

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS CAMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

OTILIE CAROLINA FORSTER

A influência parasitária de helmintos em aspectos reprodutivos de três espécies de anfíbios da RPPN Foz do Rio Aguapeí, município de Castilho, São Paulo, Brasil.

Botucatu

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS CAMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

OTILIE CAROLINA FORSTER

A influência parasitária de helmintos em aspectos reprodutivos de três espécies de anfíbios da RPPN Foz do Rio Aguapeí, município de Castilho, São Paulo, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Alves dos Anjos

Coorientador: Prof. Tit. Reinaldo José da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu-SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Forster, Otilie Carolina.

A influência parasitária de helmintos em aspectos reprodutivos de três espécies de anfíbios da RPPN Foz do Rio Aguapeí, município de Castilho, São Paulo, Brasil / Otilie Carolina Forster. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luciano Alves dos Anjos
Coorientador: Reinaldo José da Silva
Capes: 20400004

1. Anuro. 2. Anfíbios. 3. Helminto. 4. Reprodução.
5. Ciências da vida. 6. Zoologia.

Palavras-chave: Anfíbios anuros; Aspectos reprodutivos; Influência parasitária.

"Não há saber maior ou saber menor.

Existem saberes diferentes."

Paulo Freire

Agradecimentos

Começo esta sessão de agradecimentos, pelos meus entes familiares queridos. Não poderia dar início senão fosse com os meus pais, Eurilena Forster e José Luiz Forster. Gratidão por darem a oportunidade, de quando eu estava no plano espiritual, de poder me juntar a esta família, a fim de crescer em minha jornada evolutiva. Gratidão pelo amor incondicional de vocês, pela educação que me deram, pelos sacrifícios que fizeram (Não tenho a capacidade de imaginar quantos sacrifícios foram, mas sei que foram muitos, dos quais eu sei que vocês não se arrependem e fariam tudo de novo). Também agradeço aos meus queridos irmãos de sangue, minha irmã Marilda Helena Forster (para mim “Malinda”, por que ela é linda mesmo, por dentro de fora!), por sempre me apoiar em tudo o que eu quis fazer, tenho muito orgulho de você, 1a Tenente PQD Médica Forster. Agradeço ao meu irmão Sydney Forster Neto, vulgo “Fostereco”, irmão lindo que sempre “atazanei”, agradeço por acreditar em mim, como ser humano e como profissional. Amo muito todos vocês Família!

Agradeço ao meu Amor Ivan de Sousa Soares, por toda paciência, tolerância, carinho, compreensão, espera, cumplicidade, esperança etc. Fizemos sacrifícios em nome de nossas carreiras, o que pode ter deixado de lado um pouco o nosso pessoal. Não foi fácil, nunca é. Sacrifícios como a distância e a solidão, nessa jornada acadêmica, podem se tornar muito cruéis (tinha vez que conseguíamos passar um tempo juntos apenas 3 ou 4 vezes ao ano, durante todo o meu doutorado). Mas somos resilientes, pois somos fortes! Agradeço sempre, em um dia em Três Lagoas - MS, por dar carona a você e fomos comer pastel no Cilão, junto com nossos amigos da Moradia Estudantil da UFMS. TE AMO!!!

GRATIDÃO! Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Alves dos Anjos, pela paciência. Que me deu a oportunidade maravilhosa para o meu doutoramento! Por ser um cara muito bacana, em minha orientação, em dar conselhos e por puxar minha orelha quando era necessário e foi. Por ser um percussionista maravilhoso! Pela família linda e abençoada (Paola, Pietra, Léo e Max). E por me fazer voltar para minha origem, pois Ilha Solteira – SP (cidade espetacular) é um pulo da casa onde passei infância, adolescência e o começo da vida adulta.

Agradeço ao Professor Reinaldo José da Silva, por me abrir as portas do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres – LAPAS, UNESP de Botucatu, lugar que aprendi muito. Agradeço por me apresentar ao Prof. Luciano, a dar todo o suporte necessário para que meu projeto de doutorado acontecesse. Muito obrigada aos conselhos e ensinamentos que o senhor me permitiu.

Agradeço a toda equipe (Drausio Honório Moraes, Aline Aguiar, Lidiane Aparecida Firmino da Silva, Maysa Hernandes Ricardo Toledo, Aline Pomba Gouveia, Fabrício Marcel Wilson, Aline Angelina Acosta, Maria Isabel Muller, Fabio Hideki Yamada, Priscilla Fadel, Rodrigo Bravin Narciso, Jaciara Vanessa Krüger Paes, Érica de Oliveira Penha Zica, Alison Carlos Wunderlich, Aline Cristina Zago, Lidiane Franceschini, Karla Magalhães Campião, Mariana Ebert) do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres – LAPAS, UNESP de Botucatu, pela ajuda, aprendizados, cafés, risadas e amizades.

Agradeço a equipe (Murilo Queiroz, Jumma Miranda Chagas, Douglas Ribeiro, Franciele Xingu, Melody Bomon, Aline Parra, Mariana Pontes, Taiene Santos e Renan Leão) do LECOP – UNESP Ilha Solteira e vizinhos de laboratório, até que vocês são gente boa, brincadeira, vocês são nota 10.

Gratidão especial meu amigo, irmão de coração, Drausio Honório, pela sua amizade, pelos sábios conselhos, por ser um professor de qualidade, por me socorrer inúmeras vezes, por me apresentar ao Nayan, por sua sinceridade, serenidade, caráter e honestidade, por seu coração que é do tamanho do universo. “Estamos juntos irmão”!

Gratidão a Aline Aguiar, primeiramente por compartilhar do material de seu projeto de pesquisa a minha pessoa e também por me ajudar nesta jornada de pós-graduação.

Gratidão ao Fábio Hideki Yamada por ser um excelente profissional e sempre estar disposto a ajudar.

Gratidão aos amigos que conheci em Botucatu (Sergianne Frison e Cristiano Fernando Furno, Daniele Almeida, Maria Rita Gilli, Eduardo Barreto Aguiar, Tatiana Mira, Millke Jasmine Morales, Isabelle Leite Bayona Perez, Paula Severo, Rafael Precioso, Alexandre Mansano, Dael Vasques, Sergio Viana, Rodrigo Francisco, Aline Angelina, Jamile Queiroz, Lidiane Firmino, Aline Pomba). E os amigos de Ilha Solteira (Nathália Mantovanelli Bevilaqua, Letícia Manoel e Lucas, Francine Neri, Gabriela Baldoino, Franciele Xingu, Melody Bomon - embora esteja em outro continente, Murilo Torto, Jumma Miranda e Douglas Ribeiro, Renan Leão, Cristiele, Cristiane Bashiyo), vocês estarão sempre comigo, mesmo que cada um em seu canto!

Gratidão ao saudoso Professor Edmir Daniel Carvalho, ao qual tenho muito respeito, pois me ensinou muito, em vida. Ser humano de um coração que não cabia no peito de tão grande. Aprendi com o senhor a amar ainda mais a profissão que escolhi. Gratidão, pelas várias faces: Pai (pois sempre se

preocupou muito com o bem estar de seus pupilos), Filósofo, Professor Biólogo, Aventureiro, Conselheiro, Contador de “causos” etc. Que minha sincera saudação possa chegar ao senhor em qualquer lugar do outro plano onde estiver!

Gratidão mais que especial à organização Nayan. Na qual cito as palavras de lá: “NAYAN não é religião, ciência ou filosofia, nem um caminho espiritual ou místico. Não lhe oferece cura porque é incapaz de enxergar a doença e não fala para você mudar sua personalidade ou matar seu ego, porque ambos são transitórios. Não incentiva a busca do Eu verdadeiro, porque não se pode encontrar o que nunca foi perdido. Não facilita a queima de Karmas como um ingresso para uma próxima vida melhor, porque percebe o melhor da vida em todos os momentos. Não se baseia em livros e sim está enraizado na Natureza Maior, e nem define Deus, porque está ocupado em celebrá-lo... NAYAN é uma indicação: OLHE ATRAVÉS DA VIDA. Por meio do "olhar através da Vida" facilita o autoconhecimento e a autorrealização, a felicidade interna e a percepção da não dualidade em atividades que incentivam a celebração da existência e o sentimento de Gratidão à Vida. Vocês sempre me acolheram e sempre renovaram as minhas energias: GRATIDÃO! GRATIDÃO! GRATIDÃO!

E por fim agradeço a agência financiadora CAPES, pela minha bolsa de estudos de doutorado.

Sumário	
Resumo	1
Abstract	2
Capítulo I - A relação entre parasitismo e esforço reprodutivo: estado da arte	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução	6
Importância do parasitismo	7
Esforço reprodutivo	9
O parasitismo e o esforço reprodutivo	10
O parasitismo nos anfíbios	13
Conclusão	14
Referências bibliográficas	16
Capítulo II - Em que extensão o parasitismo influencia no esforço reprodutivo de três espécies de anfíbios anuros?	22
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Hipótese	28
Objetivos	28
Material e métodos	29

1. Área de estudo	29
2. Espécies de anuros	33
3. Coleta de anuros	35
4. Coleta das gônadas	37
5. Coleta dos helmintos	38
6. Análise de dados.....	39
Resultados	40
1. Anuros	40
2. Aspectos reprodutivos	41
3. Helmintofauna encontrada.....	45
4. Relação entre intensidade de infecção e aspectos reprodutivos.....	50
Discussão	59
1. Anuros	59
2. Aspectos reprodutivos.....	60
3. Helmintofauna encontrada.....	61
4. Relação entre intensidade de infecção e aspectos reprodutivos	61
Conclusão	64
Referências bibliográficas	65
Anexo I	75

Resumo

A referida tese é o resultado de um trabalho que buscou discutir, como tema geral, o impacto que os parasitas podem causar na ecologia de seus hospedeiros. Ela foi dividida em dois capítulos: o primeiro capítulo é uma revisão bibliográfica que discute sobre como os parasitas podem influenciar no desempenho reprodutivo de seus hospedeiros; e o segundo capítulo investigou em três espécies de anfíbios anuros (*Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*, e *Hypsiboas raniceps*), se os indivíduos parasitados por helmintos são acometidos por alterações em aspectos da reprodução. As três espécies de anuros estudadas, não apresentaram evidências que possam ter alguma relação entre a intensidade parasitária de helmintos e caracteres morfológicos associados à reprodução. O que sugere que estas espécies estudadas apresentem respostas imunológicas e/ou adaptações fisiológicas mediante infecção parasitária.

Abstract

This thesis is the result of a work that sought to discuss, as a general theme, the impact that parasites can have on the ecology of their hosts. It was divided into two chapters: the first chapter is a literature review that discusses how the parasites can influence the reproductive performance of their hosts; and the second chapter investigated in three species of anuran amphibians (*Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*, and *Hypsiboas raniceps*), if the individuals parasitized by helminths are affected by changes in aspects of reproduction. The three species of anurans studied didn't present evidence that could have any relation between the parasite intensity of helminths and morphological characters associated to reproduction. This suggests that these species studied present immunological responses and/or physiological adaptations through parasitic infection.

CAPÍTULO I

A relação entre parasitismo e esforço reprodutivo: estado da arte

Resumo

Este capítulo teve como objetivo discutir como os parasitas podem influenciar no desempenho reprodutivo de seus hospedeiros. Trata-se de uma revisão bibliográfica baseada na literatura especializada na temática relações parasito-hospedeiro. A importância dos parasitas está relacionada ao impacto que eles podem causar na ecologia de seus hospedeiros. O parasitismo é uma forma muito comum de vida e um dos meios mais prováveis e predominantes para aquisição de alimentos entre os seres vivos. O sucesso da relação parasita-hospedeiro dependerá do balanço entre as reações imunes do hospedeiro e a capacidade do parasito em modular estas reações. A infecção parasitária é frequentemente associada com alterações nos hospedeiros que podem afetar o desempenho reprodutivo. Assim como alguns parasitas possuem a capacidade de inibir a reprodução dos hospedeiros a seu favor, os hospedeiros podem responder às infecções, mudando seu esforço reprodutivo. Em tese, um hospedeiro pode responder de forma adaptativa ao parasitismo, o que pode diminuir ou aumentar o investimento na reprodução do hospedeiro, com ou sem indução de defesas fisiológicas, comportamentais ou morfológicas. A mortalidade e declínio dos anfíbios por parasitismo faz das infecções parasitárias um fator considerável na biologia da conservação, pois são potenciais agentes seletivos na evolução dos anfíbios. Todavia, são poucos os trabalhos que relacionam o parasitismo, e seus efeitos, sobre a eficiência reprodutiva dos anuros, portanto são necessários estudos que avaliam qual a extensão dos efeitos causados pelos parasitas sobre o sucesso reprodutivo dos anfíbios.

Abstract

This chapter aimed to discuss how the parasites can influence the reproductive performance of their hosts. This is a bibliographical review based on the specialized literature on the parasite-host relationship. The importance of parasites is related to the great impact that they may cause to the ecology of their hosts. The parasitism is a very common way of life and one of the most likely and prevalent means for food procurement among the living beings. The success of the parasite-host relation will depend on the balance between the immune reactions of the host and the parasite's ability to modulate these reactions. The parasitic infection is often associated with alterations in the hosts that can affect alterations in the reproductive performance. Just like, some parasites possess the ability to inhibit the reproduction of the hosts in their favor, the hosts can respond to infections, changing its reproductive effort. In thesis, a host can respond in an adaptive manner to parasitism, which can decrease or increase the investment in reproduction of the host, with or without induction of physiological, behavioral or morphological defenses. The mortality and decline of amphibians by parasitism makes the parasitic infections a considerable factor in conservation biology, since are potential selective agents in the evolution of amphibians. However, there are few studies that related the parasitism, and its effects, on the reproductive efficiency of anurans, therefore are needed further studies that evaluates what is the extent of the effects caused by parasites on the reproductive success of amphibians.

INTRODUÇÃO

Este capítulo enfoca sobre a relação do parasitismo com o esforço reprodutivo de seus hospedeiros. Será que os parasitas podem influenciar no desempenho reprodutivo de seus hospedeiros anuros?

Os parasitologistas, até o ano de 1970, focaram seus estudos em descrições de ciclos de vida, patologias causadas por parasitas, controle de pragas e agentes causadores de doenças (Zuk & Stoehr, 2002). Somente, no começo dos anos 80, os aspectos da biologia e ecologia dos parasitas começaram a ser explorados por ecólogos e evolucionistas (Zuk & Stoehr, 2002). Na conjuntura anterior, tínhamos um cenário de pesquisas focadas em trabalhos descritivos, de “causa e efeito” e controle de parasitos. A partir do final década de 70, a relação parasita-hospedeiro começou a aparecer em artigos de ecologia e evolução, surgindo então perguntas relacionadas ao “fitness” de seus hospedeiros e como esta relação afetaria o investimento em sobrevivência e reprodução dos hospedeiros (Zuk & Stoehr, 2002). Dos trabalhos que focaram essa nova abordagem, podemos citar:

Price (1977) apresentou uma síntese sobre três aspectos importantes para compreensão sobre parasitas, reavaliou a abundância de espécies de parasitas, apresentou conceitos gerais sobre a ecologia e evolução dos parasitas, derivados de uma combinação de biologia populacional, teoria evolutiva e biologia parasitária, e fez previsões derivadas de modelos conceituais gerais para servirem de guia para estudos críticos da biologia parasitária que precisariam ser examinados e testados em populações naturais.

Minchella (1985) examinou estratégias alternativas disponíveis para um hospedeiro enfrentar uma infecção parasitária. Esta revisão abordou as estratégias utilizadas de moluscos como hospedeiros intermediários, em resposta ao parasitismo por trematódeos digenéticos. O autor estudou quais as condições de resistência do hospedeiro que podem ser esperadas para evolução de uma população. Também considerou alternativas de história de vida dos hospedeiros quanto à resistência para minimizar os efeitos prejudiciais dos parasitas.

Forbes (1993) descreveu abordagens baseadas em teorias de história de vida a fim de prever mudanças adaptativas no esforço reprodutivo do hospedeiro assim como explicar a importâncias dos estudos de mudanças adaptativas no esforço reprodutivo do hospedeiro no enfoque da coevolução parasita-hospedeiro e evolução da plasticidade fenotípica.

Poulin (1995), que fez uma revisão sobre as mudanças de comportamento de animais parasitados, na qual se utilizam de fundamentos teóricos a fim de questionar a generalidade de regras gerais sobre a evolução dos parasitas, regras de delineamento de um caminho evolutivo comum, seguido de todos os organismos parasitas. Destes fundamentos o autor demonstra que a evolução do parasita pode adotar caminhos distintos.

Importância do parasitismo

A importância dos parasitas está relacionada ao grande impacto que eles podem causar na ecologia de seus hospedeiros (Chandra & Gupta, 2007). Alguns estudos realizados sugerem que os parasitas são capazes de regular o

tamanho das populações de hospedeiros (Püttker *et al.*, 2008; Morand & Guégan, 2008), crescimento dos hospedeiros (Kelehear *et al.*, 2011), bem como a biodiversidade da comunidade local podendo até mesmo ser responsável pela extinção local de algumas espécies de hospedeiros (Lindenfors *et al.*, 2007).

Tomando como exemplo, os nematoides se alimentam dos nutrientes do conteúdo intestinal ou dos tecidos de seus hospedeiros (Quinnell *et al.*, 1990), o que pode acarretar em respostas imunológicas custosas (Lochmiller & Deerenberg, 2000) e pode causar insuficiência nos estoques energéticos dos seus hospedeiros. Essa deficiência energética pode prejudicar os indivíduos parasitados, pois eles podem ter menos energia para gastar em reprodução (Bollache *et al.*, 2001), fisiologia (Hernández-Bello *et al.*, 2010), comportamento (De Jong-Brink & Koene, 2005) e sobrevivência (Fuller & Blaunstein, 1996). A perda de energia ocasionada por parasitas pode levar ao comprometimento do valor adaptativo (“*fitness*”, *W*) do animal parasitado (Schüpbach & Baur, 2008).

Existem várias definições para o termo parasitismo, dentre estas a definição de Poulin (2007) determina que “o parasita é um organismo que vive em outro organismo, o hospedeiro, alimentando-se deste, apresentando algum grau de adaptação estrutural para isso e causando ao seu hospedeiro algum dano”. O parasitismo é uma forma muito comum de vida e um dos meios mais prováveis e predominantes para aquisição de alimentos entre os seres vivos (Price, 1977). Além disso, mesmo que os parasitas possam utilizar de diversas espécies de hospedeiros, eles podem ser considerados especialistas, pois ao longo da história de vida foram traçados laços coevolutivos (Price, 1977). O sucesso da relação

parasita-hospedeiro dependerá do balanço entre as reações imunes do hospedeiro e a capacidade do parasito em modular estas reações (Wikel, 1996).

Esforço reprodutivo

O esforço reprodutivo tornou-se o principal conceito nas teorias de evolução da história natural dos seres vivos (Hirshfield & Tinkle, 1975). Fisher (1930) indicou a importância de mensurar como os organismos alocam a sua energia, entre as diversas necessidades como crescimento, manutenção, reprodução e como a seleção natural se ajustaria a isso. Como definição, o esforço reprodutivo é a proporção de energia total, obtida durante um intervalo de tempo, que um determinado organismo se dedica à reprodução (Williams, 1966). Um indivíduo enfrenta a decisão alocar ou não alocar recursos energéticos em reprodução e, em caso afirmativo, quanta energia será investida nesse esforço reprodutivo (Baudoin, 1975). Os processos mais custosos energeticamente são a maturação de gônadas e a produção de gametas (Cichon, 1999), o que demanda a mobilização de reservas energéticas acumuladas (Da Silva & Zancan, 1994).

Stearns (1989) sugere que os recursos energéticos estão diretamente relacionados ao tempo de vida de um ser vivo, sendo necessário ter um alto investimento energético para ter sucesso reprodutivo. Ou seja, a quantidade de energia investida no processo reprodutivo é uma característica importante da história de vida de um dado indivíduo, pois a forma de distribuição dos recursos está diretamente relacionada ao tempo de vida do animal (Stearns, 1989). Stearns (1989) ainda explica que os organismos tendem a uma partilha

energética comedida entre crescimento somático, reprodução e longevidade, direcionando a um maior sucesso reprodutivo.

O parasitismo e o esforço reprodutivo

A infecção parasitária é frequentemente associada com alterações fisiológicas nos hospedeiros que podem resultar em alterações de desempenho reprodutivo (Schultz *et al.*, 2006). Os hospedeiros podem responder às infecções parasitárias, mudando a estratégia de investimento reprodutivo (Minchella, 1985). Adicionalmente, as alterações de comportamento do hospedeiro mediadas por parasitas podem depender do ciclo de vida do parasita (Klein, 2005). Ou seja, podem aumentar a sobrevivência e a taxa reprodutiva do hospedeiro por meio do contato social ou predação (Klein, 2005). Por exemplo, os vírus que têm ciclos de vida diretos comumente causam agressividade e contato físico em populações de hospedeiros (Klein *et al.*, 2004). No caso de um parasita com ciclo de vida indireto, a sobrevivência e a reprodução podem ser aumentadas principalmente por predação (Kavaliers *et al.*, 2000). Assim, o modo de transmissão e o ciclo de vida dos parasitas podem influenciar em mecanismos de comportamento e fisiologia dos hospedeiros (Klein, 2005).

A resistência ao parasitismo pode estar relacionada a desvantagens como a redução da fecundidade, pois a eficiência do sistema imunológico do hospedeiro pode alocar uma quantidade significativa de energia, prejudicando a reprodução (Wright, 1971). Moller (1993) explica que os animais sofrem custos de reprodução devido às condições ambientais nocivas, como a presença de parasitas e

doenças, que podem afetar as atividades reprodutivas dos hospedeiros. Deste modo, os parasitas podem desempenhar fortes pressões seletivas nos hospedeiros (Sorci *et al.*, 1996). A diminuição da fecundidade é uma das consequências da redução de recursos energéticos para a reprodução (Richner *et al.*, 1993). Sendo assim, alguns parasitas possuem a capacidade de inibir a reprodução dos hospedeiros (Hurd, 2001). De acordo com Hurd (2001), a redução da fecundidade é um resultado bastante comum devido à infecção parasitária e que esta redução não necessariamente seja um fator adaptativo e sim um produto de alguma doença debilitante devido à infecção por parasita. Ainda, a redução pode ser uma adaptação do hospedeiro que evoluiu em resposta ao parasitismo e ser uma estratégia do parasita, a fim de limitar danos ao hospedeiro (Hurd, 2001). Em contrapartida, o parasita teria mais nutrientes disponíveis à sua sobrevivência e o hospedeiro teria uma vida útil superior (Hurd, 2001).

Minchella (1985), explica que o impacto do parasitismo sobre os hospedeiros vai depender de fatores como a presença de genes de resistência na população hospedeira, a patogenicidade do parasita e seu efeito sobre o sucesso reprodutivo dos hospedeiros, a probabilidade do contato do parasita no meio ambiente e do custo relativo da resistência do hospedeiro em relação aos fatores anteriormente citados.

Pode-se observar que em alguns casos, há a ocorrência da compensação de fecundidade (Minchella & Loverde, 1981). Minchella & Loverde (1981), estudaram caracóis de *Biomphalaria glabrata* que foram submetidos à exposição do parasita *Schistosoma mansoni* e perceberam que os moluscos hospedeiros, logo após serem expostos a estes parasitas, tenderam a compensar mortalidade,

redução e interrupção completa da produção de ovos, pelo aumento na postura de ovos. O aumento da produção reprodutiva pode compensar, em parte, a futura perda esperada no sucesso reprodutivo, a fim de que a reprodução ocorra antes da castração parasitária do hospedeiro (Minchella, 1985). Esta estratégia pode ser considerada uma alternativa de baixo custo à resistência do hospedeiro.

Baudoin (1975) foi quem descreveu a castração parasitária como estratégia do parasita. Esta estratégia consiste na castração do hospedeiro através de uma sequência de estados fisiológicos ou comportamentais de um genótipo, resultando na diferenciação de fatores determinantes à aptidão desse genótipo (Baudoin, 1975). Essa estratégia envolve uma redução do "esforço reprodutivo" do hospedeiro (Baudoin, 1975). Mais uma vez, os parasitas podem se utilizar como vantagem a redução no esforço reprodutivo do hospedeiro, como: aumento da disponibilidade de energia (Hughes, 1940), aumento da sobrevivência do hospedeiro (Goertz, 1966), e aumento do crescimento do hospedeiro (Cheng, 1971). Baudoin (1975) postula que a castração por parasitas pode ser uma adaptação afim de maior aptidão do parasita.

Em literatura recente, Lima (2014), cita que a história de vida dos hospedeiros pode ser alterada por três possíveis estratégias: A reprodução dos parasitas pode interferir na energia destinada à reprodução de seu hospedeiro, causando a castração parasitária; O hospedeiro pode reduzir o investimento reprodutivo para combater a atuação do parasita; e o parasitismo pode não afetar diretamente o esforço em reprodução.

Por fim, Forbes (1993) reforça que, em teoria, um hospedeiro pode responder de forma adaptativa ao parasitismo. Esta resposta pode diminuir ou

aumentar o investimento na reprodução do hospedeiro, com ou sem indução de defesas fisiológicas, comportamentais ou morfológicas.

O parasitismo nos anfíbios

O papel dos parasitas na mortalidade e declínio dos anfíbios tem sido citado por alguns autores (ver Todd, 2007), o que faz das infecções parasitárias um fator considerável na biologia da conservação (Muniz-Pereira *et al.*, 2009; Morand & Guégan, 2008), pois os parasitas são potenciais agentes seletivos na evolução dos anfíbios (Todd, 2007). Todd (2007) ainda defende que os parasitas devem ser considerados na evolução dos comportamentos reprodutivos de anfíbios, citando três razões principais: (1) muitos parasitas de anfíbios dependem de estágios infectantes aquáticos para transmissão e reprodução; (2) os anfíbios, por terem sua reprodução aquática, aumentam a persistência e dispersão do parasita em populações terrestres; e (3) antes da metamorfose, os anfíbios anuros tem baixa imunidade em relação aos adultos, o que os tornam mais suscetíveis à mortalidade impulsionada pelos parasitas.

Com relação à reprodução dos anfíbios, os machos dispendem energia na defesa, manutenção de território e vocalização enquanto que as fêmeas alocam boa parte dos seus recursos na produção de ovos (Wells, 2007). Contudo, poucos trabalhos têm relacionado o parasitismo, e seus efeitos, sobre a eficiência reprodutiva dos anuros. Recentemente Madelaire *et al.* (2013) demonstraram que para *Hypsiboas prasinus* (Hylidae) há uma relação negativa entre intensidade parasitária e taxa de vocalização. Todd (2007) discute a evolução das estratégias reprodutivas alternativas em anfíbios com base na relação parasito-hospedeiro,

argumentando que a evolução da diversidade de modos reprodutivos dos anfíbios pode ter sido o efeito de estratégias para escapar dos parasitas.

Os trabalhos realizados por Goater *et al.* (1993), Goater (1994) e Goater & Vandembos (1997) avaliaram anfíbios anuros e a relação parasita-hospedeiro. Apesar destes trabalhos não terem o enfoque nos efeitos do esforço reprodutivo e sim em sobrevivência e crescimento de larvas de anuros (girinos), são trabalhos de suma importância que evidenciam como o parasitismo pode influenciar na história de vida de seus hospedeiros.

Galdino *et al.* (2014), estudaram a helmintofauna do lagarto *Tropidurus hispidus* e relataram que a intensidade da infecção parasitária está negativamente correlacionada ao investimento reprodutivo. Foi encontrada uma interdependência inversa entre o esforço reprodutivo das fêmeas e a carga de parasitas, o que pode ser explicado por parasitas diminuindo a condição de saúde das fêmeas e redirecionando as reservas de energia que normalmente vão para produzir uma ninhada. Ainda, que as fêmeas mais fracas já têm baixo investimento reprodutivo, sendo mais suscetíveis a infecções por helmintos (Galdino *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Apesar da discussão sobre a interação parasito-hospedeiro e a evolução do modo reprodutivo nos anfíbios, há ainda uma carência de estudos que avaliem qual é a extensão dos efeitos causados pelos parasitas sobre o sucesso reprodutivo dos anfíbios. Este projeto propõe investigar se a infecção por

helminthos afeta a reprodução dos anfíbios, avaliando os efeitos no sucesso reprodutivo de fêmeas e machos em três espécies de anuros.

Referências bibliográficas

BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. *Evolution*, p. 335-352, 1975.

BOLLACHE, L; GAMBADE, G; CÉZILLY, F. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 49, n. 4, p. 296-303, 2001.

CHANDRA, P; GUPTA, N. Habitat preference and seasonal fluctuations in the helminthofauna of amphibian hosts of Rohilkhand Zone, India. *Asian Journal of Experimental Science*, v. 21, p. 69-78, 2007.

CHENG, T. C. Enhanced growth as a manifestation of parasitism and shell deposition in parasitized mollusks. *Aspects of the biology of symbiosis*. Baltimore, p. 103-137, 1971.

CICHOŃ, M. Growth after maturity as a sub-optimal strategy. *Acta Oecologica*, v. 20, n. 1, p. 25-28, 1999.

DA SILVA, R.S.M.; ZANCAN, D.M. Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod, *Megalobulimus oblongus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 108, n. 2-3, p. 337-341, 1994.

DE JONG-BRINK, M; KOENE, J. M. Parasitic manipulation: going beyond behaviour. *Behavioural processes*, v. 68, n. 3, p. 229-233, 2005.

FISHER, R. A. The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition. Oxford University Press, 1930.

FORBES, M. R. L. Parasitism and host reproductive effort. *Oikos*, p. 444-450, 1993.

FULLER, C. A.; BLAUSTEIN, A. R. Effects of the parasite *Eimeria arizonensis* on survival of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Ecology*, v. 77, n. 7, p. 2196-2202, 1996.

GALDINO, C. A.; ÁVILA, R. W.; BEZERRA, C. H.; PASSOS, D. C.; MELO, G. C.; ZANCHI-SILVA, D. Helminths infection patterns in a lizard (*Tropidurus hispidus*) population from a semiarid Neotropical area: associations between female reproductive allocation and parasite loads. *Journal of Parasitology*, v. 100, n. 6, p. 864-867, 2014.

GOATER, C.P. Growth and survival of postmetamorphic toads: interactions among larval history, density, and parasitism. *Ecology*, v. 75, n. 8, p. 2264-2274, 1994.

GOATER, C.P.; SEMLITSCH, R.D.; BERNASCONI, M.V. Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. *Oikos*, p. 129-136, 1993.

GOATER, C.P.; VANDENBOS, R.E. Effects of larval history and lungworm infection on the growth and survival of juvenile wood frogs (*Rana sylvatica*). *Herpetologica*, p. 331-338, 1997.

GOERTZ, J.W. Incidence of warbles in some Oklahoma rodents. *American Midland Naturalist*, p. 242-245, 1966.

HERNÁNDEZ-BELLO, R.; ESCOBEDO, G.; GUZMAN, C.; IBARRA-CORONADO, E. G.; LÓPEZ-GRIEGO, L.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine host–parasite interactions during helminth infections: from the basic knowledge to its possible therapeutic applications. *Parasite immunology*, v. 32, n. 9-10, p. 633-643, 2010.

HIRSHFIELD, M. F.; TINKLE, D. W. Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 72, n. 6, p. 2227-2231, 1975.

HUGHES, T. E. The effects on the fat and starch metabolism of *Gebia* by the parasite *Gyge branchialis*. *J. exp. Biol.*, v. 17, p. 331-336, 1940.

HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trends in parasitology*, v. 17, n. 8, p. 363-368, 2001.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D. D.; CHOLERIS, E. Parasites and Behaviour: An Ethopharmacological Perspective. *Parasitology Today*, v. 16, n. 11, p. 464-468, 2000.

KELEHEAR, C.; BROWN, G. P.; SHINE, R. Influence of lung parasites on the growth rates of free-ranging and captive adult cane toads. *Oecologia*, v. 165, n. 3, p. 585-592, 2011.

KLEIN, S.L. Parasite manipulation of host behavior: mechanisms, ecology, and future directions. *Behavioural processes*, v. 68, n. 3, p. 219-221, 2005.

KLEIN, S.L.; ZINK, M.C.; GLASS, G.E. Seoul virus infection increases aggressive behaviour in male Norway rats. *Animal Behaviour*, v. 67, n. 3, p. 421-429, 2004.

LIMA, N. R. W. História de Castradores Parasitários e seus Hospedeiros. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, v. 1. 96p, 2014.

LINDENFORS, P.; NUNN, C. L.; JONES, K. E.; CUNNINGHAM, A. A.; SECHREST, W.; GITTLEMAN, J. L. Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecology and Biogeography*, v. 16, n. 4, p. 496-509, 2007.

LOCHMILLER, R. L.; DEERENBERG, C. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, v. 88, n. 1, p. 87-98, 2000.

MADELAIRE, C. B.; DA SILVA, R. J.; GOMES, F. Ribeir. Calling behavior and parasite intensity in treefrogs, *Hypsiboas prasinus*. *Journal of Herpetology*, v. 47, n. 3, p. 450-455, 2013.

MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology*, v. 90, n. 01, p. 205-216, 1985.

MINCHELLA, D.J.; LOVERDE, P.T. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. *The American Naturalist*, v. 118, n. 6, p. 876-881, 1981.

MØLLER, A. P. Ectoparasites increase the cost of reproduction in their hosts. *Journal of Animal Ecology*, p. 309-322, 1993.

MORAND, S.; GUÉGAN, J. F. How the biodiversity sciences may aid biological tools and ecological engineering to assess the impact of climatic changes. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v. 27, n. 2, p. 355-366, 2008.

MUNIZ-PEREIRA, L. C.; VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L. Checklist of helminth parasites of threatened vertebrate species from Brazil. *Zootaxa*, v. 2123, p. 1-45, 2009.

POULIN, R. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 12, p. 1371-1383, 1995.

POULIN, R. Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology*, v. 134, n. 6, p. 763-776, 2007.

PRICE, P. W. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution*, p. 405-420, 1977.

PÜTTKER, T.; MEYER-LUCHT, Y.; SOMMER, S. Effects of fragmentation on parasite burden (nematodes) of generalist and specialist small mammal species in secondary forest fragments of the coastal Atlantic Forest, Brazil. *Ecological Research*, v. 23, n. 1, p. 207-215, 2008.

QUINNELL, R. J.; MEDLEY, G. F.; KEYMER, A. E. The regulation of gastrointestinal helminth populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 330, n. 1257, p. 191-201, 1990.

RICHNER, H.; OPPLIGER, A.; CHRISTE, P. Effect of an ectoparasite on reproduction in great tits. *Journal of Animal Ecology*, p. 703-710, 1993.

SCHULTZ, E. T.; TOPPER, M.; HEINS, D. C. Decreased reproductive investment of female threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* infected with the cestode *Schistocephalus solidus*: parasite adaptation, host adaptation, or side effect? *Oikos*, v. 114, n. 2, p. 303-310, 2006.

SCHÜPBACH, H. U.; BAUR, B. Parasitic mites influence fitness components of their host, the land snail *Arianta arbustorum*. *Invertebrate Biology*, v. 127, n. 3, p. 350-356, 2008.

SORCI, G.; CLOBERT, J.; MICHALAKIS, Y. Cost of reproduction and cost of parasitism in the common lizard, *Lacerta vivipara*. *Oikos*, p. 121-130, 1996.

STEARNS, S. C. Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*, v. 3, n. 3, p. 259-268, 1989.

TODD, B. D. Parasites lost? An overlooked hypothesis for the evolution of alternative reproductive strategies in amphibians. *The American Naturalist*, v. 170, n. 5, p. 793-799, 2007.

WELLS, K. D. *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press, 2007.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host cytokines. *Experimental Parasitology*, v. 84, n. 2, p. 304-309, 1996.

WILLIAMS, G. C. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, v. 100, n. 916, p. 687-690, 1966.

WRIGHT, C. A. Review of "Genetics of a Molluscan Vector of *Schistosomiasis*" by CS Richards. *Tropical Disease Bulletin*, v. 68, p. 333-335, 1971.

ZUK, M.; STOEHR, A. M. Immune defense and host life history. *The American Naturalist*, v. 160, n. S4, p. S9-S22, 2002.

Capítulo II

Em que extensão o parasitismo influencia no esforço reprodutivo em três espécies de anfíbios anuros?

Resumo

Embora haja a discussão sobre a interação parasito-hospedeiro e a evolução do modo reprodutivo nos anfíbios, ainda são poucos os trabalhos científicos que avaliam a extensão dos efeitos causados pelos parasitas sobre o sucesso reprodutivo dos anfíbios. Este estudo investigou, em três espécies de anfíbios anuros (*Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus* e *Hypsiboas raniceps*), se os indivíduos parasitados por helmintos são acometidos por alterações em aspectos da reprodução (massa dos ovários, número de ovócitos maduros e média de diâmetro dos ovócitos; massa dos testículos e volume dos testículos; e esforço reprodutivo de fêmeas e machos). A área de estudo escolhida foi a RPPN Foz do Rio Aguapeí que abrange o município de Castilho - SP, uma área de Conservação Ambiental com representatividade ecológica e regional conhecida como “pantaninho paulista”. Durante o período das chuvas, 115 animais foram coletados (*L. podicipinus*, com 35 fêmeas e 30 machos; *L. chaquensis*, com 10 fêmeas e 10 machos; e *H. raniceps*, com três fêmeas e 27 machos). Nas análises de regressão, as três espécies selecionadas não apresentaram relação significativa entre a intensidade de infecção e a massa das gônadas dos anuros, número de ovócitos maduros, diâmetro médio dos ovócitos, volume do testículo e o esforço reprodutivo em nenhuma das três espécies de anuros hospedeiros. Deste modo, este estudo sugere as espécies estudadas podem apresentar respostas imunológicas e/ou adaptações fisiológicas mediante infecção parasitária.

Abstract

Although there is a discussion about parasite-host interaction and evolution of the reproductive mode in amphibians, there are few the scientific studies that evaluate the extent of the effects caused by the parasites on the reproductive success of amphibians. This study investigated, in three species of anuran amphibians (*Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*, and *Hypsiboas raniceps*), whether individuals infected with helminths are affected by changes in aspects of reproduction (ovarian mass, number of mature oocytes and mean oocyte diameter, testicles mass and testicles volume, and reproductive effort of females and males). The study area chosen was the RPPN Foz do Rio Aguapei, covering the municipality of Castilho – SP, – an environmental conservation area with ecological and regional representation known as “pantaninho paulista”. During the raining season, 115 animals were collected (*L. podicipinus* with 35 females and 30 males; *L. chaquensis* with 10 females and 10 male, and *H. raniceps*, 3 females and 27 males). In the regression analyzes, the three species selected did not present a significant relation between the intensity of infection and the mass of the gonads of the anurans, number of mature oocytes, mean oocyte diameter, testis volume and reproductive effort in none of the three species of host anurans. Thus, this study suggests that the species studied may present immunological responses and / or physiological adaptations through parasitic infection.

Introdução

Embora a definição de parasitismo venha sendo aplicada indiscriminadamente a uma variedade de interações interespecíficas, Poulin (2007) assume que “o parasita é um organismo que vive em outro organismo, o hospedeiro, alimentando-se deste, apresentando algum grau de adaptação estrutural para isso e causando ao seu hospedeiro algum dano”. O papel dos parasitas na mortalidade e declínio dos anfíbios tem sido discutido por alguns autores (Todd, 2007), o que faz das infecções parasitárias um fator considerável na biologia da conservação (Morand & Guégan, 2008; Muniz-Pereira *et al.*, 2009). Tinkle e Tilley (1970) citam que um ser vivo pode ter sua história de vida ajustada por um conjunto de atributos relacionados que podem afetar a sobrevivência de um indivíduo, assim como seu potencial reprodutivo.

As infecções por parasitas são frequentemente associadas com alterações em crescimento, sobrevivência (Boonstra *et al.*, 1980) e sucesso reprodutivo dos hospedeiros (Forbes, 1993). Em teoria, Forbes (1993) cita que um hospedeiro pode responder de forma adaptativa ao ataque de alguns parasitas o que pode levar a um decréscimo ou a um aumento no investimento reprodutivo. Estas respostas podem ser ocasionadas com ou sem a indução de defesas comportamentais, morfológicas ou fisiológicas do hospedeiro (Forbes, 1993).

A importância dos parasitas está relacionada ao impacto que eles podem causar na ecologia de seus hospedeiros (Chandra & Gupta, 2007). Estudos sugerem que eles são capazes de regular o tamanho das populações de hospedeiros (Püttker *et al.*, 2008; Morand & Guégan, 2008), crescimento dos

hospedeiros (Kelehear *et al.*, 2011) bem como a biodiversidade da comunidade local podendo até mesmo ser responsável pela extinção de algumas espécies de hospedeiros (Lindenfors *et al.*, 2007).

Mudanças comportamentais e alterações fisiológicas são fatores importantes que modulam o ciclo reprodutivo em relação às condições ambientais, sendo importantes na manutenção dos anfíbios no ambiente (Duellman & Trueb, 1994; Wells, 2007). Todo o controle do ciclo reprodutivo requer que os organismos sejam capazes de detectar mudanças ocorridas no meio e ajustar a sua fisiologia através do sistema endócrino, podendo alterar processos e estratégias para obtenção de energia (Callard *et al.*, 1978; Wells, 2007).

Minchella (1985), estudando uma espécie de caramujo da família Planorbidae, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, sugeriu que há três interpretações alternativas para o investimento reprodutivo reduzido. A primeira possibilidade, trata-se de uma estratégia do parasita, o qual inibe a função reprodutiva do hospedeiro por desregulação endócrina, para conservar a energia do mesmo e aumentar a produção de larva do parasita. A segunda possibilidade se dá o parasita rouba das reservas energéticas do hospedeiro, prejudicando o investimento reprodutivo do mesmo. A terceira possibilidade, pode-se tratar de uma estratégia do hospedeiro que para compensar a infecção por parasitas reduz o investimento reprodutivo.

Os nematoides, por exemplo, se alimentam dos nutrientes do conteúdo intestinal ou dos tecidos de seus hospedeiros (Quinnell *et al.*, 1990), podendo induzir respostas imunológicas custosas (Lochmiller & Deerenberg, 2000) e

causando déficits nos estoques energéticos dos seus hospedeiros. Conseqüentemente, indivíduos parasitados podem ter menos energia para gastar em reprodução (Bollache *et al.*, 2001), fisiologia (Hernández-Bello *et al.*, 2010), comportamento (De Jong-Brink & Koene, 2005) e sobrevivência (Fuller & Blaunstein, 1996), comprometendo o seu valor adaptativo (fitness, “W”) (Schüpbach & Baur, 2008).

Com relação à reprodução dos anfíbios, os machos dispõem energia na defesa, manutenção de território e vocalização enquanto que as fêmeas alocam boa parte dos seus recursos na produção de ovos (Wells, 2007). Contudo, poucos trabalhos têm relacionado o parasitismo, e seus efeitos, sobre a eficiência reprodutiva dos anuros. Recentemente Madelaire *et al.* (2013) demonstraram que para *Hypsiboas prasinus* (Hylidade) há uma relação negativa entre intensidade parasitária e taxa de vocalização. Todd (2007) discute a evolução das estratégias reprodutivas alternativas em anfíbios com base na relação parasito-hospedeiro, argumentando que a diversidade de modos reprodutivos existentes para os anfíbios pode ter sido o efeito de estratégias para escapar dos parasitas.

Dentro de estudos de reprodução, o esforço reprodutivo é uma razão que permite mensurar o custo da reprodução (Stearns, 1992). O esforço reprodutivo pode ser obtido pelas proporções do peso de gônadas em relação ao peso do corpo ou o volume da desova em relação ao volume do corpo (Crump, 1974). E, em se tratando de anfíbios anuros, a relação entre características reprodutivas e tamanho do corpo da fêmea, tais como massa e tamanho das gônadas, número de ovos por desova ou diâmetro dos ovos, são importantes (Kokubum & Giaretta, 2005; Prado e Haddad, 2005) pelo fato de provavelmente em anuros, o tamanho

corporal é o principal fator limitante do esforço reprodutivo (Duellman e Trueb, 1994). Estudos já realizados mostraram, por exemplo, que a variação intraespecífica no esforço reprodutivo é geralmente explicada pelas condições ambientais e características das fêmeas (Luddecke, 2002; Reading & Jofré, 2003). Entretanto, esses estudos não consideram os parasitas associados como fator relacionado às variações no esforço reprodutivo.

Contudo, apesar da discussão sobre a interação parasito-hospedeiro e a evolução do modo reprodutivo nos anfíbios, ainda há uma carência de estudos que avaliam qual é a extensão dos efeitos causados pelos parasitas sobre o sucesso reprodutivo dos anfíbios. Este estudo propõe investigar, em três espécies de anuros, se indivíduos parasitados por helmintos podem sofrer alterações em alguns dos aspectos da reprodução.

Hipótese

H0: Os helmintos parasitas não influenciam nos aspectos reprodutivos dos anfíbios anuros.

H1: Os helmintos parasitas influenciam nos aspectos reprodutivos dos anfíbios anuros.

Objetivos

Este estudo teve como objetivo principal avaliar se nas três espécies estudadas a intensidade de infecção afeta nos seguintes aspectos reprodutivos:

- 1) Massa dos ovários, número de ovócitos e média de diâmetro dos ovócitos;
- 2) Massa dos testículos e volume dos testículos;
- 3) Esforço reprodutivo em ambos os sexos.

Material e métodos

1. Área de estudo

Os anfíbios foram coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí (Figura 1). Área localizada na província do Planalto Ocidental, Bacia do Paraná nas áreas da sub bacia Bauru, a RPPN, de relevo pouco ondulado com porções de rochas areníticas, predominando colinas amplas e baixas com topos aplanados (Sallun & Suguio, 2006). A RPPN, abrange os municípios de Castilho - SP, São João do Pau d'Alho - SP e Paulicéia – SP, banhada pelo rio Aguapeí (afluente do rio Paraná). Situa-se no Oeste do Estado de São Paulo, inserida em limites de Mata Atlântica em área de Conservação Ambiental com representatividade ecológica e regional conhecida como “pantaninho paulista” (Figura 2). A vegetação desta localidade é composta por fragmentos de Floresta Estacional e possui significantes formações de Cerrado (Figura 3). É uma zona de transição climática, caracterizado por massas de ar tropicais (Boin, 2000). Neste local ocorrem grandes quantidades de precipitações devido à influência da massa Polar Atlântica e pelas massas tropicais setentrionais oriundas da Amazônia, provocando as instabilidades climáticas que dão origem às chuvas intensas de

curta duração. O clima tropical é caracterizado pelo verão chuvoso e inverno seco (Comitês das Bacias Hidrográficas dos Rios Aguapeí e Peixe – CBH-AP, 2000).

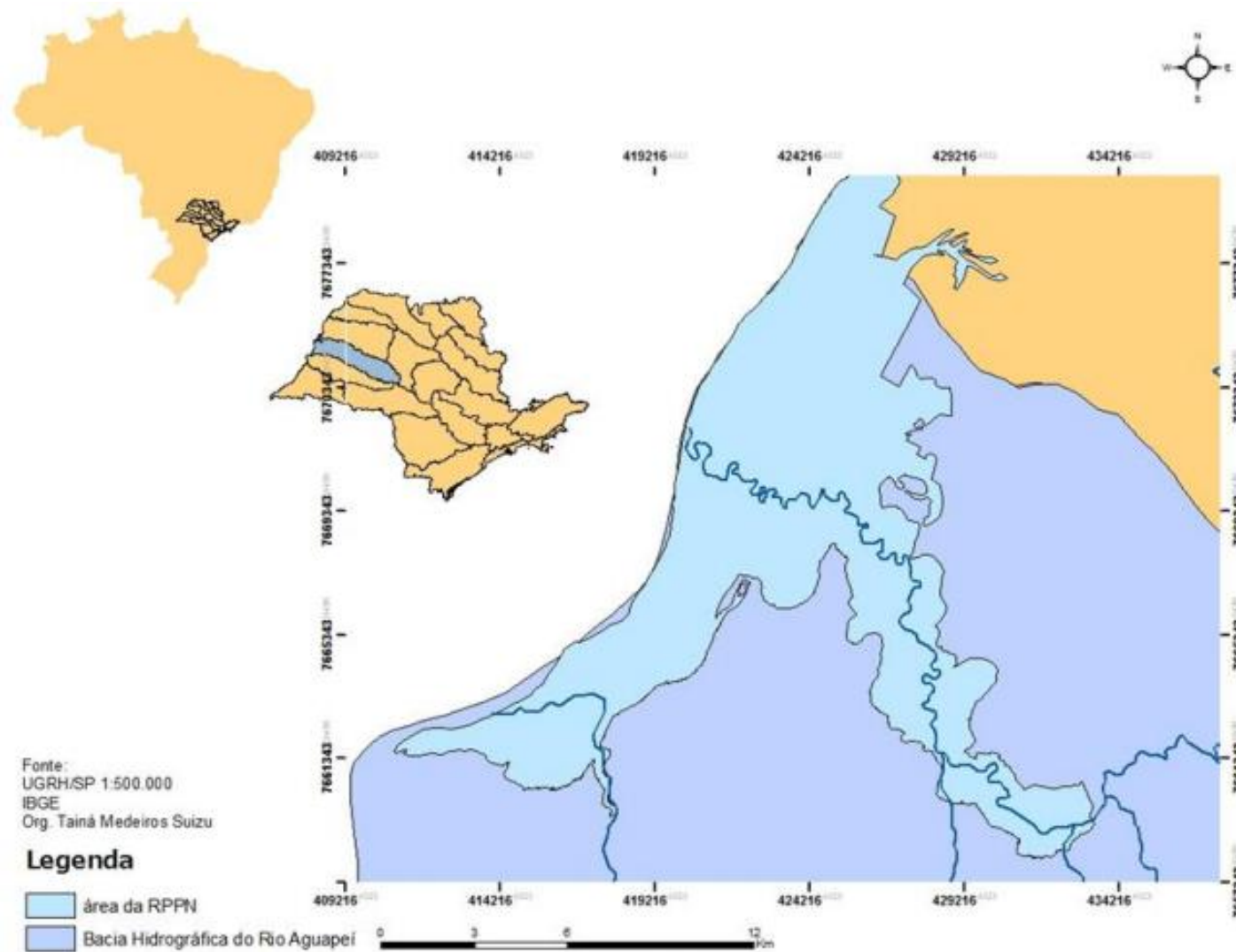


Figura 1 – Mapa com a localização da RPPN Foz do rio Aguapeí. Fonte: Tainá Medeiros Suizu, In: Dias & Benini, 2014.



Figura 2 – Vista de uma das lagoas da RPPN Foz do rio Aguapeí. Créditos: Reinaldo José da Silva.



Figura 3 – Vista da vegetação - fragmentos de Floresta Estacional e formações de Cerrado da RPPN Foz do rio Aguapeí. Créditos: Reinaldo José da Silva.

2. Espécies de anuros

Três espécies de anuros foram selecionadas por sua facilidade de captura e elevada abundância em coletas e pesquisas preliminares. Duas espécies pertencem à família Leptodactylidae, *Leptodactylus chaquensis* (Figura 4) e *Leptodactylus podicipinus* (Figura 5), e a terceira da família Hylidae, *Hypsiboas raniceps* (Figura 6).



Figura 4 – *Leptodactylus chaquensis*. Créditos: Drausio Honório Morais.



Figura 5 – *Leptodactylus podicipinus*. Créditos: Drausio Honório Morais.



Figura 6 – *Hypsiboas raniceps*. Créditos: Drausio Honório Morais.

Segundo Uetanabaro *et al.* (2008), *L. chaquensis* pode ser encontrado desde o Centro-Oeste do Brasil até o Norte da Argentina, Leste da Bolívia, Paraguai e Norte do Uruguai. São terrestres e principalmente noturnos. Os machos vocalizam principalmente nas margens de corpos d'água permanentes ou temporários. As fêmeas depositam, em média, 4.900 ovos em ninhos de espumas nas margens de lagoas temporárias, poças de chuva ou áreas inundadas (Uetanabaro *et al.*, 2008).

Para *Leptodactylus podicipinus*, Uetanabaro *et al.* (2008), citam que a espécie apresenta ampla distribuição no Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Bolívia. São terrestres e noturnos, encontrados nas bordas das lagoas temporárias e permanentes. Os machos constroem pequenas depressões contendo água de onde normalmente vocalizam e as fêmeas depositam em média 2.000 ovos em ninhos de espumas depositados nessas depressões e cuidam dos ovos e dos girinos (Uetanabaro *et al.*, 2008).

O hilídeo *Hypsiboas raniceps* apresenta ampla distribuição pela América do Sul, são arborícolas e noturnos. Os machos são observados vocalizando nas margens de poças semipermanentes e permanentes ou em áreas alagadas, sobre arbustos. As fêmeas depositam em média 2.000 ovos envoltos em massa gelatinosa na água (Uetanabaro *et al.*, 2008).

3. Coleta de anuros

As amostragens foram realizadas em dois períodos chuvosos, 24/01 a 03/02 de 2013 e 05/01 a 15/01 de 2014. Utilizamos como métodos de captura a Procura Visual Limitada por Tempo (PVLT) (Figura 7), Armadilhas de Interceptação e Queda (AIQ) (Figura 8) e Encontros Ocasionais (EO).



Figura 7 – Procura Visual Limitada por Tempo (PVLT). Créditos: Juliana Lehn Linardi.



Figura 8 – Armadilhas de Intercepção e Queda (AIQ). Créditos: Hellen Brunhani.

Os animais capturados foram acondicionados separadamente em sacos plásticos e identificados até o nível de epíteto específico. Posteriormente, foram eutanasiados com solução de tiopental sódico, metodologia autorizada pela Comissão de Ética de uso de Animais (348 CEUA) e SISBIO (SISBIO 31716-2).

Foram medidos o comprimento-rostro-cloacal (CRC), utilizando-se um paquímetro (precisão de 0,01 mm) e a massa corporal, obtida com o uso de balanças Pesola®, para cada indivíduo coletado.

Os anuros coletados foram fixados em solução de formol 10% e, posteriormente, preservados em álcool 70% para análise taxonômica, após necropsias. Todos os indivíduos coletados foram destinados às coleções herpetológicas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) e Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas “Adão José Cardoso”. O número do tombo dos espécimes utilizados neste estudo estão citados no Anexo I.

4. Coleta das gônadas

As gônadas (consideradas em estágio maduro) dos machos e fêmeas foram retiradas durante as necropsias, guardadas em frascos individuais e fixadas em formalina 10%. Os procedimentos que serão mencionados a seguir, foram realizados no Laboratório de Ecologia do Parasitismo, do Departamento de Biologia e Zootecnia, da Unesp – Ilha Solteira. A formalina dos frascos foi substituída por álcool 70%. As massas das gônadas de cada indivíduo foram registradas com o auxílio de balança precisão (0,001g). Antes de cada pesagem de gônadas, o excesso de líquido foi retirado com auxílio de papéis absorventes.

Fizeram parte da amostragem apenas indivíduos considerados adultos. Nos machos foram considerados caracteres sexuais secundários como a presença de sacos vocais desenvolvidos e/ou calos nupciais (Liu, 1935; Duellmann & Trueb, 1986; Ko *et al.*, 1998; Mesquita *et al.*, 2004). Nas fêmeas, a presença de ovócitos pós vitelogênicos que determinou o estágio maduro (Valdéz-Toledo e Pisanó, 1980; Hermosilla *et al.*, 1986; Basso, 1988; Perotti, 1997; Mesquita *et al.*, 2004).

O número total de ovócitos maduros foi contado, mediu-se o diâmetro dos 10 maiores ovócitos de cada fêmea analisada (diâmetro médio de ovócitos, de acordo com Prado *et al.*, 2000; Prado & Haddad, 2005). Para medir os diâmetros dos ovócitos maduros, foram utilizadas fotomicrografias obtidas em sistema computadorizado para análise de imagens o LAS (Leica Application Suite). O número de ovócitos maduros foi feito por contagem manual com auxílio de um contador.

O esforço reprodutivo foi obtido através da razão entre massa das gônadas e massa do corpo. Machos e fêmeas tiveram a massa das gônadas esquerda e direita somadas a fim de se obter a massa total das gônadas (Prado *et al.*, 2000; Prado e Haddad, 2005).

5. Coleta dos helmintos

Cada espécime de anuro foi necropsiado e os helmintos parasitas foram pesquisados em todos os órgãos internos (esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, vesícula biliar, rim, coração e pulmões) e após a retirada dos órgãos, a cavidade celomática e a musculatura dos membros posteriores também foram examinados. Os helmintos encontrados foram fixados em solução de álcool 70%, seguindo a metodologia adequada a cada táxon (Amato *et al.*, 1991). Para identificação, os nematoides foram clarificados com lactofenol de Aman (Andrade 2000) e os trematódeos e acantocéfalos foram corados pela técnica do carmim clorídrico (Amato *et al.*, 1991). Os helmintos foram identificados, por espécie, através de dados morfométricos e fotomicrografias obtidas em sistema computadorizado para análise de imagens QWin Lite 3.1, adaptado em microscópio DMLB (Leica).

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, Unesp-Botucatu. Os helmintos foram depositados na Coleção Helminológica do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências (CHIBB) UNESP, campus de Botucatu.

6. Análise de dados

A estatística descritiva realizada ao longo deste trabalho incluiu a média \pm DP (desvio padrão) ou EP (erro padrão) e amplitude (min. – máx.). Para dados paramétricos de distribuição normal, o desvio padrão foi usado e o erro padrão foi utilizado para dados não paramétricos que não tem distribuição normal. Para as análises estatísticas foram utilizados os programas BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007) e Statistica 7.1. (Statsoft, 2005). Antes de realizar qualquer análise, os dados foram avaliados quanto a sua normalidade (Shapiro – Wilk). Para as variáveis que apresentaram normalidade, foi utilizado o Teste T de Student (nível de significância α foi de 0,05) e para os dados nos quais não apresentaram normalidade o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Teste U; nível de significância α foi de 0,05) foi utilizado.

Foi utilizado a Regressão Linear Simples (Zar, 1999) para avaliar se infecção parasitária influenciou nos parâmetros reprodutivos como: massa dos ovários, número de ovócito maduros e média do diâmetro dos ovócitos; massa dos testículos e volume do maior testículo; e esforço reprodutivo de ambos os sexos. Antes das análises, as variáveis foram logaritimizadas para cumprir premissas estatísticas e permitir interpretações biológicas e comparações entre as espécies analisadas (Zar, 1999).

Resultados

1. Anuros

Foram capturados 115 anuros entre janeiro de 2013 e janeiro de 2014, deste total, 67 eram machos adultos e 48 fêmeas adultas. Separando este número amostral por espécie, obtivemos a seguinte amostragem: *L. podicipinus*, com 35 fêmeas e 30 machos; *L. chaquensis*, com 10 fêmeas e 10 machos; e *H. raniceps*, com três fêmeas e 27 machos.

Fêmeas de *L. chaquensis* apresentaram tamanho médio e peso corporal médio similares, sem significância estatística ($U = 47$; $P = 0,82$ e $t = -0,66$; $P = 0,52$, respectivamente). Na Tabela 1 foram apresentados os valores da média, o desvio padrão e a amplitude de tamanhos e peso corporal.

As fêmeas de *L. podicipinus*, apresentaram tamanho médio e peso corporal médio significativamente maior que machos ($t = 6,87$; $P < 0,0001$ e $t = 9,47$; $P < 0,0001$, respectivamente). Na Tabela 2 foram apresentados os valores da média, o desvio padrão e a amplitude de tamanhos e peso corporal.

As fêmeas de *H. raniceps* também apresentaram tamanho médio e peso corporal médio similares ($U = 16$; $P = 0,09$ e $t = 3,86$; $P = 0,33$, respectivamente). Na Tabela 3 foram apresentados os valores da média, o desvio padrão e a amplitude de tamanhos e peso corporal.

2. Aspectos reprodutivos

Nas três espécies, todas as fêmeas analisadas, apresentaram apenas ovócitos pós vitelogênicos (maduros) durante a contagem manual. O tamanho da amostra, a média, o desvio padrão e a amplitude da massa dos ovários, da média do número total de ovócitos maduros, da média do diâmetro dos ovócitos maduros, da massa dos testículos, do volume dos testículos e do esforço reprodutivo estão representados nas Tabelas 1 (para *L. chaquensis*), 2 (para *L. podicipinus*) e 3 (para *H. raniceps*).

Tabela 1 - Tamanho da amostra, média, desvio padrão (DP) e amplitude de tamanho, do peso corporal, da massa dos ovários em gramas, da média do número total de ovócitos maduros, da média do diâmetro dos ovócitos maduros, da massa dos testículos, do volume dos testículos e do esforço reprodutivo em *Leptodactylus chaquensis*.

	Fêmeas	Machos
nº	10	10
Tamanho (mm)	75,7 ± 1,5 (38,0 – 89,0)	77,7 ± 15,4 (53,0 – 102,0)
Peso corporal (g)	49,4 ± 26,0 (10,4 – 92,0)	43,0 ± 15,7 (5,5 – 62,0)
Massa dos ovários (g)	8,6 ± 4,8 (0,3 – 14,4)	X
Média do nº total de ovócitos maduros	5.705 ± 2.219 (1.522 – 8.485)	X
Média do Diâmetro dos ovócitos (mm)	1,3 ± 0,3 (0,5 – 1,5)	X
Massa dos testículos (g)	X	1,9 ± 1,2 (0,2 – 3,8)
Volume do testículo (mm³)	X	1.516,2 ± 1.006,8 (2,8 – 3.182,3)
Esforço reprodutivo	23,6 ± 11,8 (6,2 – 39,9)	3,8 ± 2,0 (1,8 – 8,3)

Tabela 2 - Tamanho da amostra, média, desvio padrão (DP) e amplitude de tamanho, do peso corporal, da massa dos ovários em gramas, da média do número total de ovócitos maduros, da média do diâmetro dos ovócitos maduros, da massa dos testículos, do volume dos testículos e do esforço reprodutivo em *Leptodactylus podicipinus*.

	Fêmeas	Machos
nº	35	30
Tamanho (mm)	40,3 ± 4,2 (33,0 – 49,0)	33,5 ± 3,7 (26,0 – 42,0)
Peso corporal (g)	6,6 ± 1,5 (4,0 – 1,0)	3,8 ± 1,0 (1,6 – 6,4)
Massa dos ovários (g)	1,1 ± 0,5 (0,1 – 2,1)	X
Média do nº total de ovócitos	2.358 ± 543 (773 – 3.324)	X
Média do Diâmetro dos ovócitos (mm)	0,8 ± 0,2 (0,5 – 1,0)	X
Massa dos testículos (g)	X	0,04 ± 0,02 (0,01 – 0,08)
Volume do testículo (mm³)	X	21,5 ± 10,1 (6,4 – 52,7)
Esforço reprodutivo	19,0 ± 8,3 (2,1 - 33,7)	1,0 ± 0,3 (0,4 - 1,5)

Tabela 3 - Tamanho da amostra, média, desvio padrão (DP) e amplitude de tamanho, do peso corporal, da massa dos ovários em gramas, média do número total de ovócitos maduros, média do diâmetro dos ovócitos maduros, da massa dos testículos, do volume dos testículos e do esforço reprodutivo em *Hypsiboas raniceps*.

	Fêmeas	Machos
nº	3	27
Tamanho (mm)	(65,0 – 84,3)	67,0 ± 7,2 (61,0 – 99,0)
Peso corporal (g)	(12,0 – 42,0)	14,4 ± 2,7 (9,0 – 18,5)
Massa dos ovários (g)	(0,5 – 9,8)	X
Média do nº total de ovócitos	(1234 – 5409)	X
Média do Diâmetro dos ovócitos (mm)	(0,8 – 1,4)	X
Massa dos testículos (g)	X	0,01 ± 0,005 (0,01 – 0,02)
Volume do testículo (mm³)	X	7,9 ± 2,8 (5,0 – 15,2)
Esforço reprodutivo	(4,3 – 33,2)	0,1 ± 0,04 (0,05 – 0,2)

3. Helmintofauna encontrada

A prevalência geral em *L. chaquensis* foi de 90% (18/20), em *L. podicipinus* foi de 90,8% (59/65) e *H. raniceps* foi de 76,7% (23/30).

Foram coletados no total 2.931 helmintos nas três espécies de anuros. Desse total, 1.500 helmintos foram coletados em *L. chaquensis* (Tabela 4), 734 helmintos em *L. podicipinus* (Tabela 5) e 697 helmintos em *H. raniceps* (Tabela 6).

A intensidade média de infecção em *L. chaquensis* foi de $83,33 \pm 38,42$ (erro padrão), com amplitude de 1 a 514 helmintos. Em *L. podicipinus*, a intensidade média de infecção foi de $12,44 \pm 1,75$ (erro padrão), com amplitude de 1 a 65 helmintos. Para *H. raniceps*, a intensidade média de infecção foi de $30,3 \pm 15,02$ (erro padrão), com amplitude de 1 a 342 helmintos.

Em todas as três espécies foram observados 17 táxons de helmintos: 7 de nematoides, 9 de trematódeos digenéticos e um de acantocéfalos (Tabela 7).

Tabela 4 – Comunidade componente de helmintos associado a *Leptodactylus chaquensis* coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí. Intensidade Média de Infecção (IMI \pm erro-padrão), amplitude (mín-máx).

Taxon	N	IMI \pm EP (mín - máx)
Nematoda		
<i>Aplectana membranosa</i>	1.416	177 \pm 75,74 (10 - 514)
<i>Brevimulticaecum</i> sp.	19	2,71 \pm 0,92 (1 - 8)
Cosmocercidae	49	7 \pm 2,94 (2 - 24)
<i>Rhabdias</i> sp.	1	---
Trematoda		
<i>Catadiscus marinholutzi</i>	1	---
<i>Catadiscus propinquus</i>	1	---
<i>Catadiscus</i> sp.	2	---
<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.	2	---
<i>Rauschiella palmipedis</i>	8	1,33 \pm 0,21 (1 - 2)
Acanthocephala		
Centrorhynchidae	1	---
TOTAL	1.500	83,33 \pm 38,42 (1 - 514)

Tabela 5 – Comunidade componente associada a *Leptodactylus podicipinus* (n = 65). Espécies de helmintos, número de helmintos encontrados e IMI (intensidade média de infecção), com EP (erro-padrão) e amplitude (mín-máx).

Espécies de helmintos	nº de Helmintos encontrados	IMI ± EP (mín - máx)
Nematoda		
<i>Aplectana membranosa</i>	293	29,3 ± 6,05 (1 - 59)
<i>Brevimulticaecum</i> sp.	4	2,00 ± 1,00 (1 - 3)
<i>Cosmocerca podicipinus</i>	134	5,58 ± 0,57 (1 - 13)
Cosmocercidae	169	5,45 ± 0,65 (1 -16)
<i>Rhabdias</i> sp.	11	1,57 ± 0,2 (1 - 2)
Trematoda		
<i>Catadiscus marinholtzi</i>	15	2,14 ± 0,34 (1 - 4)
<i>Catadiscus propinquus</i>	53	5,3 ± 1,2 (1 - 10)
<i>Catadiscus</i> sp.	34	2,62 ± 0,53 (1 - 8)
<i>Heterodiplostomum</i> sp.	10	2,5 ± 0,5 (2 - 4)
<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.	5	5,0 ± 0,0
<i>Rauschiella</i> sp.	1	---
Acanthocephala		
Centrorhynchidae	5	1,67 ± 0,33 (1 - 2)
TOTAL	734	12,44 ± 1,75 (1 - 65)

Tabela 6 – Comunidade componente associada a *Hypsiboas raniceps* (n = 30). Espécies de helmintos, número de helmintos encontrados e IMI (intensidade média de infecção), com EP (erro-padrão) e amplitude (mín-máx).

Espécies de helmintos	nº de Helmintos encontrados	IMI ± EP (mín - máx)
Nematoda		
<i>Aplectana membranosa</i>	1	---
<i>Brevimulticaecum</i> sp.	16	3,20 ± 1,11 (1 - 7)
Cosmocercidae	1	---
<i>Physaloptera</i> sp.	7	7,00 ± 0,0
<i>Ochoterenela</i> sp.	6	2,00 ± 1,00 (1 - 4)
<i>Rhabdias</i> sp.	2	---
Trematoda		
<i>Catadiscus propinquus</i>	3	3,00 ± 0,0
<i>Catadiscus</i> sp.	1	---
<i>Choledocystus vitellinophilum</i>	5	1,25 ± 0,25 (1 - 2)
<i>Gorgoderina diaster</i>	37	4,63 ± 1,00 (1 - 9)
<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.	616	68,44 ± 35,68 (1 - 342)
Acanthocephala		
Centrorhynchidae	2	---
TOTAL	697	30,3 ± 15,02 (1 - 342)

Tabela 7 – Espécies de helmintos encontrados por Espécie de hospedeiro.

Espécies de helmintos	<i>Leptodactylus chaquensis</i> (n = 20)	<i>Leptodactylus podicipinus</i> (n = 65)	<i>Hypsiboas raniceps</i> (n = 30)
Acanthocephala			
Centrorhynchidae	X	X	X
Nematoda			
<i>Aplectana membranosa</i>	X	X	X
<i>Brevimulticaecum</i> sp.	X	X	X
<i>Cosmocerca podicipinus</i>	X	X	
Cosmocercidae	X	X	X
<i>Ochoterenela</i> sp.			X
<i>Physaloptera</i> sp. (larva)		X	X
<i>Rhabdias</i> sp.	X	X	X
Trematoda			
<i>Catadiscus marinholutzi</i>	X	X	
<i>Catadiscus propinquus</i>	X	X	X
<i>Catadiscus</i> sp.	X	X	X
<i>Choledocystus vitellinophilum</i>			X
<i>Gorgoderina diaster</i>			X
<i>Heterodiplostomum</i> sp.		X	
<i>Lophosicyadiplostomum</i> sp.	X	X	X
<i>Rauschiella palmipedis</i>	X		
<i>Rauschiella</i> sp.		X	

4. Relação entre intensidade de infecção e aspectos reprodutivos

Foram realizadas análises de regressão para fêmeas e machos de *L. chaquensis* e *L. podicipinus*. Para a espécie de *H. raniceps*, apenas os dados amostrais dos machos foram utilizados. Este fato aconteceu devido a amostragem das fêmeas, em *H. raniceps* ser insuficiente ($n = 3$).

Não houve relação significativa entre a intensidade de infecção e a massa das gônadas dos anuros hospedeiros (Figura 9, 10, 11, 12 e 13).

Não houve relação significativa entre a intensidade de infecção e as seguintes variáveis: número de ovócitos maduros (Figura 14 e 15) e diâmetro médio dos ovócitos (Figura 16 e 17).

Não houve relação significativa entre a intensidade de infecção e o volume do testículo em nenhuma das três espécies de hospedeiros (Figura 18, 19 e 20).

Não houve relação significativa entre a intensidade de infecção e o esforço reprodutivo em nenhuma das três espécies de anuros hospedeiros (Figura 21, 22, 23, 24 e 25).

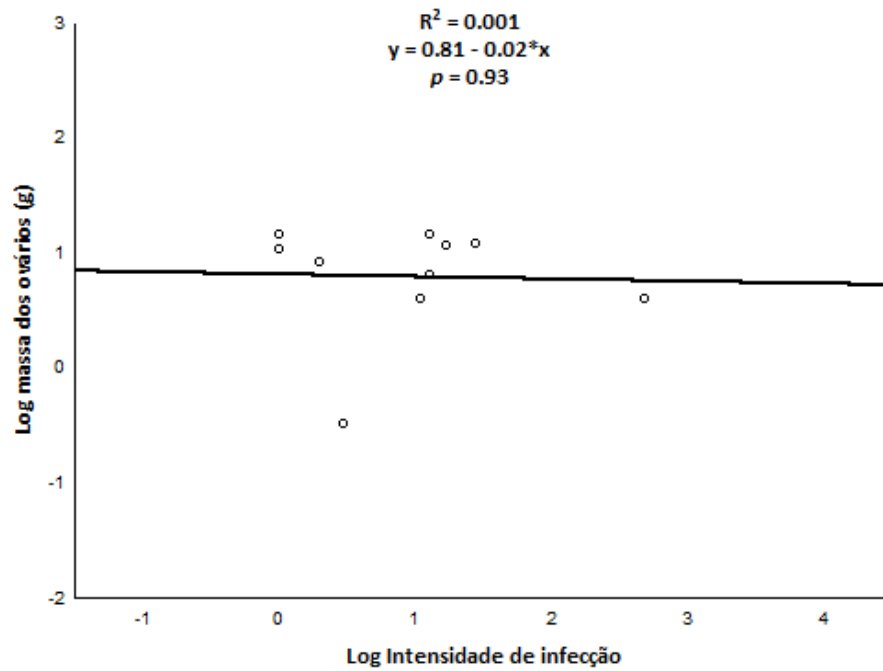


Figura 9 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e a massa dos ovários de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,001$ e $p > 0,05$).

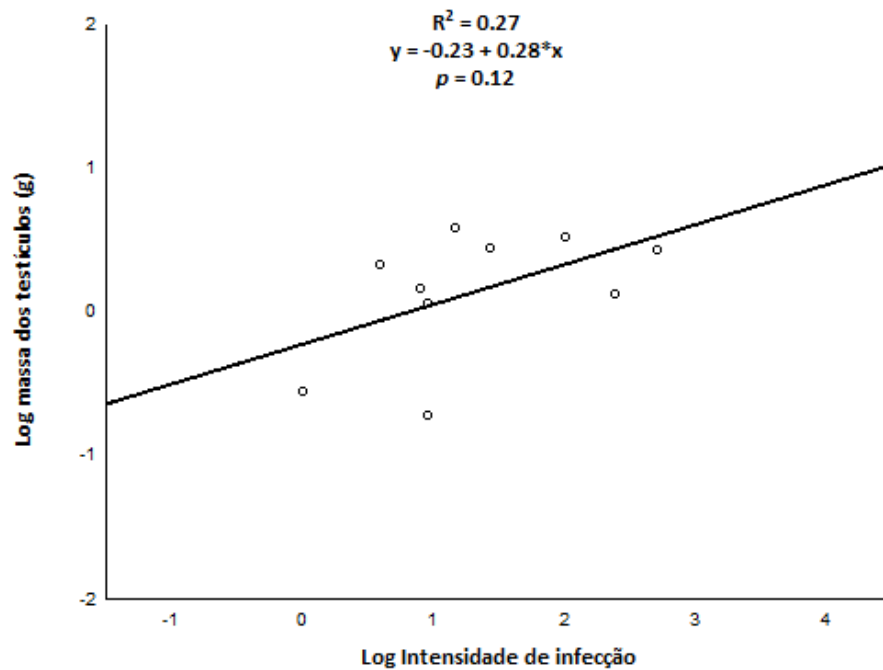


Figura 10 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e a massa dos testículos de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,27$ e $p > 0,05$).

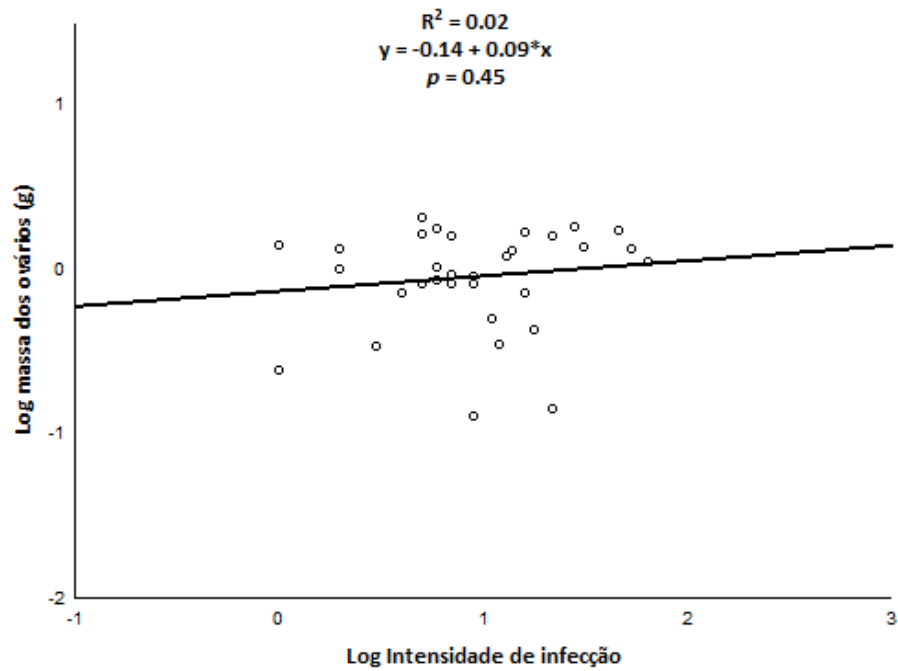


Figura 11 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e massa dos ovários de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,02$ e $p > 0,05$).

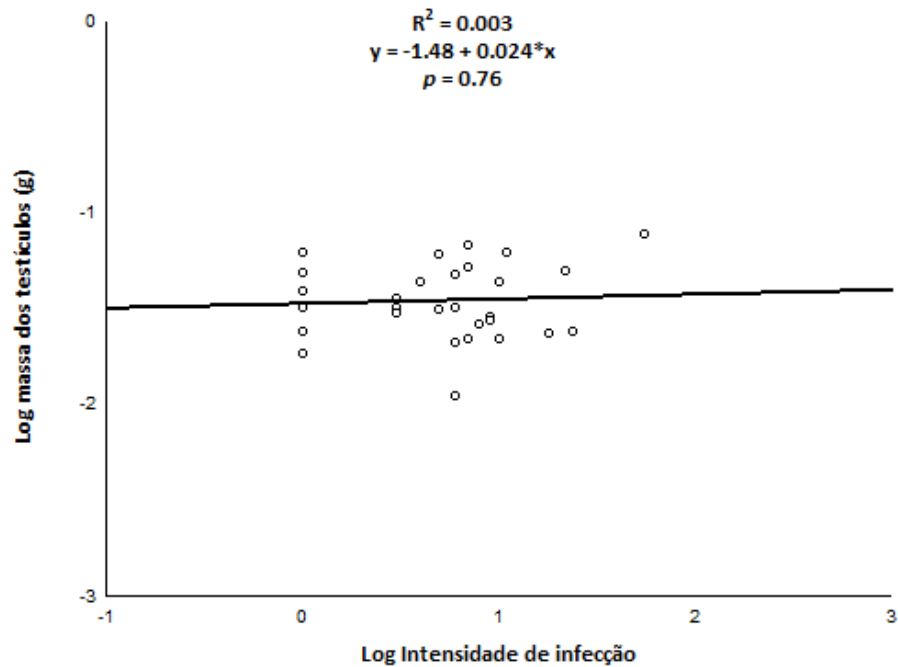


Figura 12 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e a massa dos testículos de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,003$ e $p > 0,05$).

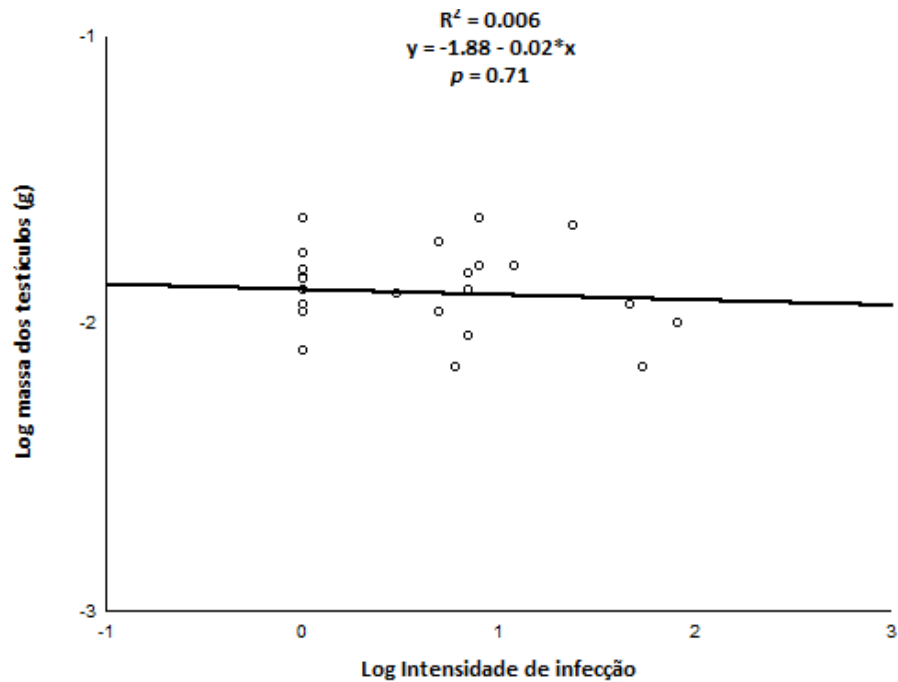


Figura 13 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e a massa dos testículos de *Hypsiboas raniceps*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,006$ e $p > 0,05$).

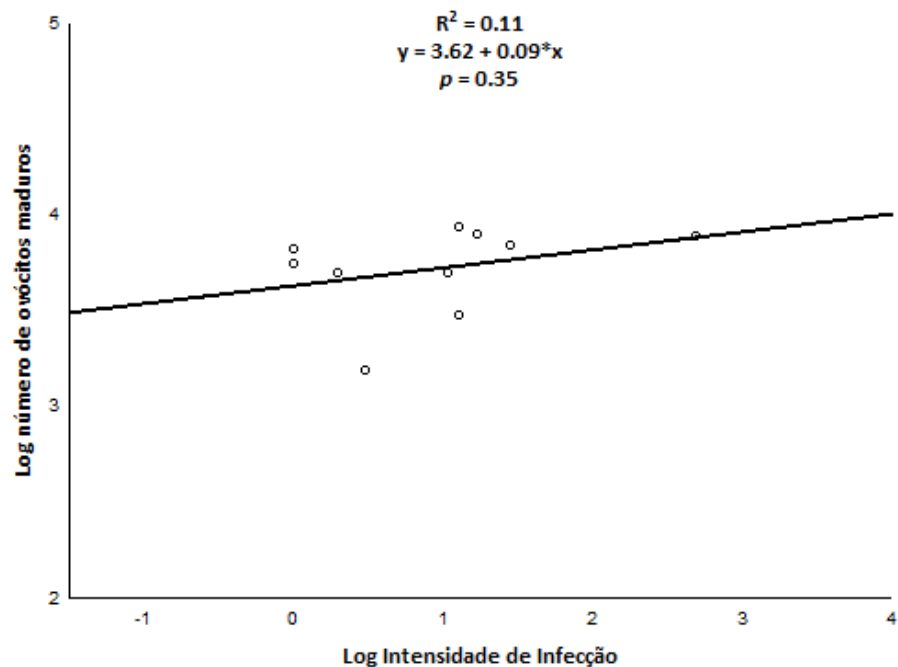


Figura 14 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e o número de ovócitos maduros das fêmeas de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,11$ e $p > 0,05$).

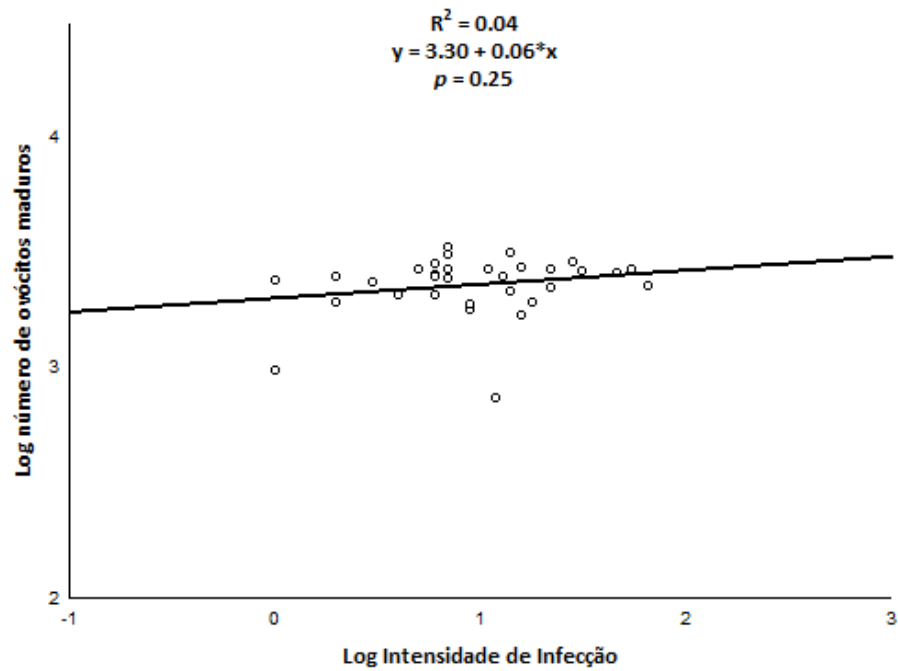


Figura 15 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e o número de ovócitos maduros das fêmeas de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,04$ e $p > 0,05$).

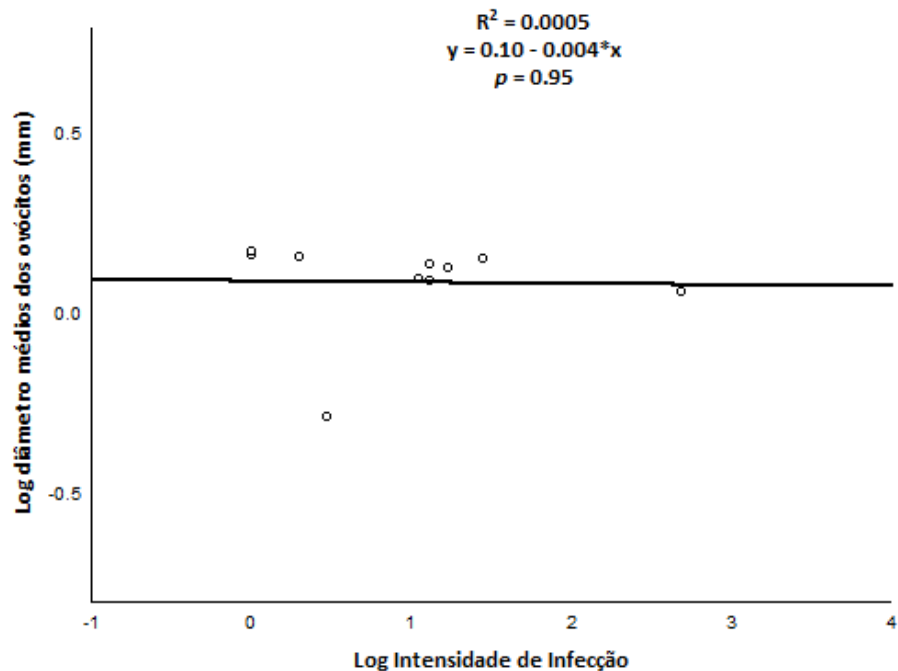


Figura 16 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e o diâmetro médio dos ovócitos maduros das fêmeas de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,0005$ e $p > 0,05$).

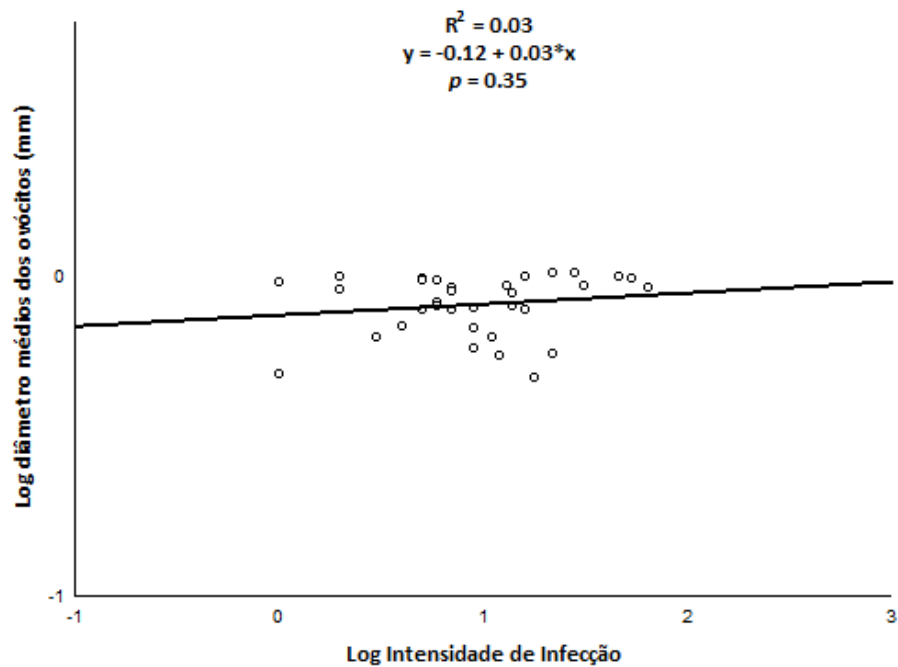


Figura 17 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e o diâmetro médio dos ovócitos maduros das fêmeas de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,03$ e $p > 0,05$).

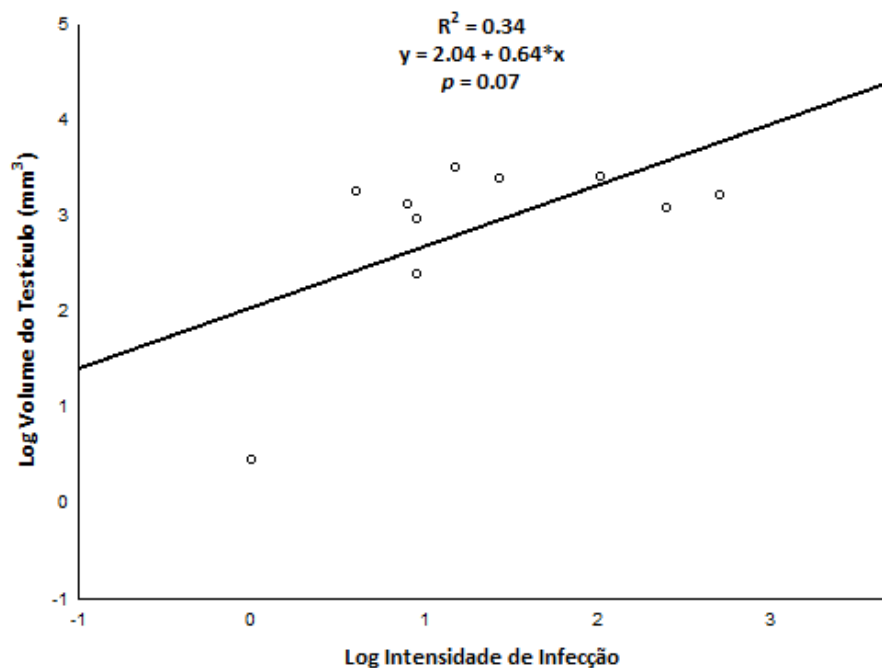


Figura 18 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e volume dos testículos de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,34$ e $p > 0,05$).

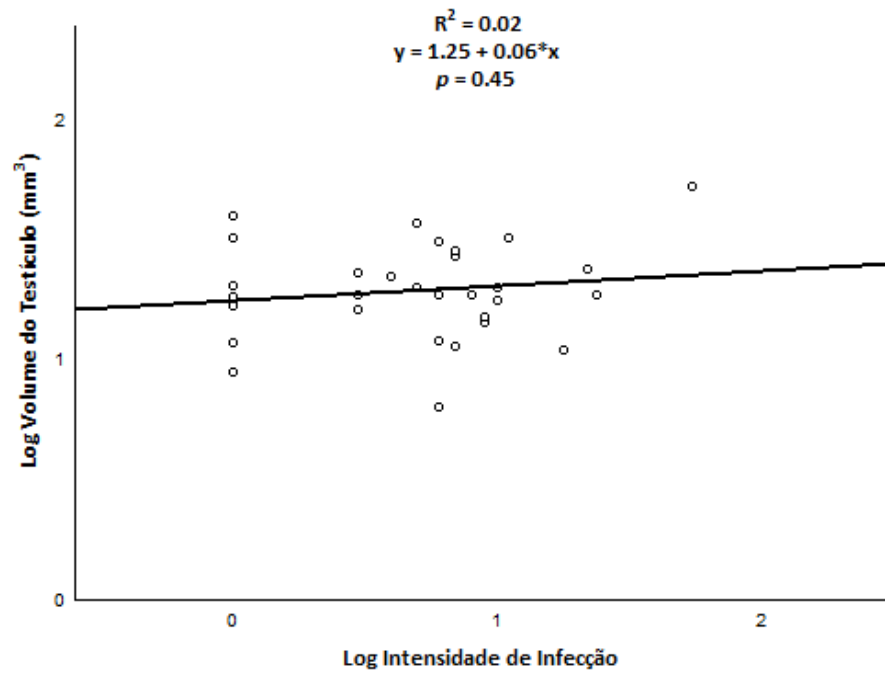


Figura 19 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e volume dos testículos de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,02$ e $p > 0,05$).

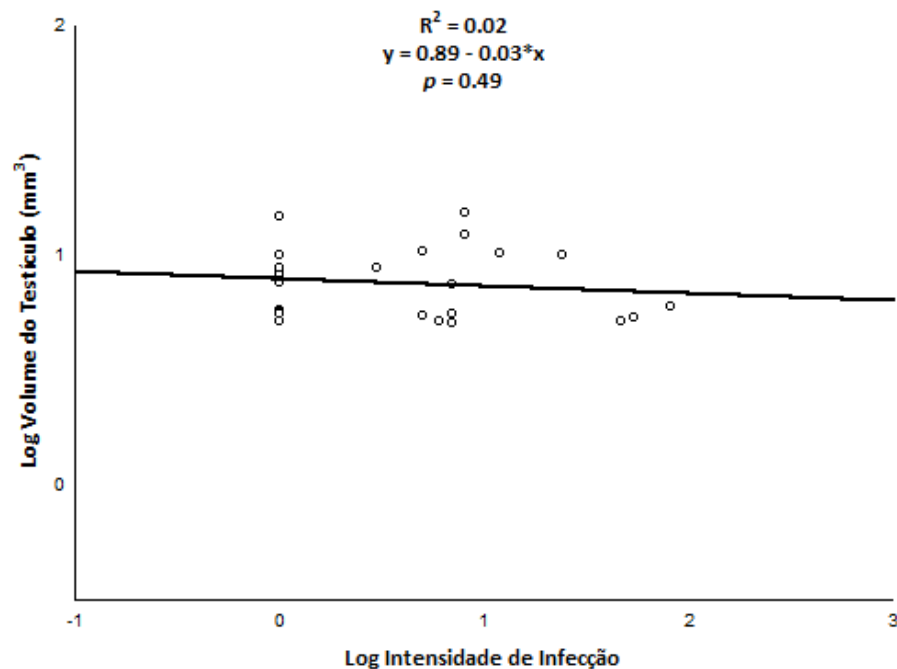


Figura 20 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e volume dos testículos de *Hypsiboas raniceps*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,02$ e $p > 0,05$).

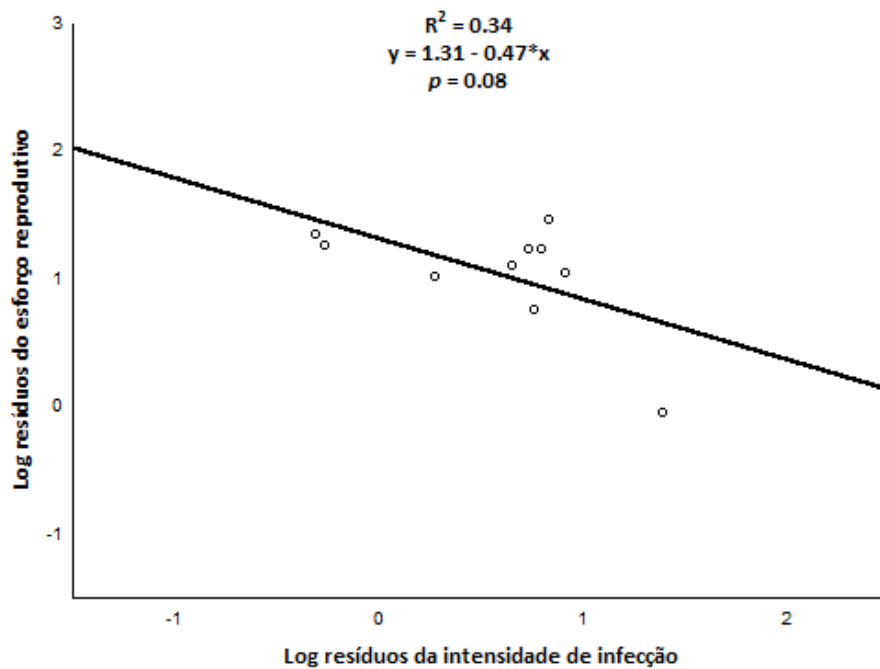


Figura 21 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e esforço reprodutivo das fêmeas de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,34$ e $p > 0,05$).

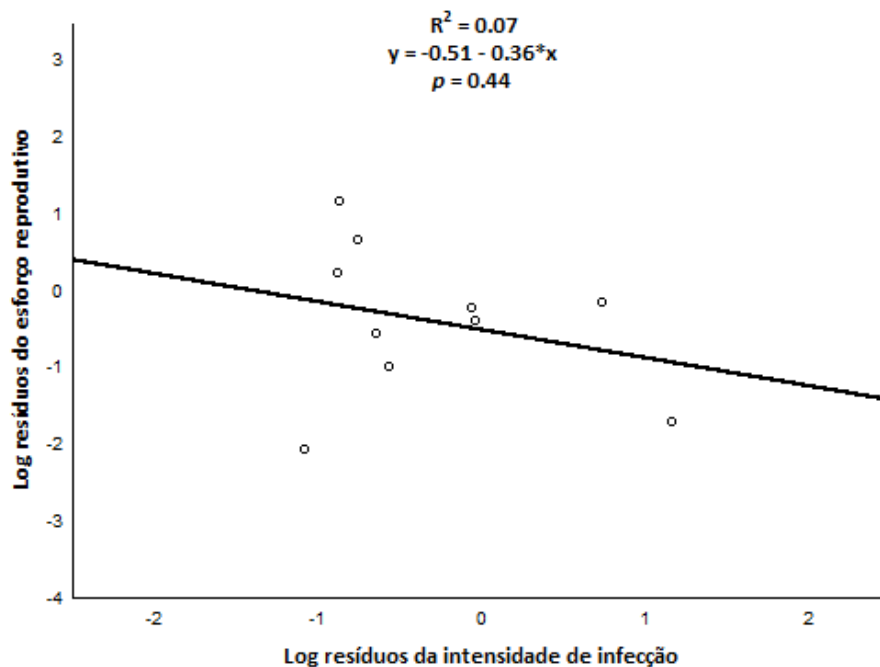


Figura 22 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e esforço reprodutivo dos machos de *Leptodactylus chaquensis*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,07$ e $p > 0,05$).

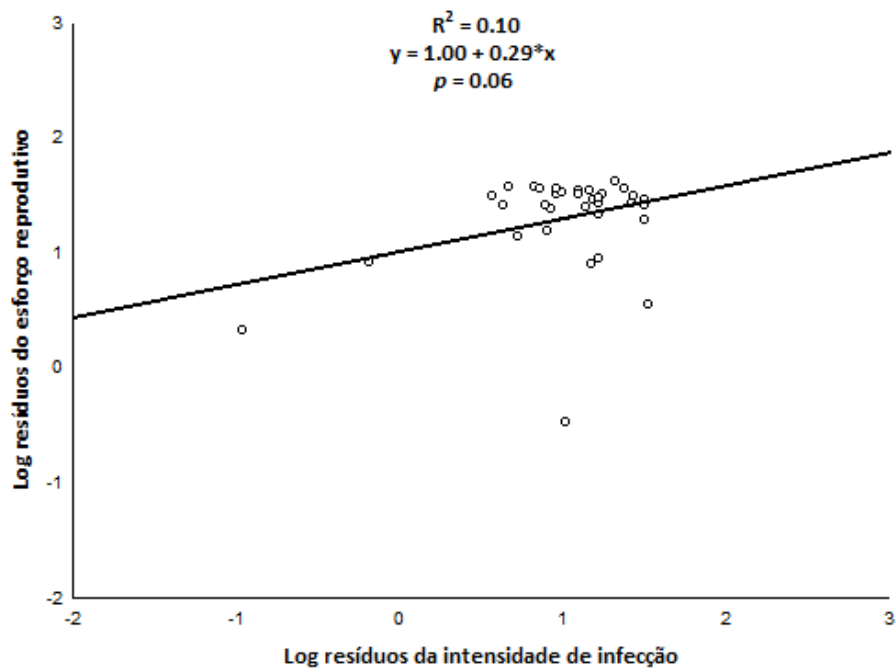


Figura 23 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e esforço reprodutivo das fêmeas de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,10$ e $p > 0,05$).

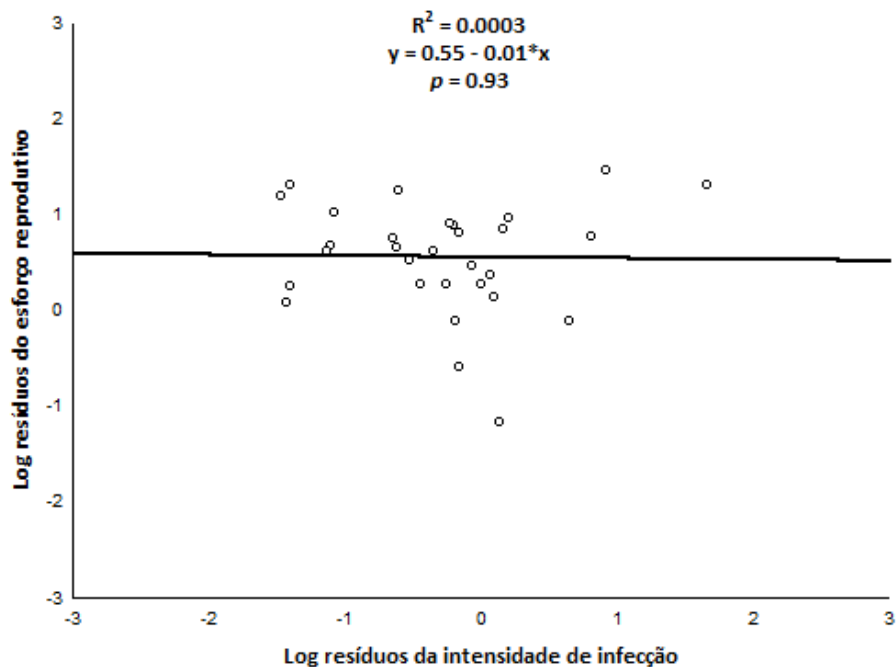


Figura 24 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e esforço reprodutivo dos machos de *Leptodactylus podicipinus*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,0003$ e $p > 0,05$).

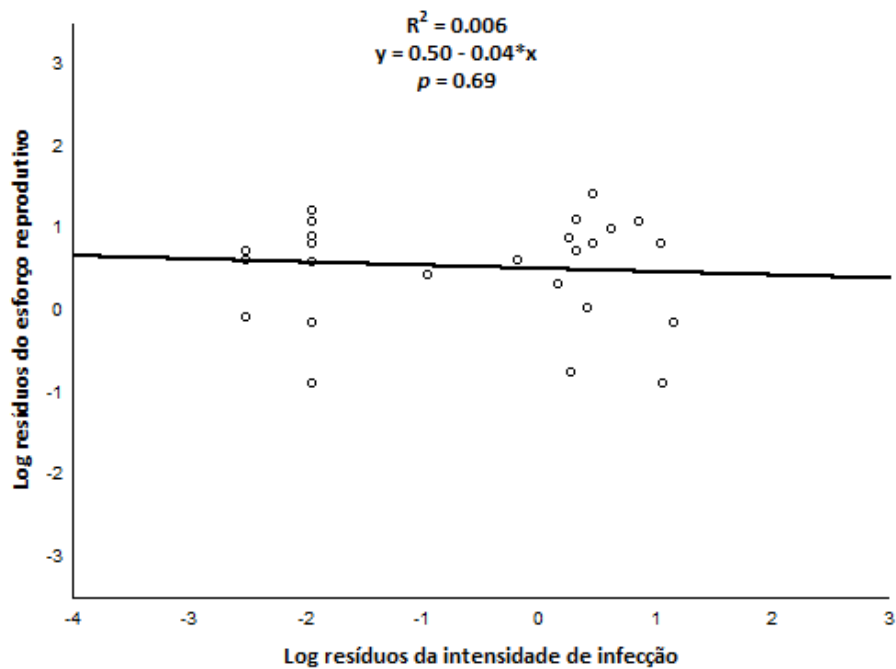


Figura 25 – Regressão linear entre a intensidade de infecção e esforço reprodutivo dos machos de *Hypsiboas. raniceps*, coletados na RPPN Foz do Rio Aguapeí, Castilho, SP ($R^2 = 0,006$ e $p > 0,05$).

Discussão

1. Anuros

Em relação aos resultados obtidos sobre o dimorfismo sexual, as fêmeas de *L. chaquensis* não apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto ao tamanho médio e peso corporal em relação aos machos. Porém, as fêmeas de *L. podicipinus* apresentaram tamanho e peso corporal maior os machos. Os resultados corroboraram com os dados de Prado *et al.* (2000). Em *H. raniceps*, não houve diferenças significativas no tamanho e peso corporal entre machos e fêmeas. Trivers (1972) sugere que as fêmeas geralmente atingem tamanhos de corpo maiores do que os machos. Esta diferença ocorre devido a fecundidade

feminina aumentar com o aumento do tamanho do corpo mais rapidamente do que o sucesso reprodutivo masculino (Trivers, 1972). A alta taxa de mortalidade nos machos, por comportamentos reprodutivos, como, canto, defesa e combate, além de gerarem gastos energéticos, os deixam mais suscetíveis, o que poderia colaborar para que estes indivíduos não cheguem ao seu tamanho máximo (Woolbright, 1983). Contudo, o que pode justificar a ocorrência do dimorfismo sexual em uma determinada espécie será a combinação da idade de maturação sexual e a taxa de crescimento após a maturação sexual (Halliday & Tejedo, 1995).

2. Aspectos reprodutivos

A média do número médio de ovócitos maduros, em *L. chaquensis* ($n = 5.705 \pm 2.219$) e *L. podicipinus* ($n = 2.358 \pm 543$), foi maior, quando se compara com os resultados de Prado *et al.* (2000) ($n = 4.936 \pm 1.720$ e $n = 2.034 \pm 493$, respectivamente), Prado e Haddad (2005) ($n = 4.936 \pm 1.720$ e $n = 2.102 \pm 442$, respectivamente) e Schaefer *et al.* (2006) ($n = 4.401.2 \pm 2.231.1$, apenas para *L. chaquensis*). E para *H. raniceps* (1.234 – 5.409), apresentou a amplitude do número de ovócitos maduros maior que o resultado de Prado e Haddad (2005) (1.220 – 3.096). Lemckert & Shine (1993) reportam que o tamanho, as condições ambientais, e a disponibilidade de alimentos podem ser fatores que influenciam na fecundidade das fêmeas.

O esforço reprodutivo, das fêmeas nas três espécies foram maiores que o dos machos, corroborando com os resultados de Crump e Kaplan (1979) que observaram que as fêmeas tendem a gastar mais em energia para reprodução, independentemente do tamanho do corpo e modo de reprodução. Este resultado

também corrobora com Wells (2007) que nos elucida que os machos vão gastar mais energia na defesa, manutenção de território e vocalização enquanto que as fêmeas alocam boa parte dos seus recursos na produção de ovos.

3. Helmintofauna encontrada

As três espécies de hospedeiros estudadas apresentaram espécies de nematoides. Porém, as 2 espécies de leptodactídeos (*L. chaquensis* e *L. podicipinus*) apresentaram intensidade média de infecção maiores destes parasitas. Já em *H. raniceps*, a intensidade média de infecção destes nematoides foi baixa. Estes achados podem ser explicados pela premissa de que anuros com hábito terrestre tendem a apresentar maior número de nematoides (Goldberg & Bursey, 1991; Galicia-Guerrero *et al.*, 2000; Iannacone, 2003; Pinhão *et al.*, 2009; Santos & Amato, 2010; Santos *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2013). Para Aho (1990), a diversidade de hospedeiros, trata-se de uma estratégia de vida generalista da maioria dos anfíbios e répteis que exploram vários tipos de ambientes, o que pode gerar a ocorrência de diversas espécies de hospedeiros. Segundo Anderson (2000), a presença de espécies de ciclo de vida direto (neste caso, os nematoides da família Cosmocercidae), na qual a infecção ocorre principalmente por penetração ativa na pele, sugere que isto ocorre devido o hábito terrestre destes anuros.

4. Relação entre intensidade de infecção e aspectos reprodutivos

Nas análises de regressão, as três espécies selecionadas não apresentaram relação significativa entre a intensidade de infecção e a massa das gônadas dos anuros, número de ovócitos maduros, diâmetro médio dos ovócitos,

volume do testículo e o esforço reprodutivo em nenhuma das três espécies de anuros hospedeiros.

A redução de esforço reprodutivo, segundo Hurd (2001), trata-se de uma estratégia utilizada por muitos hospedeiros parasitados, na qual induz a questionar se a redução no esforço reprodutivo seria uma resposta geral do sistema imunológico para todos os tipos de infecções. Hurd (2001) ainda explica que, mesmo que existam associações nas quais a redução do esforço reprodutivo dos hospedeiros, isto pode ser tratado como um efeito colateral de não adaptação em resposta à infecção. Além do mais, Klein (2005), cita que alterações mediadas pelos parasitas no comportamento de seus hospedeiros, podem depender do ciclo de vida do parasita, a fim de ter sucesso reprodutivo e sobreviver. Parasitas com ciclo de vida direto (como os cosmocercídeos encontrados em nosso estudo) podem influenciar no aumento da agressividade e contato físico dos hospedeiros (Hemachudha *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004). Por outro lado, os parasitas com ciclo de vida indireto (como os trematódeos) podem influenciar no aumento da probabilidade dos hospedeiros serem predados (Kavaliers *et al.*, 2000; Moore, 2002). Klein (2005) afirma que alterações por efeito do parasitismo podem não ser absolutas, podem ser relativas, podem envolver mudanças na alocação de recursos ou não.

Madelaire (2012) sugeriu que a pressão dos endoparasitas, nas espécies de *Rhinella* da caatinga, era constante ao longo do ano, pois as prevalências e intensidades de infecção não se alteraram (entre os períodos de seca e chuva). Deste modo, atentou para a possibilidade, no período de chuvas, destes animais conseguirem manter alto esforço reprodutivo e imunitário pela disponibilidade de recursos alimentares (Madelaire, 2012). Na estação seca, ainda continuam a

obter alimentos, porém diminuem o gasto energético total (diminuem a taxa de movimentação e a expressão de caracteres sexuais secundários) (Madelaire, 2012). Esta redução no gasto energético permite que estes indivíduos possam investir em um sistema imune de alto desempenho (Madelaire, 2012). Esta pode ser uma explicação plausível da não relação entre a intensidade de infecção e as variáveis analisadas neste estudo.

Em contrapartida, tem-se exemplos na literatura como, Goater & Ward (1992) que descobriram que os nematoides de pulmão, *Rhabdias bufonis*, causaram anorexia e taxas de crescimento reduzidas em sapos juvenis de *Bufo bufo*. Goater *et al.* (1993), que testaram efeitos do tamanho do corpo, também em juvenis de *B. bufo*, por infecção de *R. bufonis*, no qual, observaram que houveram fortes evidências para os efeitos indiretos da infecção parasitária. Goater *et al.* (1993), também sugerem que os mecanismos (imunidade do hospedeiro e crescimento e sobrevivência do parasita) que restringem a quantidade e o tamanho dos helmintos dentro dos hospedeiros, podem ser determinantes nos efeitos diretos e indiretos da infecção parasitária.

Sendo assim, as três espécies de anuros estudadas, não apresentaram evidências que possam ter alguma relação entre a intensidade parasitária de helmintos e caracteres morfológicos associados à reprodução como, massa dos ovários e dos testículos, número de ovócitos maduros, diâmetro dos ovócitos, volume do testículo e esforço reprodutivo. Uma possibilidade seria de que estes animais teriam a disponibilidade de recursos energéticos no período do verão, o que torna possível manter o desempenho tanto para a reprodução quanto para o alto desempenho imunitário (French *et al.*, 2007).

Conclusão

Este estudo, analisou possíveis relações entre a intensidade de infecção por helmintos e aspectos morfológicos reprodutivos em três espécies neotropicais de anfíbios anuros. Dos resultados apresentados, não houve relação entre intensidade de infecção e aspectos reprodutivos (massa dos ovários, número de ovócitos das fêmeas e média de diâmetro dos ovócitos, massa dos testículos e volume dos testículos e esforço reprodutivo de ambos os sexos), o que sugere que estas espécies estudadas apresentem respostas imunológicas e/ou adaptações fisiológicas mediante infecção parasitária.

Referências bibliográficas

AHO, J. M. Helminth communities of amphibians and reptiles: comparative approaches to understanding patterns and process. In: Esch GW, Bush AO and Aho JM (ed.) Parasite Communities Patterns and Process. Chapman and Hall, London and New York, pp. 157-190, 1990.

AMATO, J., BOEGER, W. & AMATO, S. Protocolos para laboratório: coleta e processamento de parasitos de pescado, Seropédica, UFRRJ, 1991.

ANDERSON, R. C. Nematode parasites of vertebrates 2nd edition: their development and transmission. London: CAB Publishing. 672p, 2000.

ANDRADE, C.M. (2000). Meios e soluções comumente empregados em laboratórios. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro, p. 353.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L. E SANTOS, A. A. BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Mamirauá. Belém, PA. 364 p., 2007.

BASSO, Néstor Guillermo. Estrategias adaptativas de una comunidad subtropical de anuros. 1988. Tese de Doutorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

BOIN, M. N. Chuvas e erosões no Oeste Paulista: uma análise climatológica aplicada. 2000.

BOLLACHE, L.; GAMBADE, G.; CÉZILLY, F. The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*,

on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 49, n. 4, p. 296-303, 2001.

BOONSTRA, R.; KREBS, C. J.; BEACHAM, T. D. Impact of botfly parasitism on *Microtus townsendii* populations. Canadian Journal of Zoology, v. 58, n. 9, p. 1683-1692, 1980.

CALLARD, G. V.; PETRO, Z.; RYAN, K. J. Conversion of androgen to estrogen and other steroids in the vertebrate brain. American Zoologist, v. 18, n. 3, p. 511-523, 1978.

CHANDRA, P.; GUPTA, N. Habitat preference and seasonal fluctuations in the helminthofauna of amphibian hosts of Rohilkhand Zone, India. Asian Journal of Experimental Science, v. 21, p. 69-78, 2007.

CRUMP, M. L. Reproductive Strategies in a Tropical Anuran Community. 1974.

CRUMP, M. L.; KAPLAN, R. H. Clutch energy partitioning of tropical tree frogs (Hylidae). Copeia, p. 626-635, 1979.

DE JONG-BRINK M, KOENE J.M. Parasitic manipulation: going beyond behaviour. Behav. Process. 68, 229–233, 2005.

DIAS, L. S.; BENINI, S. M. Estudos Ambientais Aplicados em Bacias Hidrográficas.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, Linda. Biology of amphibians. JHU press, 1994.

FORBES, M. R. L. Parasitism and host reproductive effort. *Oikos*, p. 444-450, 1993.

FRENCH, S.S.; DENARDO, D.F.; MOORE, M.C. Trade-Offs between the Reproductive and Immune Systems: Facultative Responses to Resources or Obligate Responses to Reproduction? *Am Natural*. 170(1):79-89, 2007.

FULLER, C. A.; BLAUSTEIN, A. R. Effects of the parasite *Eimeria arizonensis* on survival of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Ecology*, v. 77, n. 7, p. 2196-2202, 1996.

GALICIA-GUERRERO, S.; C.R. BURSEY, S.R. GOLDBERG, G. SALGADO-MALDONADO. Helminths of two sympatric toad species, *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo marmoratus* Wiegmann, 1833 (Anura: Bufonidae) from Chamela, Jalisco, Mexico. *Comparative Parasitology* 67:129-133, 2000.

GOATER, C. P.; SEMLITSCH, R. D.; BERNASCONI, M. V. Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. *Oikos*, p. 129-136, 1993.

GOATER, C. P.; WARD, P. I. Negative effects of *Rhabdias bufonis* (Nematoda) on the growth and survival of toads (*Bufo bufo*). *Oecologia*, v. 89, n. 2, p. 161-165, 1992.

GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R. Helminths of the red-spotted toad, *Bufo punctatus* (Anura: Bufonidae), from southern Arizona. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, v. 58, n. 2, p. 267-269, 1991.

HALLIDAY, T.; TEJEDO, M. Intrasexual selection and alternative mating behaviour. *Amphibian biology*, v. 2, p. 419-468, 1995.

HEMACHUDHA, T; LAOTHAMATAS, J; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *The Lancet Neurology*, v. 1, n. 2, p. 101-109, 2002.

HERMOSILLA, I. B.; COLOMA, L.; WEIGERTT, G.; REYES, E. & GOMEZ, V. Caracterización del ovario de la "Rana Chilena" *Caudiverbera caudiverbera* (Linné, 1758) (Anura Leptodactylidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*, v. 57, p. 37-57, 1986.

HERNÁNDEZ-BELLO, R.; ESCOBEDO, G.; GUZMAN, C.; IBARRA-CORONADO, E. G.; LÓPEZ-GRIEGO, L.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine host–parasite interactions during helminth infections: from the basic knowledge to its possible therapeutic applications. *Parasite immunology*, v. 32, n. 9-10, p. 633-643, 2010.

HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? *Trends in parasitology*, v. 17, n. 8, p. 363-368, 2001.

IANNACONE, J. Helmintos parásitos de *Atelopus bomolochus* Peters, 1973 (Anura: Bufonidae) de Piura, Peru. *Gayana* 67: 9-15, 2003.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D. D.; CHOLERIS, E. Parasites and Behaviour:: An Ethopharmacological Perspective. *Parasitology Today*, v. 16, n. 11, p. 464-468, 2000.

KELEHEAR, C.; BROWN, G. P.; SHINE, R. Influence of lung parasites on the growth rates of free-ranging and captive adult cane toads. *Oecologia*, v. 165, n. 3, p. 585-592, 2011.

KLEIN, S.L. Parasite manipulation of host behavior: mechanisms, ecology, and future directions. *Behavioural processes*, v. 68, n. 3, p. 219-221, 2005.

KLEIN, S.L.; ZINK, M.C.; GLASS, G.E. Seoul virus infection increases aggressive behaviour in male Norway rats. *Animal Behaviour*, v. 67, n. 3, p. 421-429, 2004.

KO, S. K.; KANG, H. M.; IM, W. B.; KWON, H. B. Testicular Cycles in Three Species of Korean Frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, and *Rana dybowskii*. *General and comparative endocrinology*, v. 111, n. 3, p. 347-358, 1998.

KOKUBUM, M. N. C.; GIARETTA, A. A. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylinae) with endotrophic tadpoles: systematic implications. *Journal of Natural History*, v. 39, n. 20, p. 1745-1758, 2005.

LEMCKERT, F.L.; SHINE, R. Costs of reproduction in a population of the frog *Crinia signifera* (Anura: Myobatrachidae) from southeastern Australia. *Journal of Herpetology*, p. 420-425, 1993.

LINDENFORS, P.; NUNN, C. L.; JONES, K. E.; CUNNINGHAM, A. A.; SECHREST, W.; GITTLEMAN, J. L. Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecology and Biogeography*, v. 16, n. 4, p. 496-509, 2007.

LIU, C. C. Types of vocal sac in the Salientia. Proceedings of the Boston Society of Natural History, 41: 19–40. 1935.

LOCHMILLER, R. L.; DEERENBERG, C. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, v. 88, n. 1, p. 87-98, 2000.

LÜDDECKE, H. Variation and trade-off in reproductive output of the Andean frog *Hyla labialis*. *Oecologia*, v. 130, n. 3, p. 403-410, 2002.

MADELAIRE, C. B. Relação sazonal entre reprodução, imunidade e ocorrência de endoparasitas em anfíbios anuros da Caatinga. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.

MADELAIRE, C. B.; DA SILVA, R. J; GOMES, F. R. Calling behavior and parasite intensity in treefrogs, *Hypsiboas prasinus*. *Journal of Herpetology*, v. 47, n. 3, p. 450-455, 2013.

MESQUITA, D.O., COSTA, G.C. & ZATZ, M.G. Ecological aspects of the casque-headed frog *Aparasphenodon brunonii* (Anura, Hylidae) in a Restinga habitat in southeastern Brasil. *Phyllomedusa* 3(1):51-59, 2004.

MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology*, v. 90, n. 01, p. 205-216, 1985.

MOORE, J. Parasites and the behavior of animals. Oxford University Press, 2002.

MORAND, S.; GUÉGAN, J. F. How the biodiversity sciences may aid biological tools and ecological engineering to assess the impact of climatic changes. *Rev. Sci. Tech*, v. 27, n. 2, p. 355-366, 2008.

MUNIZ-PEREIRA, L. C.; VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L. Checklist of helminth parasites of threatment vertebrate species from Brazil. *Zootaxa*, v.2123, p.1-45, 2009.

PEROTTI, M. G. Modos reproductivos y variables reproductivas cuantitativas de un ensamble de anur0s. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 70, n. 277288, 1997.

PINHÃO, R.; A.C. WUNDERLICH; L.A. ANJOS & R.J. SILVA. Helminths of toad *Rhinella icterica* (Bufonidae), from the municipality of Botucatu, São Paulo, Brazil. *Neotropical Helminthology* 3: 35–40, 2009.

POULIN, R. *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton university press, 2007.

PRADO, C. A.; UETANABARO, M.; LOPES, F. S. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brazil. *Journal of Herpetology*, p. 135-139, 2000.

PRADO, C.; HADDAD, C.F.B. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, South-Western Brazil. *The Herpetological Journal*, v. 15, n. 3, p. 181-189, 2005.

PÜTTKER, T.; PARDINI, R.; MEYER-LUCHT, Y.; SOMMER, S. Responses of five small mammal species to micro-scale variations in vegetation structure in secondary Atlantic Forest remnants, Brazil. *BMC ecology*, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.

QUINNELL, R. J.; MEDLEY, G. F.; KEYMER, A. E. The regulation of gastrointestinal helminth populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 330, n. 1257, p. 191-201, 1990.

READING, C. J.; JOFRÉ, G. M. Reproduction in the nest building vizcacheras frog *Leptodactylus bufonius* in central Argentina. *Amphibia-Reptilia*, v. 24, n. 4, p. 415-427, 2003.

SANTOS, V.G.T.; AMATO, S.B.; BORGES-MARTINS, M. Community structure of helminth parasites of the “Cururu” toad, *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae) from southern Brazil. *Parasitology Research* 112: 1097-1103, 2013.

SANTOS, V.G.T.; AMATO, S.B. Helminth fauna of *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) from the Rio Grande do Sul Coastland, Brazil: Analysis the parasite community. *Journal of Parasitology* 96: 823–826, 2010.

SCHÜPBACH, H. U.; BAUR, B. Parasitic mites influence fitness components of their host, the land snail *Arianta arbustorum*. *Invertebrate Biology*, v. 127, n. 3, p. 350-356, 2008.

SHINE, R. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*, p. 297-306, 1979.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com, 2005.

STEARNS, S. C. The evolution of life histories. New York, Oxford University. 249p, 1992.

TINKLE, D. W.; WILBUR, H. M.; TILLEY, S. G. Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution*, v. 24, n. 1, p. 55-74, 1970.

TODD, B. D. Parasites lost? An overlooked hypothesis for the evolution of alternative reproductive strategies in Amphibians. *The American Naturalist*. v.170, n.5, p.793-799, 2007.

TOLEDO, G.M.; AGUIAR, A.; SILVA, R.J.; ANJOS, L.A. Helminth fauna of two species of *Physalaemus* (Anura: Leiuperidae) from an undisturbed fragment of the Atlantic Rainforest, Southeastern Brazil. *Journal of Parasitology* 99: 919-922, 2013.

TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection & the Descent of Man*, Aldine de Gruyter, New York, p. 136-179, 1972.

UETANABARO, M.; PRADO, C. P. A.; RODRIGUES, D. J.; GORDO, M.; CAMPOS Z. Guia de Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos de Entorno. Ed. UFMS/UFMT, Cuiabá, MT, 2008.

VALDEZ TOLEDO, C. L.; PISANÓ, A. Fases ovogenéticas en *Bufo arenarum*. Studies of oogenesis in *Bufo arenarum*. *Reproducción*, v. 4, p. 315-330, 1980.

WELLS, K. D. The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago Press, 2007.

WOOLBRIGHT, L. L. Sexual selection and size dimorphism in anuran
Amphibia. *Am. Nat.* 121, 110–119, 1983.

ZAR, J. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 1999.

Anexo I

Tombos:

IAGU 218;	IAGU 414;	IAGU 1181;
IAGU 219;	IAGU 417;	IAGU 1183;
IAGU 222 a 226;	IAGU 426;	IAGU 1187;
IAGU 228;	IAGU 429;	IAGU 1211;
IAGU 229;	IAGU 499;	IAGU 1216;
IAGU 233 a 235;	IAGU 500;	IAGU 1262 a 1267;
IAGU 237 a 239;	IAGU 521;	IAGU 1269 a 1271;
IAGU 241;	IAGU 525;	IAGU 1293;
IAGU 247;	IAGU 547;	IAGU 1316;
IAGU 274;	IAGU 549;	IAGU 1327 a 1330;
IAGU 276 a 278;	IAGU 557;	IAGU 1333;
IAGU 281;	IAGU 572;	IAGU 1334;
IAGU 284;	IAGU 585;	IAGU 1346.
IAGU 286 a 288;	IAGU 598;	
IAGU 290 a 292;	IAGU 669 a 671;	
IAGU 297;	IAGU 676;	
IAGU 300;	IAGU 678;	
IAGU 302;	IAGU 1070 a 1072;	
IAGU 303;	IAGU 1076;	
IAGU 307;	IAGU 1079 a 1087;	
IAGU 310;	IAGU 1089;	
IAGU 317;	IAGU 1090;	
IAGU 319;	IAGU 1108 a 1112;	
IAGU 334;	IAGU 1114 a 1117;	
IAGU 344;	IAGU 1119;	
IAGU 347;	IAGU 1121;	
IAGU 354;	IAGU 1122;	
IAGU 355;	IAGU 1124;	
IAGU 377;	IAGU 1127;	
IAGU 411;	IAGU 1134;	