 2346, n.1, p. 1-16, 2010.

LOFTS, B. Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. **General And Comparative Endocrinology**, v. 4, n. 5, p.550-562, out. 1964. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0016648064900644>>. Acesso em: 09 jun. 2018.

MADELAIRE, Carla Bonetti. **RELAÇÃO SAZONAL ENTRE REPRODUÇÃO, IMUNIDADE E OCORRÊNCIA DE ENDOPARASITAS EM ANFÍBIOS ANUROS DA CAATINGA**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisiologia, Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MARTINS Marcio; POMBAL, José P; HADDAD, Celio. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, *Hyla faber*. **Amphibia-reptilia**, v. 19, n. 1, p.65-73, jan. 1998.

OLIVEIRA, Classius de; VICENTINI, Carlos Alberto. **DESCRIÇÃO ANATÔMICA DOS TESTÍCULOS E CORPOS ADIPOSOS DE *Scinax fuscovarius* (ANURA, HYLIDAE)**. **Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p.1-10, jun. 1998. Disponível em: <http://www.eventos.ibilce.unesp.br/lab Anatomia/downloads/1998_01.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2018.

OLIVEIRA, Classius de; ZANETONI, Cristiani; ZIERI, Rodrigo. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS TESTÍCULOS DE *Physalaemus cuvieri* (AMPHIBIA, ANURA). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 20, n. 3, 2002. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-98682002000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 15 ago. 2018.

OLIVEIRA, Classius de; ZIERI, Rodrigo. Pigmentação testicular em *physalaemusnattereri* (steindachner) (amphibia, anura): com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extra cutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 22, n. 2, p.1-7, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbzool/v22n2/25150.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

POUGH, F. Harvey; JANIS, Christine M.; HEISER, John B.. **AVIDA DOS VERTEBRADOS**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 750 p. Tradução de: Ana Maria de Souza, Paulo Auricchio, Coordenação Editorial da Edição Brasileira. Disponível em: <<http://www.avesmarinhas.com.br/A%20Vida%20dos%20Vertebrados.pdf>>. Acesso em: 05 maio, 2018.

RODRIGUES, Miguel Trefaut. Herpetofauna da Caatinga. In: LEAL, Inara R.; TABARELLI, Marcelo; SILVA, José Maria Cardoso da. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária Ufpe, 2003. Cap. 4. p. 181-236. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/5_livro_ecologia_e_conservao_da_caatinga_203.pdf>. Acesso em: 01 maio 2018.

SILVA, Soraia Santos de Oliveira Rodrigues. **CICLO ESPERMATOGÊNICO DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) MANTIDA EM CONDIÇÕES ABIÓTICAS CONTROLADAS**. 2017. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Minas Gerais, 2017. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/17726/texto%20completo.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 jul. 2018.

SIQUEIRA FILHO, Edson Ramos de. **INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA NA DIETA SOBRE ALGUNS ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS CARNEIROS**. 2006. 18 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu, 2006. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/sony/Edsom%20Ramos%20de%20Siqueira%20Filho.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2018.

WELLS, K.D. **Territoriality in the green frog (*Rana clamitans*): vocalizations and agonistic behaviour**. v 26, p. 1051-1063, nov.1978
WELLS, Kentwood D. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, p.666-693, ago. 1977. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000334727790118X?via%3Dihub>>.
Acesso em: 16 jul. 2018.

ZIERI, Rodrigo. **INFLUÊNCIA HORMONAL SOBRE O SISTEMA PIGMENTAR EM EUPEMPHIX NATTERERI (ANURA): EFEITOS DO ALPHA-MSH, ESTRADIOL E TESTOSTERONA.** 2010. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Animal, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto - SP, 2010.