

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

THAISE YARA MAGOSSY MASSURA

Anatomia do Aparelho Reprodutor Masculino de
***Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus* (Anura,**
Hylidae) durante o ciclo reprodutivo

ORIENTADOR: PROF. DR. CLASSIUS DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Animal.

- 2008 -

“É melhor tentar e falhar,
a preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão,
a sentar-se nada fazendo até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
do que em dias tristes, em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco,
que em conformidade viver.”

Martin Luther King

Dedico

A Deus pela vida, por me iluminar e me proporcionar tantas oportunidades.

Aos meus pais Pedro (*in memoriam*) e Inêz, que me ensinaram à diferença do bem e do mal e me conduziram sempre pelo caminho do bem. Por terem me proporcionado o estudo, acreditando ser a Educação o maior patrimônio que se pode legar.

As minhas irmãs Lara e Yeda pelo apoio, carinho e amor que recebi durante todo tempo.

Agradecimentos

A Deus por toda inspiração concedida, por toda força dada nos momentos difíceis e por tantas bênçãos derramadas que me fizeram acreditar que quando desejamos verdadeiramente a realização de um sonho é possível.

Ao Prof. Dr. Classius de Oliveira, pela indispensável orientação, por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência. Seu apoio foi imprescindível para realização deste trabalho e, sem dúvida, para o meu aprimoramento profissional.

A minha família que muitas vezes sem me entender me apoiaram. Minha gratidão será eterna.

Aos professores que compuseram a banca do Exame de Qualificação: Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Dra. Ester Tartarotti, pelas críticas, sugestões e palavras incentivadoras.

À Lia Raquel pelo coleguismo e amizade demonstrados de forma grandiosa na confecção da dissertação.

Aos demais colegas do Laboratório Lilian, Rafaela e Rodrigo pela ajuda, pelos momentos de descontração e apoio.

Aos colegas Fausto e Thiago pela ajuda durante as coletas dos animais, respeito e carinho.

Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior pela ajuda, eficiência e dedicação no laboratório.

Aos amigos do programa de pós-graduação em Biologia Animal pelo companheirismo em disciplinas, simpósios e viagens.

A Capes pelo apoio financeiro.

“Cada pessoa que passa em nossa vida é única, sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós”.

SUMÁRIO

I – RESUMO.....	07
II – ABSTRACT.....	09
III – INTRODUÇÃO GERAL.....	11
IV – OBJETIVOS.....	18
V – REFERÊNCIAS.....	19
VI – CAPÍTULO 1.....	24
1. Anatomia do Aparelho Reprodutor Masculino de <i>Dendropsophus minutus</i> e <i>Dendropsophus nanus</i> (Anura, Hylidae) durante o ciclo reprodutivo	
VII – CAPÍTULO 2.....	54
2. Análise dos testículos e das células de Leydig durante o ciclo reprodutivo de <i>Dendropsophus minutus</i> (Anura, Hylidae)	

RESUMO

Atualmente são conhecidos três grupos de anfíbios: as salamandras (Caudata), as cobras-cegas (Gymnophiona) e os anuros (Anura). O Brasil é o país com a maior diversidade de anfíbios do planeta, com mais de 850 espécies de anuros, das quais 65% são endêmicas. Para anuros há muitos trabalhos que relatam o comportamento reprodutivo, mas poucos foram desenvolvidos para descrever a biologia reprodutiva com ênfase em análise morfológica testicular. Neste estudo, o objetivo geral foi descrever a morfologia testicular de *Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus* e, relacionar dados da análise biométrica das gônadas às condições climáticas do ano, verificando assim se há variação destas estruturas. Os animais foram coletados mensalmente entre maio de 2006 e abril de 2007, por meio de excursões noturnas no Município de Palestina-SP, Brasil. Dados de natureza biométrica, como comprimento (cm) e peso (g) total do indivíduo, comprimento (mm) e peso (g) total das gônadas; peso (g) do fígado, estômago e intestino, foram obtidos e correlacionados entre si e com as variáveis climáticas (temperatura do ar, pluviosidade, umidade relativa do ar e fotoperíodo). Os testículos foram fixados em solução de Bouin e posteriormente incluídos em historesina de acordo com protocolo de técnicas histológicas. Testes estatísticos foram empregados para análise e interpretação dos resultados. Os testículos das espécies em estudo são pequenos, esbranquiçados, de forma ovalada e se encontram na cavidade abdominal, localizados na região cranial dos rins. Estatisticamente não houve variação intra-individual no comprimento e peso dos animais como também não ocorreram variações na biometria testicular, corpos adiposos, fígado, estômago

e intestino. Todos estes parâmetros apresentaram-se correlacionados aos fatores ambientais. Em relação às células de Leydig houve diferença estatística tanto na área quanto na quantidade das células ao longo do ciclo reprodutivo. Os dados obtidos com o estudo contribuem para o conhecimento dos aspectos relacionados à biologia reprodutiva dos anuros.

ABSTRACT

Currently three groups of amphibians are known: the salamanders, the caecilians and the anurans. Brazil is the country with the biggest diversity of amphibians of the planet, with more than 850 species of anurans, of which 65% are endemic. There are many studies related to anurans reproductive behavior, but few of them had been developed to describe reproductive biology with emphasis in morphologic analysis of the testis. In this study the general objective was to describe the testicular morphology of *Dendropsophus minutus* and *Dendropsophus nanus* and to relate given of the biometric analysis of the gonads ones to the climatic conditions of the year, thus verifying has some variation of these structures. The animals had been collected monthly between May 2006 and April 2007, by means of nocturnal excursions in the City of Palestine-SP, Brazil. Data of biometric nature, as length (cm) and total weight (g) of the individual, length (mm) and total weight (g) of the gonads ones; weight (g) of the liver, stomach and intestine, had been gotten and correlated between itself and with the climatic variable (temperature of air, rainfall, relative humidity of air and photoperiod). The testicles had been fixed in solution of Bouin and later enclosed in historesin in accordance with protocol of histology techniques. Statistical tests had been used for analysis and interpretation of the results. The testicles of the species in study are small, whitish, of oval form and if they find in the abdominal socket, located in the cranial region of the kidneys. Statistical it did not have individual variation in the length and weight of the animals had as well as not occurred variations in the biometric to testicular, fatty bodies, liver, stomach and intestine. All these parameters had been presented correlated to

the ambient factors. In relation to cells of Leydig it had difference in such a way statistics in the area how much in the amount of the cells throughout the reproductive cycle. The data gotten with the study contribute for the knowledge of the aspects related to the reproductive biology of the anurans.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Panorama geral dos anfíbios

A classe Amphibia (Gray, 1825) foi o primeiro grupo de vertebrados a conquistar o ambiente terrestre, há cerca de 350 a 400 milhões de anos, no período Devoniano e apresenta-se dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Linzey, 2001; Pough *et al.*, 2003). As subclasses Labyrinthodontia, Lepospondyli foram as pioneiras sobre a face da Terra, tendo se extinguido após 200 milhões de anos (Linzey, 2001).

Os Amphibia ainda existentes, ou Lissamphibia, são tetrápodes com tegumento úmido e sem escamas. O grupo inclui três linhagens distintas: Anura (sapos e rãs), Urodela (salamandras) e Gymnophiona (cecílias ou ápodes) (Pough *et al.*, 1999). De modo geral, os Anura possuem membros pélvicos alongados, corpo curto e inflexível; os Urodela possuem membros peitorais e pélvicos de igual tamanho e movem-se por ondulações laterais; já os Gymnophiona empregam a locomoção em serpentina (Orr, 1986).

Atualmente, são conhecidas no mundo, cerca de 6.347 espécies de anfíbios (Frost *et al.*, 2008) e o Brasil é o país com a maior diversidade do planeta, com 832 espécies e taxa de endemismo de aproximadamente de 65% (IUCN, 2008). Apesar de abrigar a maior biodiversidade do planeta, informações sobre a história natural são pouco conhecidas para a maioria das espécies de anuros (Vasconcelos e Rossa-Feres, 2005).

Os anfíbios apresentam ciclo de vida complexo e exibem entre os vertebrados, grande variedade de modos reprodutivos e estratégias reprodutivas, seja no comportamento de atração sexual, nos tipos e locais de

postura e cuidados com as crias (Duellman e Trueb, 1994; Feio *et al.*, 1998; Pough *et al.*, 1999).

1.2 Os Anuros

A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possui membros posteriores modificados para o salto (Orr, 1986). Apresentam ampla distribuição geográfica e somente não habitam regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas (Duellman e Trueb, 1994).

Como os anuros apresentam pele permeável, a maioria das espécies apresenta reprodução noturna. As condições físicas do ambiente que mais interferem na ocorrência e atividade reprodutiva de anuros são a temperatura do ar e a umidade relativa estritamente relacionada ao índice pluviométrico (Jim, 1980). Entretanto, o período reprodutivo pode ocorrer também na estação seca, quando há disponíveis ambientes como corpos d'água permanentes (Bastos *et al.*, 2003).

Em regiões tropicais, onde a sazonalidade é expressiva, a ocorrência e a reprodução da maioria das espécies estão associadas à estação chuvosa (Donnelly e Guyer, 1994; Rossa-Feres e Jim, 1994; Bertoluci e Rodrigues, 2002; Prado *et al.*, 2005).

1.3 A família Hylidae

A família Hylidae (Rafinesque, 1815) atualmente é composta por cerca de 856 espécies distribuídas em três subfamílias: Hylinae (613 sp.), Pelodyadinae (185 sp.) e Phyllomedusinae (58 sp.) (Frost *et al.*, 2008). Esta

nova classificação foi realizada por Faivovich *et al.* (2005) em uma revisão taxonômica e análise filogenética baseada em dados moleculares, o qual realocou as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Hyla* em outros gêneros.

Hylidae está representada por uma grande variedade de espécies que apresentam ampla distribuição nas regiões tropicais e temperadas (Faivovich *et al.*, 2005). É composta em sua maioria por espécies de pequeno a médio porte (17 a 100 mm), podendo alguns alcançar cerca de 140 mm de comprimento rostro-cloacal (Orr, 1986). São extremamente diversificados quanto a sua morfologia externa (Rossa-Feres, 1982) e modos reprodutivos (Kwet e Di-Bernardo, 1999). Como característica principal apresenta discos arredondados nas pontas dos dedos, que constituem adaptação ao modo de vida arborícola e escalador (Kwet e Di-Bernardo, 1999).

1.4 As espécies

Dendropsophus minutus (= *Hyla minuta*) (Peters, 1872) é um anuro com aproximadamente 2,3 cm de comprimento rostro-cloacal (Santos e Oliveira, 2007). Possui coloração dorsal castanha, castanho-alaranjada ou bege e usualmente apresenta duas longas estrias longitudinais paralelas e escuras (Haddad, 1991) (Figura 1).

Dendropsophus minutus apresenta ampla distribuição geográfica na América do Sul, ocorrendo do norte da América do Sul até o Uruguai e Misiones na Argentina; e da costa atlântica aos territórios do leste Boliviano (Lutz, 1958). Possui vocalizações de alta intensidade que permitem a

propagação do som a distâncias consideráveis, facilitando a sua localização (Cardoso e Haddad, 1984).

Dendropsophus nanus (= *Hyla nana*) (Boulenger, 1889) é um animal de pequeno porte, medindo aproximadamente 2 cm de comprimento rostro-cloacal. Apresentam coloração amarelada (Figura 2) e vocalizam praticamente o ano todo. É um anfíbio de área aberta e que se reproduz em ambientes de corpos d'água lênticos temporários ou permanentes. Vocalizam sobre gramíneas e ciperáceas presentes nas margens dos corpos d'água. A abundância de *Dendropsophus nanus* está correlacionada com algumas variáveis climáticas como temperatura da água, temperatura do ar e pluviosidade (Melo *et al.*, 2007).



Figura 1: Exemplar macho de *Dendropsophus minutus*. (santuário-ra-bugio.htmlplanet.com/images/hylaminuta)



Figura 2: Exemplar macho de *Dendropsophus nanus*. (www.biodiversidade.cnpm.embrapa.br/FotosEspec...)

1.5 Aspectos reprodutivos

Nos anuros, os testículos são órgãos pares, arredondados, compactos, de coloração variando do esbranquiçado ao amarelado (Goin e Goin, 1962) e estão ligados diretamente aos ductos arquinéfricos, que por sua vez abrem-se na cloaca transportando apenas o esperma, ou então através de túbulos renais

(mesonéfricos) e destes aos ductos arquinéfricos e cloaca, transportando urina e espermatozoides, mantendo em ambos os casos uma estreita relação com o aparelho urinário (Romer e Parsons, 1985; Hildebrand, 1995). Os testículos podem apresentar variações anatômicas de forma e peso de acordo com o período reprodutivo (Duellman e Trueb, 1994), além de outras alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução (Lofts, 1974).

Macroscopicamente, os testículos são constituídos por unidades aproximadamente esféricas que alojam as células da linhagem germinativa, denominados de lóculos seminíferos (Oliveira e Vicentini, 1998). Os lóculos estão imersos em tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais ou de Leydig, produtoras de hormônios (Lofts, 1974; Junqueira e Carneiro, 1999). As células de Leydig são implicadas com a síntese de andrógenos, principalmente a testosterona. Os hormônios secretados por essas células são fundamentais para o controle das funções reprodutoras masculinas nos vertebrados, atuando na diferenciação e no funcionamento dos órgãos reprodutores, induzindo o comportamento reprodutivo característico da espécie e influenciando a produção de espermatozoides (Rodrigues e Favaretto, 1999).

Limitando externamente o testículo existe uma delgada cápsula conjuntiva denominada de túnica albugínea, constituída basicamente por fibras colágenas. Recobrimo esta túnica existe um revestimento peritoneal, o mesórquio, que não somente fixam os corpos adiposos ao pólo cranial testicular (Oliveira e Vicentini, 1998), como também permite íntima associação entre rins e testículos (Santos e Oliveira, 2007). Os corpos adiposos, estruturas típicas dos anfíbios, são comumente descritos nos anuros como estruturas

digitiformes presas à extremidade cranial das gônadas (Oliveira e Vicentini, 1998; Oliveira e Zieri, 2005). Estas estruturas servem como reserva energética para as gônadas e podem estar muito reduzidas ou extraordinariamente desenvolvidas refletindo uma alteração anatômica que varia de acordo com o acúmulo lipídico no tecido adiposo multilocular que os constitui (Fitzpatrick, 1976). Huang *et al.* (1997) sugerem que a energia acumulada no fígado pode ser utilizada durante o processo espermiogênese de *Duttaphrynus melanostictus* (= *Bufo melanostictus*), sendo este órgão outra fonte de reserva energética.

Os anfíbios apresentam ciclo de vida complexo e exibem a maior variedade de modos reprodutivos que qualquer outro grupo de vertebrados (Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 1999). Segundo Blaustein *et al.* (2002) e Huang *et al.* (1997) os fatores ambientais como a temperatura do ar, fotoperíodo e pluviosidade, podem afetar a reprodução das espécies de anuros por causar alterações nos ciclos reprodutivos.

Prado e Uetanabaro (2000) afirmam que a reprodução dos anuros ocorre na maior parte em estações chuvosas quando comparadas às estações secas. Além dos fatores climáticos como a pluviosidade e temperatura, que exercem fortes influências na atividade reprodutiva, outros fatores como competição por alimento, predação e a temperatura da água também afetam a reprodução desses animais por induzir a liberação de hormônios reprodutores (Pough *et al.*, 2003).

De modo geral, a reprodução de anuros, está intimamente relacionada com fatores climáticos, os quais podem ocasionar tanto mudanças na organização estrutural (tanto macro quanto microscópica) das gônadas, como

nos corpos adiposos, fígado, estômago e intestino. Para *Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus* poucos trabalhos foram desenvolvidos para caracterizar a anatomia do aparelho reprodutor durante o ciclo reprodutivo. Assim, características anatômicas e morfológicas do sistema reprodutor de *Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus* foram correlacionadas aos fatores climáticos, permitindo assim, avaliar o aspecto reprodutivo de ambas as espécies e ampliar o conhecimento da biologia reprodutiva dos anuros neotropicais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

O trabalho proposto descreve a anatomia do aparelho reprodutor masculino de *Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus* durante o ciclo reprodutivo anual, com base em análises anatômicas e histológicas do sistema reprodutor e, relaciona estes parâmetros às condições ambientais na qual os animais estavam expostos.

2.2 Específicos:

- Descrever a anatomia das gônadas masculinas de *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus minutus*, com base em de análises biométricas;
- Descrever a organização morfológica testicular geral para ambas as espécies;
- Analisar aspectos biométricos do fígado, estômago e intestino;
- Descrever histologicamente as células de Leydig de *Dendropsophus minutus*;
- Analisar a quantidade e área das células de Leydig durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, R. P.; MOTTA, J. A. O.; LIMA, L. P.; GUIMARÃES, L. D. 2003. Anfíbios da floresta nacional de Silvânia, Estado de Goiás. **Stylo**. Goiânia, 82p.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M. T. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, 23:161-167.
- BLAUSTEIN, A. R.; ROOT, T. L.; KIESECKER, J. M.; BELDEN, L. K. OLSON; D. H.; GREEN, D. M. 2002. Amphibian phenology and climate change. **Conservation Biology**, 16(6): 1454-455.
- CARDOSO, A. J.; HADDAD, C. F. B. 1984. Variabilidade acústica em diferentes populações e interações agressivas de *Hyla minuta* (Amphibia: Anura). **Cienc. e Cult.**, 36(81): 393-399.
- DONNELLY, M. A.; GUYER, C. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in an assemblage of neotropical hylid frogs. **Oecologia**, 98 (3-4):291-302.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. 1994. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American museum of natural history**. Central park west at 79th street, New York, NY. (294): 240 p., 16 figures, 2 table, 5 appendices.

- FEIO, R. N.; BRAGA, U. M. L.; WIEDERHECKER, H.; SANTOS, P. S. 1998. **Anfíbios do parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais)**. Viçosa: UFV, IEF, 32 p.
- FITZPATRICK, L. C. 1976. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. **Amer. Zool.**, 16: 725-732.
- FROST, D. 2008. Amphibian species of the world. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acesso em setembro de 2008.
- GOIN, C. J.; GOIN, O. B. 1962. **Introduction to herpetology**. San Francisco: W. H. Freeman, 341p.
- HADDAD, C. F. B. 1991. **Ecologia reprodutiva de uma comunidade de anfíbios anuros da Serra do Japi, sudeste do Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 700p.
- HUANG, W. S., LIN, J. Y., YU, J. Y. L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. **Zool. Sc.**, 14: 497-503.
- IUCN, Conservation International, and NatureServe. 2008. **Global Amphibian Assessment**. <www.globalamphibians.org>.
- JIM, J. 1980. **Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 332p.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 1999. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 427p.

- KWET, A.; DI-BERNARDO, M. 1999. **Pró-Mata – Anfíbios. Amphibien. Amphibians.** Porto Alegre: Edipucrs, 107p.
- LINZEY, D. 2001. **Vertebrate Biology.** Mc.Graw-Hill, New York. 1ª ed. 596p.
- LOFTS, B. 1974. **Reproduction. Physiology of the amphibia.** New York: Academic Press, 2: 107-218.
- MELO, G. V.; ROSSA-FERES, D. C.; JIM, J. Variação temporal no sítio de vocalização em uma comunidade de anuros de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, 7(2)<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n2/pt/abstract?article+bn01707022007>.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**, Porto Alegre, 6(1): 79-88.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(2): 454-460.
- ORR, R. T. 1986. **Biologia dos vertebrados.** 5º ed. São Paulo: Roca, 508 p.
- POUGH, F. H.; CHRISTINE, M. J.; HEISER, J. B. 2003. **A vida dos vertebrados.** 2º ed. Atheneu, São Paulo, 798p.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. 1999. **A vida dos vertebrados.** 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 798p.
- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M. 2000. Reproductive biology of *Lysapsus limellus* Cope, 1862 (Anura, Pseudidae) in the pantanal, Brazil. **Zoocriaderos**, 3(1): 25-30.

- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. B. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. **Amphibia-Reptilia**, 26: 211-221.
- ROMER, A.S.; PARSONS, T.S. (1985). **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 559p.
- RODRIGUES J. A., FAVARETTO A. L. V. 1999. Sistema Reprodutor. Cap. 73, 868-891 pp. In: Fisiologia. Aires, MM. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ROSSA-FERES, D. C.; JIM, J. 1994. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo. **Rev. Bras. Biol.**, 54:323-334.
- SANTOS, L. R. S.; OLIVEIRA, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 24(1): 64-70.
- SBH, Sociedade Brasileira de Herpetologia. (2008). Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>
- VASCONCELOS, T. S.; ROSSA-FERES, D. C. 2005. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?article+BN01705022005

Capítulo 1

ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO DE *Dendropsophus minutus* E *Dendropsophus nanus* (ANURA, HYLIDAE) DURANTE O CICLO REPRODUTIVO

THAISE YARA MAGOSSO MASSURA¹, CLASSIUS DE OLIVEIRA²

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP - São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

² Departamento de Biologia - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, São José do Rio Preto -São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: ciclo reprodutivo, anatomia, *Dendropsophus*, Hylidae

Endereço para Correspondência:

Departamento de Biologia - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP.

CEP: 15.040-000, São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

Fax: (55-17) 3221 – 3990

Anatomia do Aparelho Reprodutor Masculino de *Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae) durante o ciclo reprodutivo

RESUMO

A reprodução é um processo de fundamental importância para a perpetuação da espécie e para compreensão deste processo reprodutivo, as características morfofuncionais e a ação do meio ambiente devem ser consideradas em conjunto. No presente estudo o objetivo foi descrever a morfologia das gônadas de machos de *Dendropsophus minutus* e *Dendropsophus nanus*, e relacionar dados da análise biométrica das gônadas às condições climáticas do ano, verificando assim se há alguma variação destas estruturas ao longo do ciclo reprodutivo anual. Os animais foram coletados mensalmente entre maio de 2006 e abril de 2007, por meio de excursões noturnas no Município de Palestina – São Paulo, Brasil. Dados de natureza biométrica, como comprimento (cm) e peso (g) total do indivíduo, comprimento (mm) e peso das gônadas, peso do fígado, estômago e intestino, foram obtidos e correlacionados entre si e com as condições climáticas (temperatura do ar, pluviosidade, umidade relativa do ar e fotoperíodo). Os corpos adiposos foram descritos quanto a sua arquitetura morfológica e classificados em três categorias de acordo com seu tamanho relativo. Os testículos de ambas as espécies são órgãos pequenos, esbranquiçados, de forma ovalada e se encontram na cavidade abdominal, localizados cranialmente aos rins. Estatisticamente não há variação intra-individual e também ao longo do ciclo reprodutivo quanto ao comprimento e peso dos testículos; bem como para os corpos adiposos, fígado, estômago e intestino. Entretanto, houve correlação de

alguns destes parâmetros com as variáveis ambientais. Os dados obtidos contribuem para o conhecimento dos aspectos relacionados à biologia reprodutiva dos anuros.

ABSTRACT

The reproduction is a process of basic importance and for understanding of this reproductive process, the morph functionaries characteristics and the action of the environment must be considered in set. In the present study the aim was to describe the morphology of gonads of males of *Dendropsophus minutus* and *Dendropsophus nanus*, and to relate data of the biometric analysis of the gonads ones to the climatic conditions of the year, thus verifying has some variation of these structures throughout the annual reproductive cycle. The animals had been collected monthly between May 2006 and April 2007, by means of nocturnal excursions in the City of Palestine - SP, Brazil. Data of biometric nature, as length (cm) and total weight (g) of the individual, length (mm) and weight of the gonads ones, weight of the liver, stomach and intestine, had been gotten and correlated between itself and with the climatic conditions (temperature of air, rainfall, relative humidity of air and photoperiod). The fatty bodies had been described how much its architecture morphologic and classified in three categories in accordance with its relative size. The testicles of both the species are small agencies, whitish, of oval form and if they find in the abdominal socket, located cranially to the kidneys. Statistical it does not have individual variation and also throughout the reproductive cycle how much to the length and weight of the testicles; as well as for the fatty bodies, liver, stomach and intestine. However, it had correlation of some of these parameters with the ambient variable. The gotten data contribute for the knowledge of the aspects related to the reproductive biology of the anurans.

INTRODUÇÃO

A influência do clima na ocorrência e atividade reprodutiva de anuros de regiões tropicais é determinada principalmente pela distribuição e volume de chuva (Duellman e Trueb, 1994). Segundo Blaustein *et al.* (2002) diversos fatores ambientais podem afetar a reprodução e interferir na estrutura da comunidade. Fatores abióticos como temperatura, pluviosidade e fotoperíodo manifestam alterações nos ciclos reprodutivos de anfíbios (Huang *et al.*, 1997). Estas variáveis determinam a época favorável do ano e a duração em que os anuros se mantêm ativos, determinando sua distribuição estacional (Jim, 1980).

Nos anuros, os testículos são órgãos pares, arredondados, compactos, com coloração variando de esbranquiçada ao amarelado (Goin e Goin, 1962). Embora o padrão de coloração citado ocorra na maioria das espécies, *Eupemphix nattereri* (Leiuperidade) e algumas outras apresentam uma tonalidade escura no testículo devido à presença de células que contém intensa pigmentação no citoplasma, denominados melanócitos viscerais (Oliveira e Zieri, 2005; Franco-Belussi *et al.*, 2008). As gônadas podem apresentar variações anatômicas de forma e peso de acordo com o período reprodutivo (Duellman e Trueb, 1994), além de outras alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução (Lofts, 1974).

Os corpos adiposos, estruturas típicas dos anfíbios, são constituídos por uma massa de tecido adiposo. Estes são comumente descritos nos anuros como estruturas digitiformes presas à extremidade cranial das gônadas (Oliveira e Vicentini, 1998; Oliveira e Zieri, 2005). Estas estruturas podem estar muito reduzidas ou muito desenvolvidas, refletindo uma alteração anatômica,

que varia de acordo com o acúmulo lipídico no tecido adiposo multilocular e servem como reserva nutricional para as gônadas (Fitzpatrick, 1976). Huang *et al.* (1997) sugerem que a energia acumulada no fígado pode ser usada na espermiogênese do *Duttaphrynus melanostictus*, sendo este órgão outra fonte de reserva nutricional.

Dendropsophus nanus e *Dendropsophus minutus* possuem ampla distribuição na região neotropical, vocalizando sobre a vegetação na margem de corpos d'água temporários ou permanentes. São reconhecidas pela alta intensidade da propagação do som, o que facilita sua localização no ambiente (Cardoso e Haddad, 1984).

Este trabalho descreve a anatomia do aparelho reprodutor de *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus minutus* durante o ciclo reprodutivo com base em análises biométricas, e as relaciona com as circunstâncias ambientais na área de estudo. Descreve ainda a organização morfológica geral dos testículos e corpos adiposos; analisa aspectos biométricos do fígado, estômago e intestino, traçando uma análise comparativa entre as duas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e seis exemplares de *Dendropsophus minutus* (n=3 por mês) e quinze exemplares de *Dendropsophus nanus* (n=3 por mês) foram coletados entre maio 2006 a abril de 2007, por meio de excursões noturnas no município de Palestina–São Paulo, Brasil. Os animais foram encontrados vocalizando na

borda de um açude permanente situado entre pasto e vegetação ripária, na fazenda Santo Antônio do Turvo (20° 21' 29,1''S; 49° 16' 55,7''W) (Figura 1).



Figura 1: Local de coleta. Fazenda Santo Antônio do Turvo.

Os animais coletados foram acondicionados em sacos plásticos umedecidos internamente e transportados ao Laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), em seguida, transferidos para um terrário contendo terra e água para evitar a desidratação dos animais, além de galhos, folhas e alimento retirados do meio para simular seu habitat natural. No dia seguinte foram anestesiados e mortos por saturação em éter etílico. Com uma incisão mediana ventral a parede corporal foi rebatida e os órgãos reprodutores expostos para análise e fotodocumentação em microscópio estereoscópico (Leica MZ16).

Dados de natureza biométrica, como comprimento (cm) e peso (g) total do indivíduo foram registrados com a utilização de um paquímetro de metal

com precisão de 0,05 mm e balança analítica de precisão (0,0001 g). Os testículos foram removidos, pesados (g) e medidos em seu eixo maior (mm) com os mesmos equipamentos. Além destes dados, outros como o peso (g) do fígado, estômago e intestino também foram coletados e utilizados para correlacionar entre si e com as condições climáticas (pluviosidade, temperatura do ar, umidade relativa do ar e fotoperíodo) registradas na região de estudo.

Os corpos adiposos foram descritos quanto a sua arquitetura anatômica e classificados em três categorias (Figura 2) utilizando-se como referencial o tamanho dos testículos aos quais os corpos adiposos homolaterais estão aderidos (Tabela 1).

Tabela 1: Grau de desenvolvimento dos corpos adiposos.

Grau de Desenvolvimento	Descrição
1	Volume nitidamente menor que o testículo.
2	Volume aproximado ao do testículo.
3	Volume acentuadamente maior que o testículo.

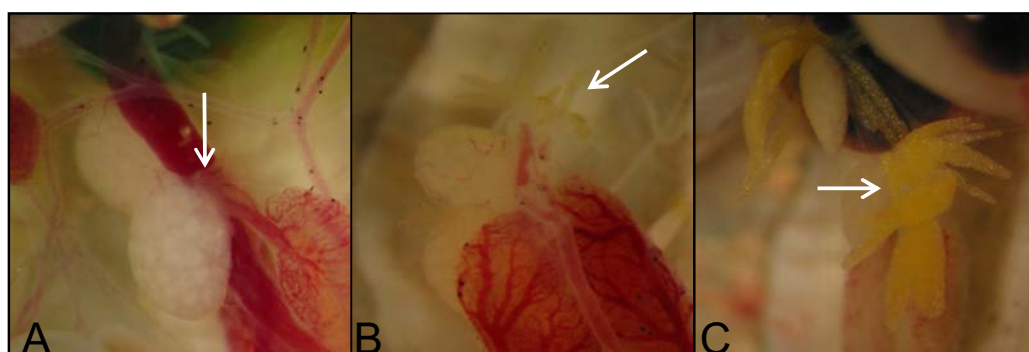


Figura 2: Ilustração do desenvolvimento dos corpos adiposos de *Dendropsophus minutus*: A – Grau 1; B – Grau 2; C – Grau 3. Corpo adiposo (seta).

Nos meses de maio, junho, julho, agosto, setembro e novembro de 2006 e abril de 2007 não foram capturados exemplares de *Dendropsophus nanus*, provavelmente devido às condições ambientais que, de alguma forma, influenciou na distribuição estacional dos animais. Já a espécie *Dendropsophus minutus* foi coletada ao longo de todos os meses de estudo.

Dados meteorológicos mensais como a pluviosidade, a umidade relativa do ar, a temperatura (°C) e o fotoperíodo foram conseguidos por meio da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e pelo site <http://www.apollo11.com/index.php>, respectivamente, os quais foram empregados para descrever e relacionar as condições ambientais com a atividade reprodutiva dos animais (Figura 3).

A espécie *Dendropsophus minutus* foi agrupada e dividida em quatro grupos de acordo com as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno); *Dendropsophus nanus* foi colocado em apenas dois grupos (primavera e verão) devido à ocorrência dos espécimes.

Os animais foram coletados de acordo com a licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: 02010.0003336/05-53) e o manuseio seguindo os princípios da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA: 001/06).

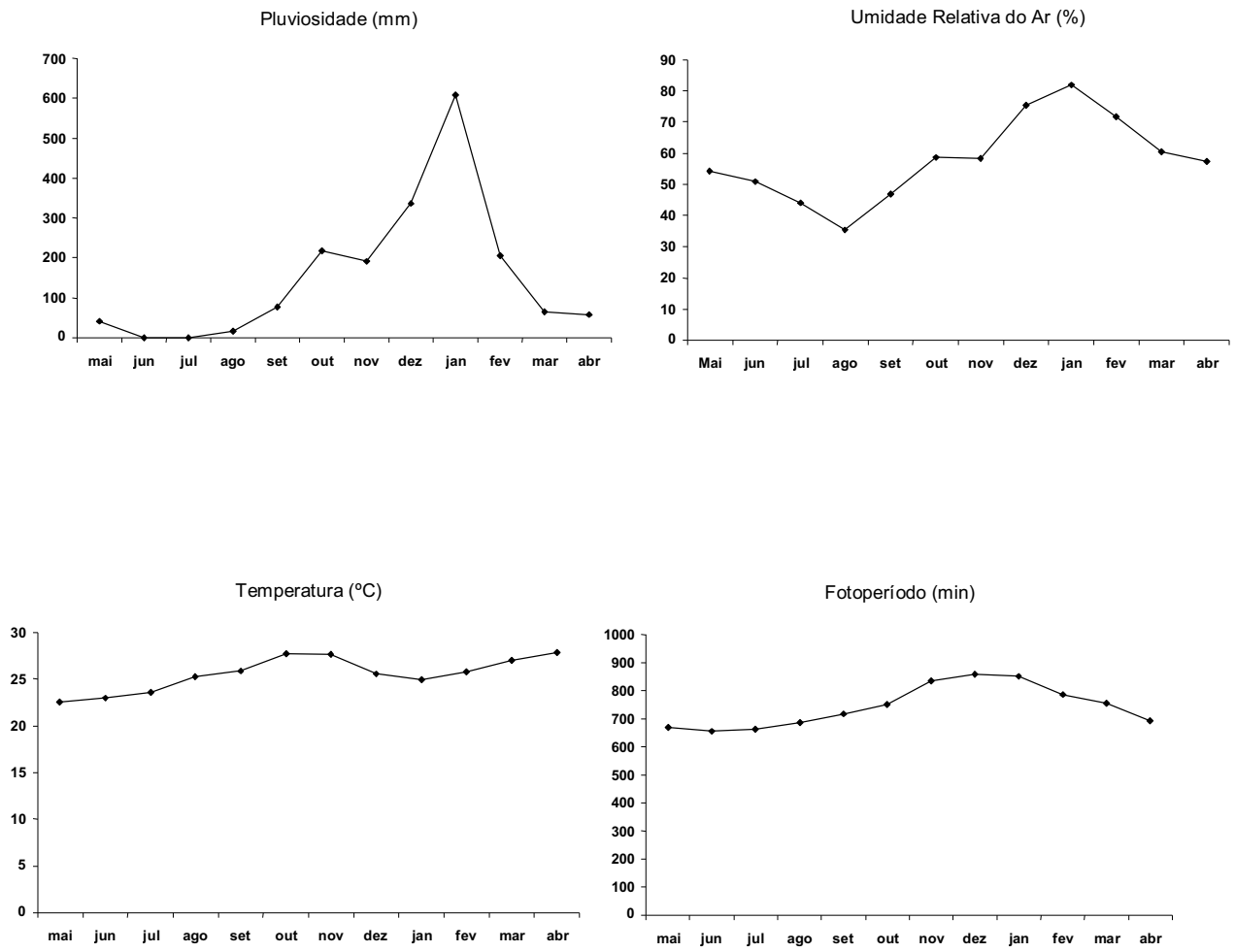


Figura 3: Dados climáticos e sua distribuição de maio de 2006 a abril de 2007. A - Pluviosidade total (mm), B - Umidade relativa do ar (%), C - Temperatura média (°C) e D - Fotoperíodo (minutos).

Análise Estatística:

Foi verificada a existência de valores discrepantes (*outliers*), e posteriormente a normalidade foi testada por Shapiro-Wilk, e quando necessários, foram submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$ (Lehner, 1996).

Todos os resultados obtidos foram analisados entre estações do ano durante o período amostrado. Os dados biométricos foram comparados ao longo das estações por meio da análise de variância (One-Way-ANOVA) para os dados paramétricos, ou por Kruskal-Wallis para os não paramétricos, sendo completados quando necessários, por testes de comparações múltiplas (Tukey e Dunn, respectivamente). Foram feitas correlações entre os parâmetros biométricos por meio de testes não paramétricos de Spearman ou teste paramétrico de Pearson. Dados biométricos das gônadas foram analisados entre as estações pelo teste Kruskal-Wallis e para cada estação (entre a gônada direita e esquerda) com base no teste Wilcoxon.

A dependência entre os parâmetros biométricos e climáticos foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Os exemplares foram fixados em formol 10% e preservados como material testemunho. Foi considerado $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

RESULTADOS

Dendropsophus minutus e *Dendropsophus nanus* apresentam os testículos com forma ovalada e coloração branco-leitoso devido a seu conteúdo

espermático (Figura 4). As gônadas estão localizadas na cavidade celomática, em posição ventral aos rins e em sintopia com a face visceral destes (Figura 5).

Na extremidade cranial de cada testículo encontram-se aderidos corpos adiposos formados por vários prolongamentos digitiformes com coloração variando do branco ao amarelo. Limitando as gônadas existe uma delgada cápsula testicular conjuntiva denominada de túnica albugínea e externamente a esta o mesórquio, um revestimento no qual o corpo adiposo está aderido.

Os testículos de *Dendropsophus minutus* têm comprimento médio de 1,12 ($\pm 0,24$ mm) e peso médio 0,0003 ($\pm 0,00$ g) e em *Dendropsophus nanus* os testículos apresentaram comprimento médio de 1,08 ($\pm 0,27$ mm) e 0,0002 ($\pm 0,00$ g) de peso. As gônadas de ambas espécies não sofreram variações de peso e comprimento ao longo do ciclo reprodutivo (*Dendropsophus minutus* – peso (H=7,56; p=0,05) e comprimento (F=0,77; p=0,51) do testículo direito – peso (H=4,43; p=0,21) e comprimento (F=1,45; p=0,24) do testículo esquerdo e *Dendropsophus nanus* – peso (H=0,60; p=0,43) e comprimento (F=0,06; p=0,79) do testículo direito – peso (H=1,11; p=0,29) e comprimento (H=0,03; p=0,85) do testículo esquerdo.

O teste de Wilcoxon, realizado para comparação entre os antímeros gonadais, demonstrou que tanto peso quanto o comprimento testicular de *Dendropsophus minutus* (z=-0,66; p=0,50/ z=-0,14; p=0,88) e *Dendropsophus nanus* (z=-0,71; p=0,47/ z=-0,10; p=0,91) não sofreu variação ao longo do ciclo anual. O índice gonadossomático realizado para as duas espécies também não sofreu variação (*Dendropsophus minutus* – (H=7,11; p=0,06) e *Dendropsophus nanus* – (H=1,16; p=0,28).

Em relação às variáveis ambientais o comprimento dos testículos de *D. minutus* apresentou-se correlacionado à umidade relativa do ar (Figuras 6 e 7) e ao fotoperíodo (Figuras 8 e 9). Já em *D. nanus* este mesmo parâmetro demonstrou associado apenas ao fotoperíodo (Figuras 10 e 11).

Machos de *D. minutus* tem comprimento médio de 2,26 ($\pm 0,31$ cm) e peso médio total de 0,58 ($\pm 0,13$ g) e *D. nanus* 2,00 ($\pm 0,12$ cm) de comprimento médio e peso médio de 0,41 ($\pm 0,06$ g). Com relação a análise biométrica dos animais, tanto o comprimento quanto o peso não sofreram variações significativas ao longo do ciclo (*D. minutus*: $F=0,29$; $p=0,83$ / $F=1,66$; $p=0,19$ e *D. nanus* $F=0,15$; $p=0,70$ / $F=0,26$; $p=0,62$, respectivamente). O peso e comprimento dos animais apresentaram correlações positivas ao longo das estações (*D. minutus*: $r=0,73$; $p=0,00$ e *D. nanus*: $r=0,75$; $p=0,00$).

Em relação aos fatores ambientais, o peso de *D. minutus* mostrou-se relacionado com a pluviosidade (Figura 12) e a umidade relativa do ar (Figura 13); já o comprimento do animal está inversamente relacionado com a temperatura do ar (Figura 14), ou seja, quanto menor a temperatura, maiores são os animais encontrados em campo. Esta mesma relação climática e biométrica também foi observada para *D. nanus* (Figura 15). Entretanto, a umidade relativa do ar (Figura 16) e o fotoperíodo (Figura 17) estão diretamente associados ao peso do animal.

Os corpos adiposos, o peso do fígado, estômago e intestino não manifestaram alterações ao longo do ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* ($H=1,98$; $p=0,57$ / $H=6,97$; $p=0,07$ / $H=5,23$; $p=0,15$, respectivamente) e de *Dendropsophus nanus* ($H=2,03$; $p=0,56$ / $F=0,06$; $p=0,79$ / $H=0,33$; $p=0,56$, respectivamente). Entretanto, quando analisados uns aos outros, o peso do

figado de *D. minutus* demonstrou-se correlacionado positivamente com o peso do estômago e intestino (Figura 18) e com o peso do animal (Figura 19). O peso corporal do animal também apresentou-se correlacionado com o peso do estômago e intestino (Figura 20).

Dentre os órgãos analisados, o peso do figado de *D. minutus* é o único que sofre influência de fatores ambientais como a pluviosidade (Figura 21), umidade relativa do ar (Figura 22) e fotoperíodo (Figura 23). Já em *D. nanus* o peso do estômago e intestino está diretamente relacionado ao fotoperíodo (Figura 24).

DISCUSSÃO

Dendropsophus minutus e *Dendropsophus nanus* são espécies de formação aberta, encontradas sobre vegetação herbácea ou gramínea que cresce junto a margem da água. Em época favorável à reprodução surgem em grandes quantidades e formam densas concentrações de indivíduos de *D. minutus* (Santos, 2006) e *D. nanus*.

Duellman e Trueb (1994) descrevem os testículos como estruturas pares, esféricas ou ovais, localizadas numa posição ventral ao nível da metade anterior dos rins, podendo em algumas espécies serem longos e se estenderem até a extremidade posterior dos rins. Segundo Goin e Goin (1962) estas estruturas são compactas e de coloração amarelada, cuja função é a produção de hormônio e espermatozóides (Hildebrand, 1995).

Os testículos de *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus minutus* apresentam assimetrias nítidas quanto à sua localização, dispostos

ventralmente aos rins em alturas diferentes na cavidade celomática. Os rins se encontram em posição imediatamente ventral à parede dorsal da cavidade abdominal e estão intimamente associados aos testículos por meio do mesentério gonadal ou mesórquio, como relatado também por Santos e Oliveira (2007).

Os corpos adiposos, estruturas digitiformes, apresentam-se aderidos à extremidade cranial dos testículos. Este órgão pode ser deslocado em diferentes alturas, profundidades e orientações de seus eixos longitudinal e transversal. Esta grande mobilidade ocorre em função dos estados fisiológicos das vísceras adjacentes e principalmente dos segmentos do tubo digestório, o que, sem dúvida, alguma é uma característica protetora para o processo gametogênico (Oliveira, 1996).

Segundo Fitzpatrick (1976) os corpos adiposos podem apresentar-se muito reduzidos ou extraordinariamente desenvolvidos, refletindo uma alteração anatômica que varia de acordo com o acúmulo lipídico no tecido adiposo e servem como reserva nutricional para as gônadas. Em *D. minutus* e *D. nanus*, não apresentaram alterações significativas durante o estudo como também não manifestou correlação com nenhum fator ambiental. Entretanto, a coloração variou do esbranquiçado ao amarelado, e esta variação pode estar relacionada à constituição lipídica.

Outros parâmetros que também não apresentaram variação significativa ao longo dos meses analisados foram o peso do fígado, estômago/intestino, comprimento e o peso do animal, sugerindo que pode haver uma relação entre organização das estruturas analisadas com o biótipo do animal. Como não foi verificada nenhuma alteração anatômica dos animais (peso e comprimento) e

dos órgãos (peso) em estudo, é possível que mesmo na estação seca exista alimento em campo disponível o suficiente para não ocorrer alterações dessas estruturas ao longo do ciclo, assim não há a necessidade de fazer uma reserva energética nos meses que há mais oferta de alimento (estação chuvosa). Outro fator que deve ter colaborado com essa organização morfológica é o fato que no local de coleta não há mudanças bruscas dos fatores abióticos e é uma área com vegetação ripária permanente, o que favorece uma constante de outros organismos, mantendo a oferta alimentar.

Os testículos de ambas as espécies apresentaram as mesmas características anatômicas como já descrito para outras espécies de anuros como *Caudiverbera cudiverbera* (Hermosilla *et al.*, 1983), *Scinax fuscovarius* (Oliveira e Vicentini, 1998), *Eupemphix nattereri* (Oliveira e Zieri, 2005) *Dendropsophus minutus* (Santos e Oliveira, 2007). No decorrer do ciclo reprodutivo tanto em *D. minutus* quanto *D. nanus* os testículos não manifestaram variações anatômicas de tamanho e peso entre os antímeros, ou seja, não há variação intra-individual entre os pares gonadais durante o ciclo reprodutivo. Estes dados corroboram os trabalhos de Santos e Oliveira (2007) também realizado com *D. minutus*, como também com as observações feitas em *Rana perezi* (Delgado *et al.*, 1989) e *Lithobates catesbeianus* (Sasso-Cerri *et al.*, 2004). Também como relatado para *Lithobates catesbeianus* (Sasso-Cerri *et al.*, 2004) e *D. minutus* (Santos e Oliveira, 2007) o índice gonadosomático das espécies estudadas também não apresentou alterações durante o ciclo reprodutivo. Este fato pode ser considerado uma boa estratégia reprodutiva, pois a energia economizada pelo animal em não ter que reorganizar sua estrutura testicular pode ser desviada para outros parâmetros

não analisados nesse trabalho que requerem uma demanda de energia como o canto, o comportamento de corte e outras atividades relacionadas à reprodução. Uma variação no peso testicular poderia ocasionar uma variação nos demais órgãos em estudo como o fígado e estômago/intestino (que têm como função básica armazenamento de glicogênio, metabolismo de lipídios e armazenamento de alimentos) podendo inferir que exista uma relação anatômica entre órgãos estudados e que assim como os testículos não variam durante o ciclo reprodutivo.

Huang *et al.* (1997) observaram que *Duttaphrynus melanostictus*, uma espécie de ciclo reprodutivo contínuo, não apresentam alterações anatômicas no fígado e dos corpos adiposos durante o ciclo anual. *Dendropsophus minutus* também apresenta ciclo reprodutivo contínuo (Santos e Oliveira, 2007) e também não apresentou variações no fígado e nos corpos adiposos, o que pode ser um indicativo que animais que possuem ciclo reprodutivo contínuo não apresentam variações anatômicas dos demais órgãos.

Com relação aos fatores climáticos pode-se inferir que estas variáveis são importantes tanto na morfologia dos órgãos quanto na biometria do animal, pois quando os parâmetros biométricos foram analisados separadamente ao longo do ciclo, não apresentaram manifestações em sua estrutura. Segundo Lofts (1974) e Rastogi *et al.* (1976), o fotoperíodo e a temperatura são os principais fatores ambientais controladores de ciclos reprodutivos em anfíbios e certamente interferem também no desenvolvimento dos anuros. Os dias mais longos e quentes geralmente são os dias de verão e primavera onde coincidentemente a pluviosidade é maior e, conseqüentemente, a umidade também. Nesses meses, como relatado por Wolda (1978), a oferta alimentar é

maior e a produção de folhas e brotos parece estar fortemente correlacionada à pluviosidade coincidindo com a época reprodutiva de grande parte dos animais; há também um favorecimento de outros organismos que podem ser incluídos na cadeia alimentar dos animais presentes no local de estudo. Desta forma, a oferta alimentar pode estar disponibilizando uma maior proporção no investimento de energia dos animais em estudo.

Para Telfort e Dyson (1990), Silverin e Andrén (1992), os fatores climáticos especialmente precipitação, umidade relativa e temperatura exercem forte influência na atividade reprodutiva dos anuros. A temperatura apresentou-se inversamente correlacionada com o tamanho corporal de *D. minutus* e *D. nanus*, ou seja, quanto menor a temperatura, maior os animais encontrados em campo. Provavelmente, o fato de ter encontrado animais maiores é que anfíbios pequenos possuem, proporcionalmente, maior área de superfície que anfíbios maiores e, portanto os animais menores têm uma maior taxa de perda de água por evaporação (Duellman e Trueb, 1994), sendo a aparição de animais maiores em dias mais frios uma característica protetora para os indivíduos menores. Outro fato a ser destacado também é que a metodologia empregada para capturar estes animais é feita com base nas vocalizações, é óbvio considerar animais que apresentam melhor capacidade “física” (maiores e mais pesados), estão aptos a ganhar uma disputa pelo território e, portanto, são os que estarão em atividade reprodutiva (vocalizando).

A atividade reprodutiva de anuros em ambientes sazonais está geralmente associada com o período de umidade em países de clima tropical (Hoogmoed e Gorzula, 1979; Aichinger, 1987) e, a partir dos resultados, podemos sugerir que outros aspectos dos animais, como o desenvolvimento e

acúmulo energético estão correlacionados com os fatores ambientais. Além dos fatores ambientais citados, existem outros como a temperatura da água, pressão por predação e competição por alimento que também podem interferir na reprodução dos anuros (Prado e Uetanabaro, 2000).

Em uma análise comparativa, concluímos que ambas as espécies sofrem influência dos fatores abióticos, talvez *D. minutus* sofra mais influência por ser uma espécie generalista e de ampla distribuição estacional (Melo *et al.*, 2007) enquanto que *D. nanus* só aparece em poucos meses de coleta e sua abundância está correlacionada com algumas variáveis climáticas como temperatura da água, do ar e pluviosidade (Melo *et al.*, 2007). De modo geral, todas as variáveis ambientais, em maior ou menor proporção estão relacionadas à atividade reprodutiva e ao desenvolvimento dos anfíbios anuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AICHINGER, M. 1987. Annual activity patterns of anurans in the seasonal neotropical environment. **Oecologia**, 71: 583-592.
- BLAUSTEIN, A. R.; ROOT, T. L.; KIESECKER, J. M.; BELDEN, L. K.; OLSON, D. H.; GREEN, D. M. 2002. Amphibian phenology and climate change. **Conservation Biology**, 16(6): 1454-455.
- CARDOSO, A. J.; HADDAD, C. F. B. 1984. Variabilidade acústica em diferentes populações e interações agressivas de *Hyla minuta* (Amphibia: Anura). **Cienc. e Cult.**, 36(81): 393-399.
- DELGADO, M. J.; GUTIÉRREZ, P.; ALONSO-BEDATE, M. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezii*. **General and Comparative Endocrinology** 73(1): 1-11.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. 1994. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p.
- FITZPATRICK, L. C. 1976. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. **Amer. Zool.**, 16: 725-732.
- FRANCO-BELUSSI L.; ZIERI R.; SANTOS, L.R.S.; MORESO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2008. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record, Part A**, in press.
- GOIN, C. J.; GOIN, O. B. 1962. **Introduction to herpetology**. San Francisco: W. H. Freeman, 341p.
- HERMOSILLA, B. I.; URBINA, P. A.; CABRERA, P. J. C. 1983. Espermatozoos en la Rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linne,

- 1758) (Anura, Leptodactilidae). **Bol. Soc. Biol.** Concepción, Chile, Tomo, 54: 103-115.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 700p.
- HOOGMOED, M.; GORZULA, S. 1979. Checklist of the savanna inhabiting frogs of the El Manteco region with notes on their ecology and the description of a new species of tree frogs (Hylidae, Anura). *Zoologische mededelingen*, Leiden, 54(13): 183-216.
- HUANG, W. S.; LIN, J. Y.; YU, J. Y. L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. **Zool. Sc.**, 14: 497-503.
- JIM, J. 1980. **Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 332p.
- LEHNER, P. N. 1996. **Handbook of ethological methods**. Cambridge University Press, United Kingdom, 672p.
- LOFTS, B. 1974. **Reproduction. Physiology of the amphibia**. New York: Academic Press, 2: 107-218.
- MELO, G. V.; ROSSA-FERES, D. C.; JIM, J. Variação temporal no sítio de vocalização em uma comunidade de anuros de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, 7(2)<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n2/pt/abstract?article+bn01707022007>.
- OLIVEIRA, C. 1996. **Estudo morfológico do testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado, 131p.

- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**, Porto Alegre, 6(1): 79-88.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(2): 454-460.
- PRADO, C. P. A.; UETANABARO, M. 2000. Reproductive biology of *Lysapsus limellus* Cope, 1862 (Anura, Pseudidae) in the pantanal, Brazil. **Zoocriaderos**, 3(1): 25-30.
- RASTOGI, R. K.; BAGNARA, J. T.; IELA, L.; KRASOVICH, M. A. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **J. Morphol.**, 197(3): 277-302.
- SANTOS, L. R. S. 2006. **Ciclo reprodutivo masculino de *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-Unesp.
- SANTOS, L. R. S.; OLIVEIRA, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 24(1): 64-70.
- SASSO-CERRI, E; FARIA, F. P.; FREYMÜLLER, E.; MIRAGLIA, S. M. 2004. Testicular morphological changes during the sazonal reproductive cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Zoology**. 301A: 249-260.

- SILVERIN, B. E.; ANDRÉN, C. 1992. The ovarian cycle in the natterjack toad, *Bufo calamita*, and its relation to breeding behaviour. **Amphibia-Reptilia** 13: 177-192.
- TELFORD, S. R.; DYSON, M. L. 1990. The effect of rainfall on interclutch interval in painted reed frogs (*Hyperolius marmoratus*). **Copeia**, 3: 644-648.
- WOLDA, H. 1978. Seasonal fluctuations in rainfall, food and abundance of tropical insects. **Journal of Animal Ecology**, 47: 369-381.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.

FIGURAS

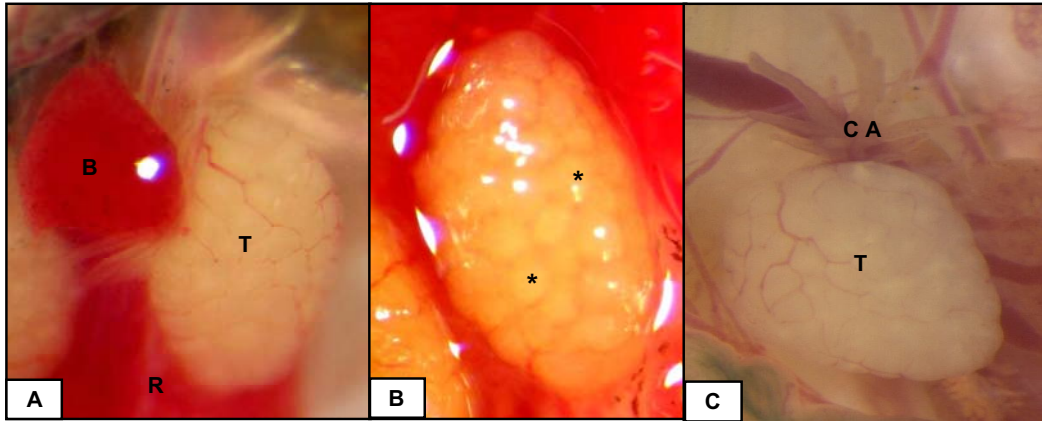


Figura 4: Forma, coloração dos testículos de *Dendropsophus minutus* (A e B) e *Dendropsophus nanus* (C). A = B – baço, T – testículo, R – rim; B = * detalhe mesoscópico de um lóculo seminífero; C = T – testículo, CA – corpo adiposo. Aumento: 37,5x

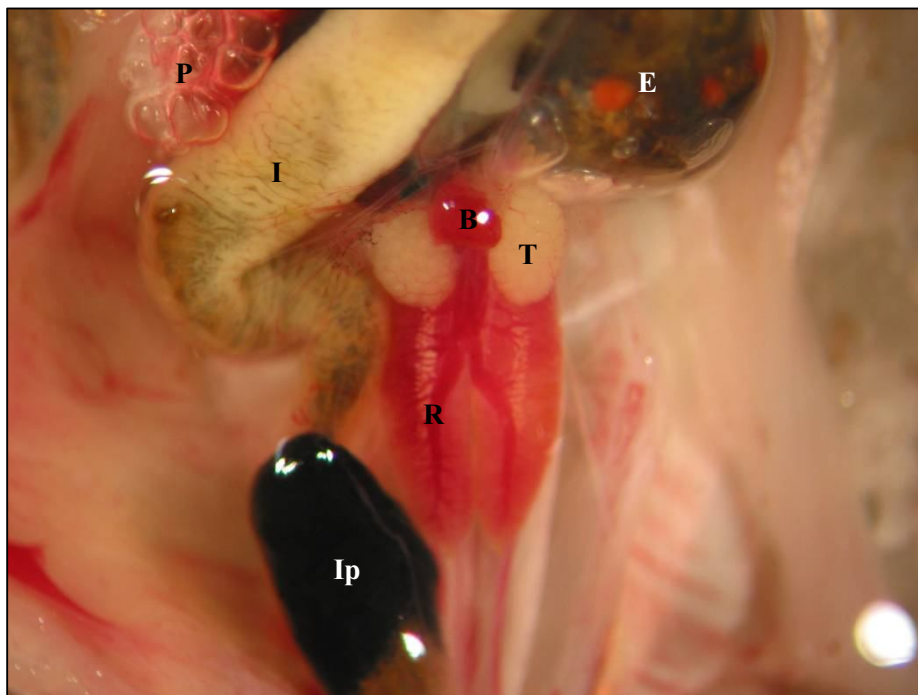


Figura 5: Localização dos testículos de *D. minutus* na cavidade abdominal e sua sintopia com os demais órgãos. E – estômago; P – pulmão; I – intestino; B – baço; T – testículo; R – rim; Ip – porção final do intestino repleto de melanócitos pigmentados. Aumento: 10x

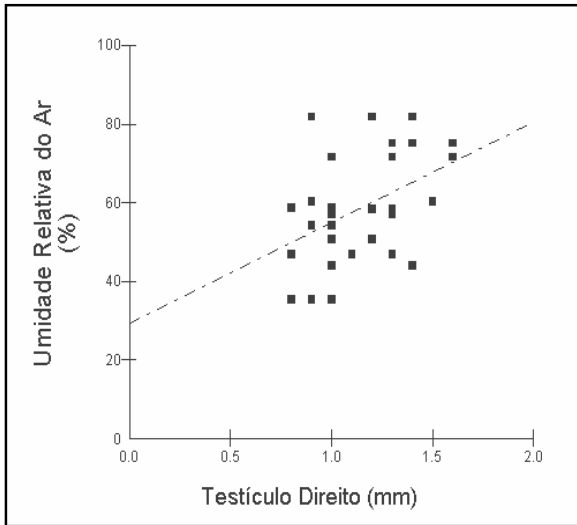


Figura 6: Relação da umidade relativa do ar (%) e comprimento do testículo direito de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=8,33$; $p=0,00$).

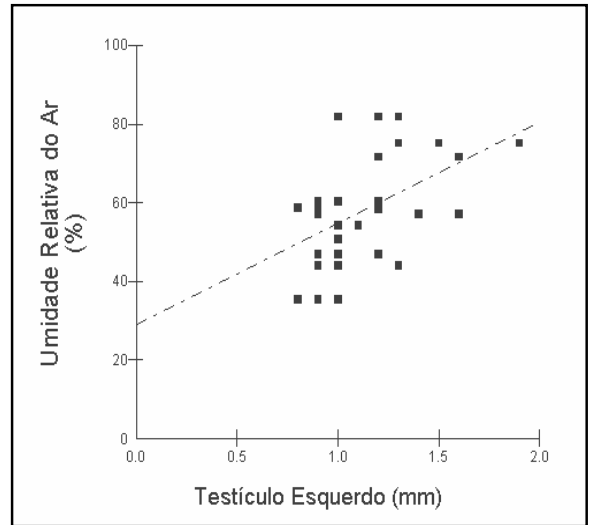


Figura 7: Relação da umidade relativa do ar (%) e comprimento do testículo esquerdo de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=12,83$; $p=0,00$).

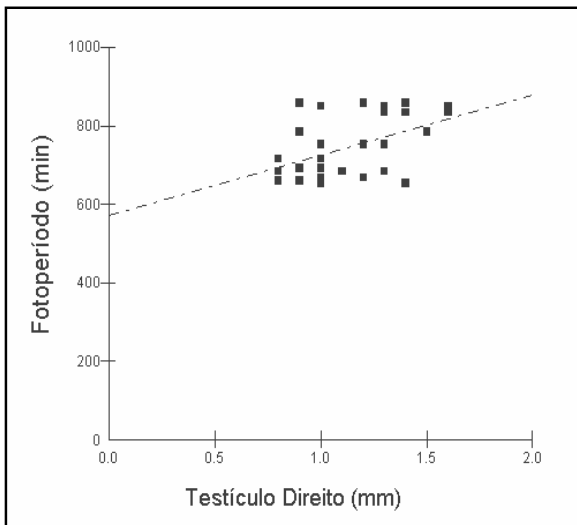


Figura 8: Relação do fotoperíodo (min) e comprimento do testículo direito de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=9,65$; $p=0,00$).

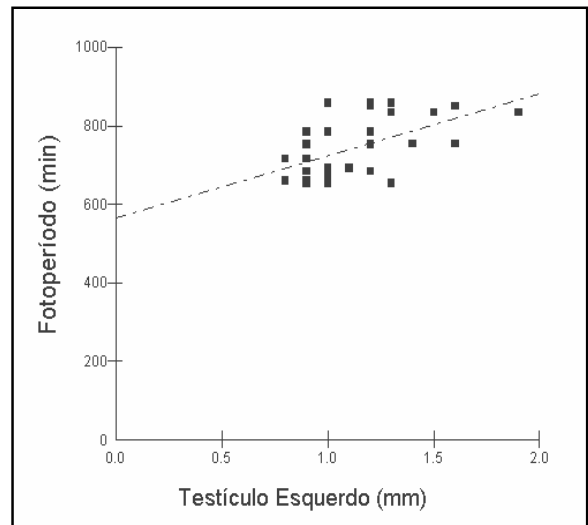


Figura 9: Relação do fotoperíodo (min) e comprimento do testículo esquerdo de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=16,48$; $p=0,00$).

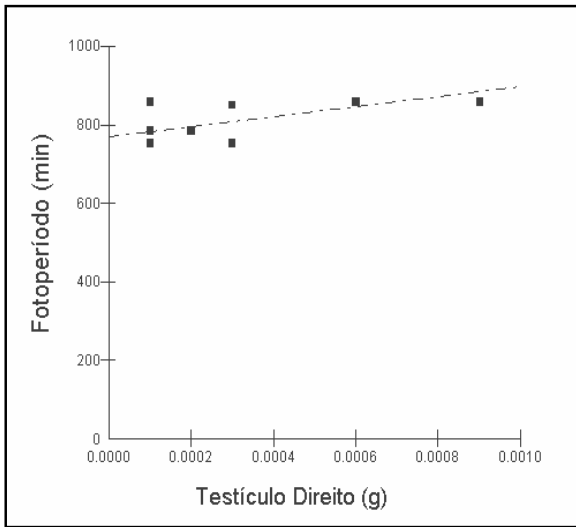


Figura 10: Relação do fotoperíodo (min) e peso do testículo direito de *D. nanus*. Teste de Regressão Linear Simples (F=8,11; $p=0,01$).

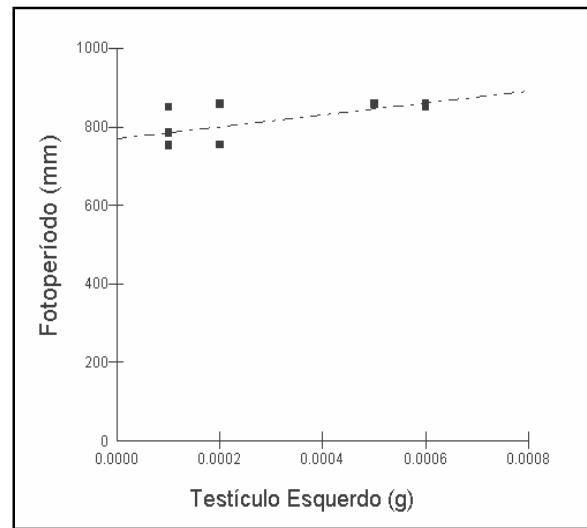


Figura 11: Relação do fotoperíodo (min) e peso do testículo esquerdo de *D. nanus*. Teste de Regressão Linear Simples (F=8,13; $p=0,01$).

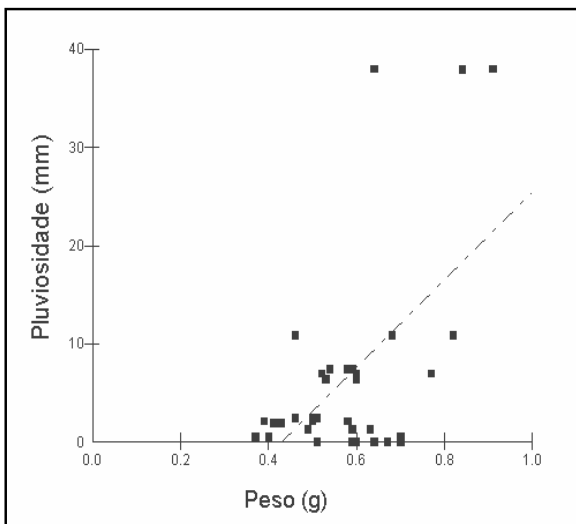


Figura 12: Relação da pluviosidade (mm) e peso corporal de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples (F=16,13; $p=0,00$).

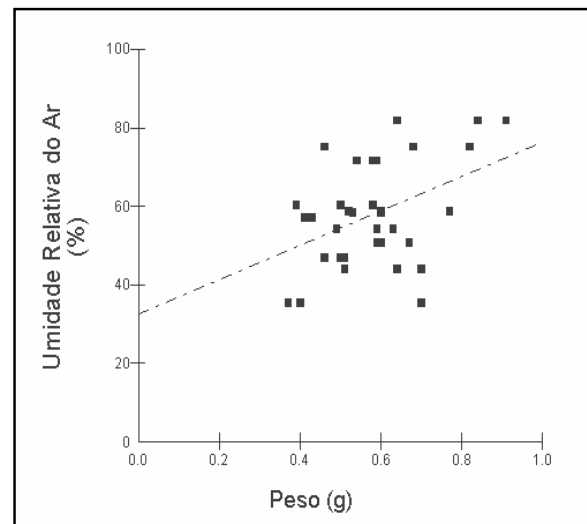


Figura 13: Relação da umidade relativa do ar (%) e peso de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples (F=7,99; $p=0,00$).

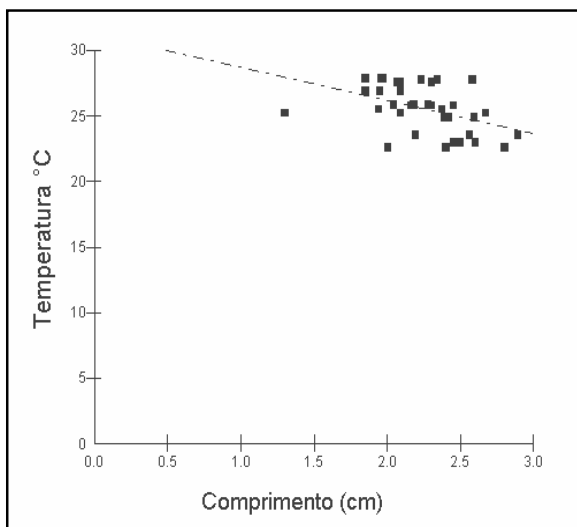


Figura 14: Relação da temperatura (°C) e o comprimento de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=8,33$; $p=0,00$).

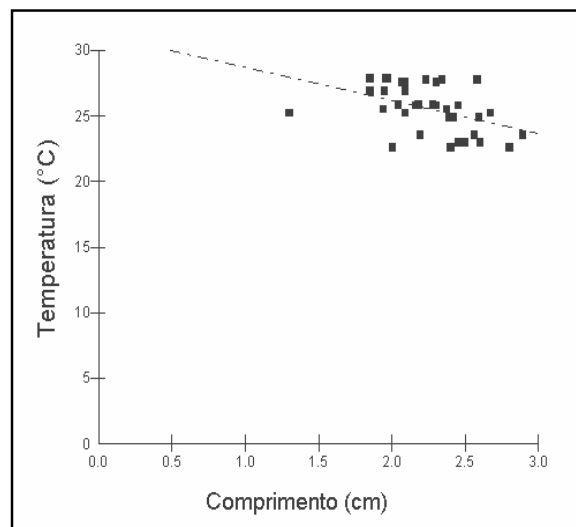


Figura 15: Relação da temperatura (°C) e comprimento de *D. nanus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=8,33$; $p=0,00$).

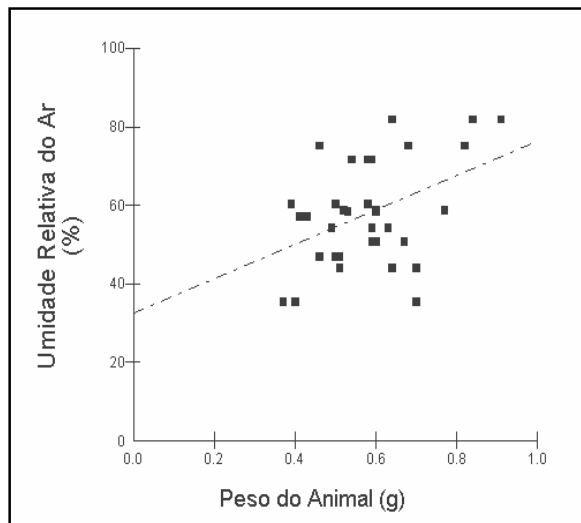


Figura 16: Relação da umidade relativa do ar (%) e peso de *D. nanus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=5,01$; $p=0,04$).

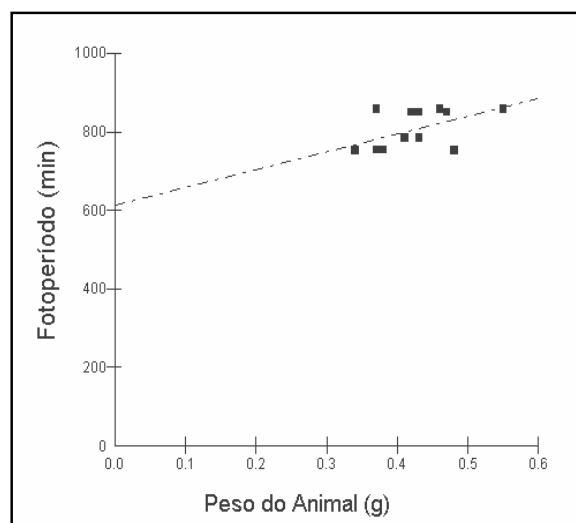


Figura 17: Relação do fotoperíodo (min) e peso de *D. nanus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=6,28$; $p=0,02$).

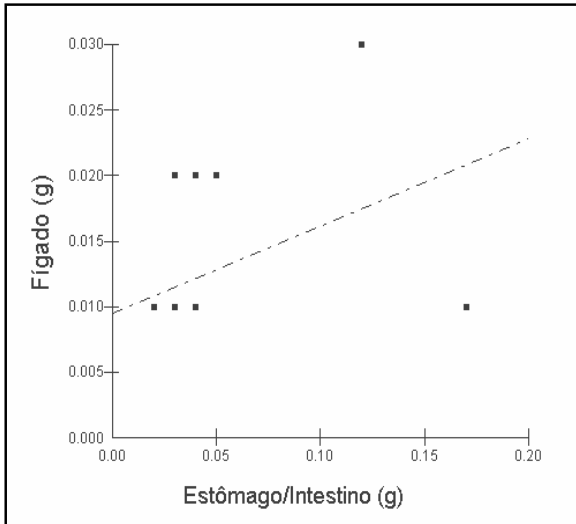


Figura 18: Relação do peso do fígado com o peso do estômago/intestino de *D. minutus*. Correlação de Spearman ($r_s=0,49$; $p=0,00$).

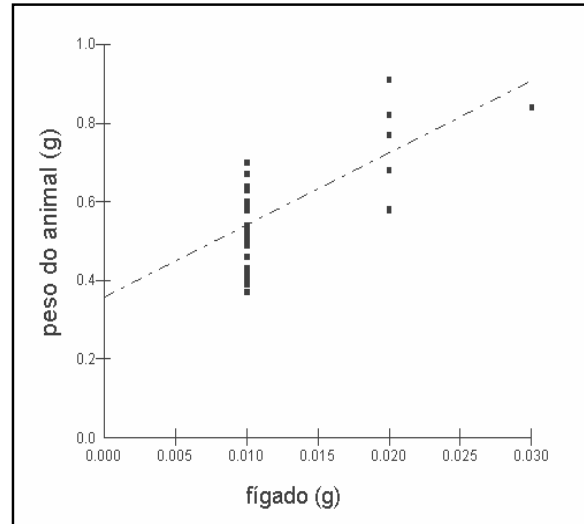


Figura 19: Relação do peso do animal e do fígado de *D. minutus*. Análise de correlação de Spearman ($r_s=0,53$; $p=0,00$).

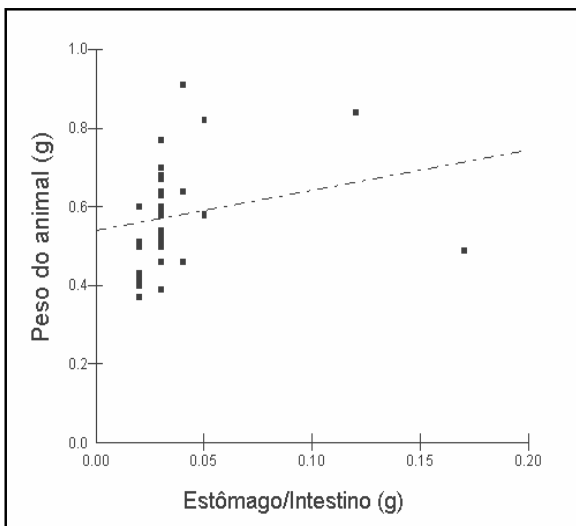


Figura 20: Relação do peso do animal e do estômago/intestino de *D. minutus*. Análise de correlação de Spearman ($r_s=0,49$; $p=0,00$).

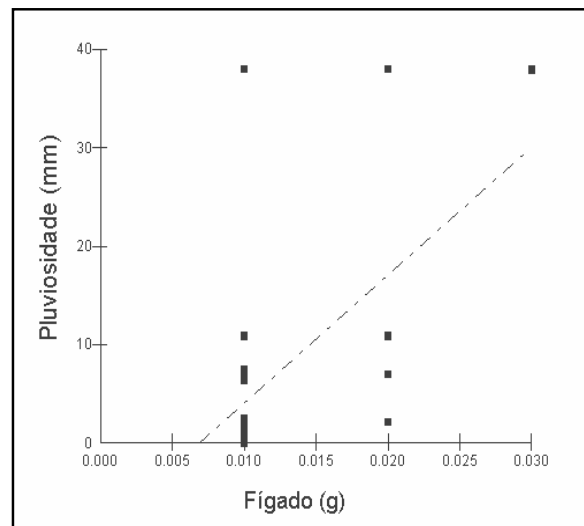


Figura 21: Relação da pluviosidade (mm) e peso do fígado de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=18,62$; $p=0,00$).

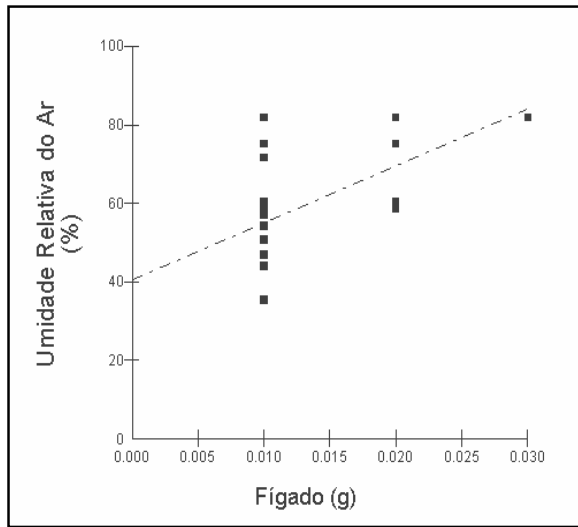


Figura 22: Relação da umidade relativa do ar (%) e peso do fígado de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=12,55$; $p=0,00$).

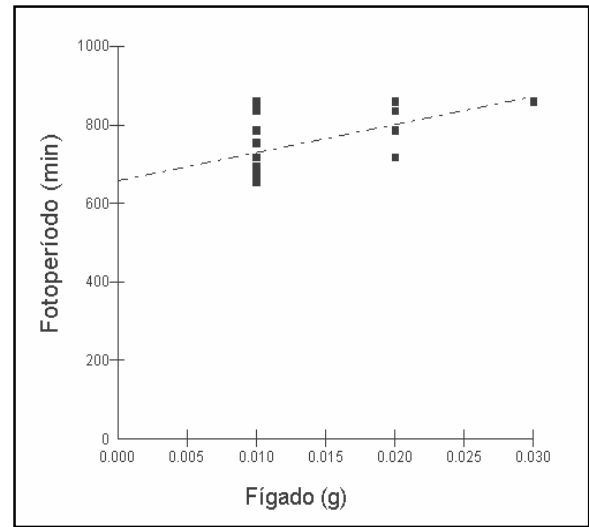


Figura 23: Relação do fotoperíodo (min) e peso do fígado de *D. minutus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=9,03$; $p=0,00$).

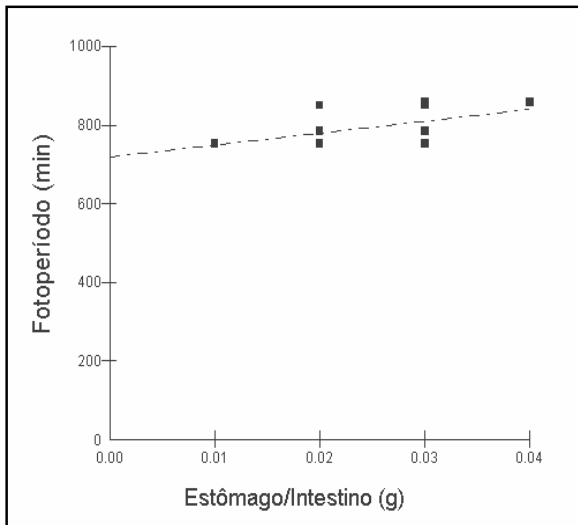


Figura 24: Relação do fotoperíodo (min) e peso do estômago e intestino de *D. nanus*. Teste de Regressão Linear Simples ($F=4,60$; $p=0,04$).

Capítulo 2

ANÁLISE DOS TESTÍCULOS E DAS CÉLULAS DE LEYDIG DURANTE O CICLO REPRODUTIVO DE *Dendropsophus minutus* (ANURA, HYLIDAE)

THAISE YARA MAGOSSO MASSURA¹, CLASSIUS DE OLIVEIRA²

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP - São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

² Departamento de Biologia - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP, São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: testículos, histologia, células de leydig, *Dendropsophus*.

Endereço para Correspondência:

Departamento de Biologia - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP.

CEP: 15.040-000, São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

Fax: (55-17) 3221 - 3990

Análise dos testículos e das células de Leydig durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae)

RESUMO

As gônadas dos anfíbios anuros são constituídas por unidades esféricas que se alojam nas células da linhagem germinativa, denominados lóculos seminíferos. Os lóculos estão imersos em tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células de Leydig que são produtoras de hormônios. O objetivo proposto no trabalho foi de realizar uma descrição histológica do interstício testicular e analisar a área e quantidade dessas células sazonalmente. Para o presente estudo, os animais foram coletados de abril de 2004 a março de 2005 na região de São José do Rio Preto-SP, Brasil. O interstício é formado por fibras de tecido conjuntivo, fibroblastos e capilares sanguíneos e muitas células de Leydig. Estas células apresentam o núcleo bem evidente e possui forma ligeiramente alongada ou ovalada e o citoplasma parece ser muito reduzido. Foi verificado que há diferença estatística na quantidade e na área das células de Leydig durante o ciclo reprodutivo.

ABSTRACT

The gonads of the anurans amphibians are constituted by spherical units that lodge the cells of the germinate ancestry, called seminiferous locules. The locules are immersed in fabric conjunctive flabby contend sanguineous and lymphatic vases, nerves and the cells of Leydig that are producing of hormones. The aim considered in the study was to carry through a histology description of the interstice season to testicular and to analyze the area and amount of these cells. For the study the animals had been collected of April of 2004 the March of 2005 in the region of Sao José do Rio Preto-SP, Brazil. The interstice is formed by staple fibres of fabric conjunctive, sanguineous fibroblasts and capillaries and many cells of Leydig. These cells present the well evident nucleus and slightly possess prolonged form or oval and the cytoplasm very seems to be reduced. It was verified that it has difference statistics in the amount and the area of the cells of Leydig during the reproductive cycle.

INTRODUÇÃO

Em vertebrados os testículos têm duas importantes funções: produção de hormônio (andrógeno) e produção de espermatozóides (Emerson, 1997). Duellman e Trueb (1986) e Goin e Goin (1962) descrevem os testículos dos anuros como estruturas pares, oval com coloração geralmente amarelada; e estão localizadas em posição ventral aos rins.

As gônadas são constituídas por unidades aproximadamente esféricas que alojam as células da linhagem germinativa, denominados de lóculos seminíferos (Oliveira e Vicentini, 1998). As células da linhagem germinativa estão agrupadas em cistos formados pelos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e apresentam-se em diversos estádios de diferenciação celular, caracterizando uma espermatogênese cística para estes animais (Santos, 2006).

Os lóculos seminíferos estão imersos em tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais ou de Leydig (Junqueira e Carneiro, 1999; Lofts, 1974). As células de Leydig estão relacionadas com a síntese de andrógenos, principalmente a testosterona. Os hormônios secretados por essas células são fundamentais para o controle das funções reprodutoras masculinas nos vertebrados, atuando na diferenciação e no funcionamento dos órgãos reprodutores; induzindo o comportamento reprodutivo característico da espécie e influenciando a produção de espermatozóides (Rodrigues e Favaretto, 1999; Duvall *et al.*, 1982). Segundo Mori e Christensen (1980) as características ultraestruturais mais proeminentes das células de Leydig é abundância de retículo endoplasmático liso e a

presença de numerosas mitocôndrias. A biossíntese da testosterona é catalisada por enzimas localizadas predominantemente nas membranas do retículo endoplasmático liso e no citoplasma adjacente, no entanto, uma parte da biossíntese também ocorre no interior das membranas das mitocôndrias e, em algumas espécies, gotas de lipídios são comuns nas células de Leydig (Mori e Christensen, 1980). Limitando externamente o testículo há uma delgada cápsula testicular conjuntiva denominada de túnica albugínea, constituída basicamente por fibras colágenas (Oliveira e Vicentini, 1998).

Há vários trabalhos com o interstício em anuros que apresentam o ciclo reprodutivo potencialmente contínuo como *Rana nigromaculata* e *Rana rugosa* (Ko *et al.*, 1998), *Rana perezi* (Delgado *et al.*, 1989), e descontínuo como *Rana esculenta* (Lofts, 1964) e *Rana dybowskii* (Ko *et al.*, 1998) relatando os níveis de testosterona e lipídios durante o ciclo reprodutivo. Entretanto, para anuros de regiões neotropicais e com ciclo reprodutivo contínuo como *Dendropsophus minutus* (Santos, 2006), há uma escassez de trabalhos relacionados a área intersticial, principalmente no que diz a respeito das células de Leydig. Assim, o presente estudo tem como objetivo apresentar a arquitetura histológica da área intersticial dos testículos e analisar quantidade e área das células de Leydig durante o ciclo reprodutivo anual de *Dendropsophus minutus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta exemplares de *D. minutus* foram capturados por meio de coletas mensais durante o período de abril de 2004 à março 2005 (exceto agosto e setembro, devido à estivação anual), por meio de visitas noturnas ao campo na

região de São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil (20°45'47,5"S e 49°19'38,8"W). Os animais coletados foram acondicionados em sacos plásticos umedecidos internamente com água e transportados ao Laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), em seguida, transferidos para um terrário contendo terra e água para evitar a desidratação dos animais, além de galhos, folhas e alimento retirados do meio para simular seu habitat natural. No dia seguinte, foram anestesiados e mortos por saturação em éter etílico.

Com uma incisão mediana ventral, a parede corporal foi rebatida e os testículos de *D. minutus* foram removidos e fixados em solução de Bouin por 24 horas e, depois, desidratados em série crescentes de álcool (Hopwood, 1990). As amostras testiculares foram incluídas em resina do tipo Methalcrilato glicol (Historesin Leica®) seccionadas a 2,0 µm e corados com Azul de Toluidina com bórax (1:1), Hematoxilina/Eosina e Reticulina de Gömori.

Para a análise morfológica, as lâminas montadas foram observadas ao microscópio Leica (DM4000 B) e as imagens foram capturadas com auxílio de uma câmara acoplada ao microscópio (Leica DFC280). Em seguida, foram realizadas análises da arquitetura histológica com base no programa Image Pró-plus versão 4.5.

Para a análise da área e quantificação celular, o material foi agrupado em duas estações: fria e seca (que compreende os meses de abril, maio, junho, julho e agosto) e quente e úmida (outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março). No mês de setembro não houve coleta de animais, devido às condições climáticas que, provavelmente, influenciaram na distribuição estacional dos indivíduos.

Para a análise da área celular foram aleatorizados testículos de cinco animais por estação (fria/seca e quente/úmida) e de cada gônada obteve-se cortes histológicos, onde foram analisados em três campos, também aleatórios, do interstício testicular. De cada campo foram escolhidas aleatoriamente cinco células de Leydig para a medida da área, totalizando quinze células por animal e, portanto, um total de setenta e cinco células em cada estação.

Para a análise quantitativa das células de Leydig foram selecionados testículos de dois animais por mês (ou seja, 10 animais por estação) e em cada gônada foram feitos cinco cortes mediais e de cada secção foram aleatorizados cinco campos, totalizando 250 campos para cada estação. As células de Leydig foram contadas manualmente.

Análise Estatística:

Para a análise estatística, primeiro foi verificada a existência de valores discrepantes (*outliers*) e, posteriormente, a normalidade dos dados foi testada por D'Agostino-Pearson e quando necessários esses dados foram submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$ (Lehner, 1996). Utilizamos o teste *t* de *Student*, para verificar se há variações sazonais referente à quantidade de células de Leydig e o teste Mann-Whitney para a área celular. Foi considerado $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

Os animais foram coletados de acordo com a licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA: 02010.0003336/05-53) e o manuseio seguindo os princípios da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA: 001/06).

RESULTADOS

Externamente revestindo o testículo encontra-se uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, e por transparência desta, observa-se que as gônadas apresentam coloração branco-leitosa possivelmente devido ao conteúdo espermático. Os testículos apresentam-se formados por unidades circulares ou esféricas, conferindo um aspecto granuloso, que é referente aos elementos seminíferos (Figura 1).

Delimitados por tecido conjuntivo, os lóculos seminíferos constituem unidades morfológicas e apresentam-se constituídos por todos os tipos celulares da linhagem germinativa (desde espermatogônias primárias a espermatozóides maduros) (Figura 2).

A área intersticial é formada por fibras de tecido conjuntivo, fibroblastos e capilares sanguíneos e muitas células de Leydig, as quais estão uniformemente distribuídas em espaços angulares delimitados pelos lóculos seminíferos. Estas células apresentam forma ligeiramente alongada ou ovalada com o núcleo bem evidente e o citoplasma é muito reduzido (Figura 3).

Na análise da quantificação celular, houve diferença estatística entre as duas estações ($t=3,86$; $p=0,00$) (Figura 4). Em relação à área das células de Leydig também foi verificada diferenças estatísticas entre as estações analisadas ($U=1628,00$; $p=0,00$) (Figura 5).

DISCUSSÃO

Histologicamente, os testículos são constituídos por uma rede de estruturas seminíferas convolutas circundadas externamente pela túnica albugínea. Entre os elementos seminíferos está presente o tecido intersticial, com vasos sangüíneos, nervos, células de Leydig e outros elementos do tecido conjuntivo (Lofts, 1974; Romer e Parsons, 1985; Duellman e Trueb, 1994; Hildebrand, 1995).

As células de Leydig presentes nos testículos da maioria dos vertebrados têm como função a secreção de andrógenos. Estes hormônios são responsáveis pelo desenvolvimento, manutenção e regulação das características sexuais secundárias e em grande extensão pela espermatogênese (Smita *et al.*, 2005). Em *Dendropsophus minutus* as células de Leydig estão organizadas em espaços angulares, formado devido à aproximação dos lóculos seminíferos, e se encontram homoganeamente distribuídas no interstício. Estas células apresentam núcleo evidente e possui forma ligeiramente alongada ou ovalada e com citoplasma bastante reduzido; como também relatado em *Scinax fuscovarius* (Oliveira, 1996).

As gônadas de *D. minutus* apresentam coloração branco-leitosa provavelmente devido ao conteúdo espermático. Observações diferentes ocorrem em *Eupemphix nattereri* que apresenta células pigmentares presentes no interstício testicular e confere a estas colorações variando do preto intenso ao preto mesclado com branco (Oliveira e Zieri, 2005).

No parênquima testicular, as células da linhagem germinativa se agrupam com células de sustentação, ou de Sertoli, e, assim, constituem cistos espermatogênicos ou espermatocistos (Santos e Oliveira, 2008). Cada cisto agrupa células no mesmo estágio de diferenciação, estabelecendo uma

sincronia de desenvolvimento, uma característica comum dos anfíbios (Wake, 1968; Lofts, 1974; Franchi *et al.*, 1982; Ucci, 1982; Cavicchia e Moviglia, 1983; Rastogi *et al.*, 1988, Bão *et al.*, 1991; Oliveira, 1996).

De acordo com Rodrigues e Favaretto (1999) as células de Leydig estão relacionadas com a espermatogênese. Para *D. minutus* as células de Leydig são maiores e mais numerosas na estação fria e seca do que na quente e úmida, portanto, o aumento na área e quantidade na estação fria e seca pode ser um indicativo do início da produção de espermatozóides; já que de acordo com Santos e Oliveira (2008) nos meses de maio, junho e julho há um aumento de células em estágio inicial de desenvolvimento. Quando inicia a época reprodutiva (de outubro a março), há um aumento de espermatozóides (Santos e Oliveira, 2008) e uma diminuição das células de Leydig, o que sugere que o conteúdo produzido por estas células podem ter sido utilizados no processo da espermatogênese. Este fato é reforçado Minucci *et al.* (1990) quando trabalhou com *Rana esculenta* e verificou a existência de comunicações celulares entre as células de Leydig e o compartimento germinal.

Segundo Sasso-Cerri *et al.* (2004) a manutenção do peso testicular em anfíbios que apresentam ciclo reprodutivo contínuo pode ser estar relacionada com mudanças compensatórias no volume e densidade dos componentes testiculares durante o ano. *Dendropsophus minutus* não apresenta variação do peso e comprimento testicular ao longo do ciclo reprodutivo e também apresenta ciclo reprodutivo contínuo (Santos, 2006), portanto as variações ocorridas na quantidade de células de Leydig e espermatozóides devem ser de forma compensatória ao ponto de não ocorrer mudanças nas estruturas anatômicas e, ainda, podemos sugerir que dados da biometria das gônadas

não podem ser utilizados como parâmetros conclusivos para estudar a “condição reprodutiva” de anuros de regiões tropicais corroborando com os dados encontrados por Santos (2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- Não há alterações no peso e comprimento dos animais e dos testículos durante o ciclo reprodutivo.
- Não foram detectadas variações biométricas significativas entre o testículo direito e esquerdo das espécies e nem variações no IGS.
- O peso do fígado, estômago, intestino e os corpos adiposos quando analisados separadamente não apresentam variações durante o ciclo reprodutivo.
- O peso de *Dendropsophus minutus* está associado à pluviosidade e umidade relativa do ar.
- O peso do fígado de *Dendropsophus minutus* está associado à pluviosidade, umidade relativa do ar e fotoperíodo.
- O tamanho dos testículos de *Dendropsophus minutus* e o peso corporal de *D. nanus* apresentam-se correlacionados à umidade relativa do ar e fotoperíodo.
- O comprimento de *D. minutus* e *D. nanus* está inversamente correlacionado com a temperatura do ar.
- O peso dos testículos, do estômago/intestino de *D. nanus* estão correlacionados ao fotoperíodo.
- Ambas as espécies sofrem influência dos fatores ambientais. Para *D. minutus* as células de Leydig são maiores e mais numerosas na estação fria e seca do que na quente e úmida.

REFERÊNCIAS

- BÁO, S. N., DALTON, G. C., OLIVEIRA, S. F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. **J. Morphol.**, 207 (3): 303-314.
- CAVICCHIA, J. C., MOVIGLIA, G. A. 1983. The blood-testis barrier in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): a freeze-fracture and lanthanum tracer study. **Anat. Rec.**, 205(4): 387-396.
- DELGADO, M. J., GUTIÉRREZ, P.; ALONSO-BEDATE, M. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezii*. **General and Comparative Endocrinology** 73(1): 1-11.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. 1986. **Biology of amphibians**. Mc Graw-Hill Brook Co., 670p.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. 1994. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p.
- DUVALL, D. L. J., GUILLETTE J., JONES, R. E. 1982. Environmental control of reptilian cycles. **Biology of the Reptilia.**, 12: 201-231.
- EMERSON, S. B. 1997. Testis size variation in frogs: testing the alternatives. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, 41: 227-235
- FRANCHI, E., CAMATINI, M., DE CURTIS, I. 1982. Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. **J. Ultrastruct. Res.**, 80: 253-263.
- GOIN, C. J., GOIN, O. B. 1962. **Introduction to herpetology**. San Francisco: W. H. Freeman, 341p.

- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 700p.
- HOPWOOD D. 1990. **Fixation e fixatives**. In: Bancroft JD, Stevens A (eds) **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone, New York, pp 21-42
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 1999. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 427p.
- LOFTS, B. 1974. **Reproduction. Physiology of the amphibia**. New York: Academic Press, 2: 107-218.
- MINUCCI, S., FASANO, S., DI MATTEO, L. CHIEFFI-BACCARI, G. PIERANTONI, R. 1999. Morphological and hormonal changes in the frog, *Rana esculenta*, testis after administration of ethane dimethane sulphonate. **Gen Comp Endocrinol**, 79: 335-345.
- MORI, H., CHRISTENSEN, K. 1980. Morphometric Analysis of Leydig Cells in the normal rat testis. **The Journal of cell Biology**, 84: 340-354.
- OLIVEIRA, C. 1996. **Estudo morfológico do testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado, 131p.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C. A. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**, Porto Alegre, 6(1): 79-88.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22(2): 454-460.

- RASTOGI, R. K., BAGNARA, J. T., IELA, L., KRASOVICH, M. A. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **J. Morphol.**, 197(3): 277-302.
- RODRIGUES J. A., FAVARETTO A. L. V. 1999. Sistema Reprodutor. Cap. 73, 868-891 pp. In: Fisiologia. Aires, MM. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- ROMER, A.S., PARSONS, T.S. (1985). **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 559p.
- SANTOS, L. R. S. 2006. **Ciclo reprodutivo masculino de *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-Unesp.
- SANTOS, L. R. S., OLIVEIRA, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 24(1): 64-70.
- SANTOS, L.R.S., OLIVEIRA, C. 2008. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Micron** DOI 10.1016/j.micron.2008.03.006
- SASSO-CERRI, E; FARIA, F. P.; FREYMÜLLER, E.; MIRAGLIA, S. M. 2004. Testicular morphological changes during the sazonal reproductive cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Zoology**. 301A: 249-260.
- SMITA, M.; BEYO, R. S.; OOMMEN, O. V.; GEORGE, J. M.; AKBARSHA, M. A. 2005. Sesonal variation in spermatogenic and androgenic activities in a caecilian testis (*Ichthyophis tricolor*). **J. Zool. Lond**, 267:45-53.

UCCI, A. A. 1982. A fine-structural study of interstitial cell changes in the testes of *Necturus maculosus* during a portion of the annual cycle, and possible evidence for local feedback control by seminiferous epithelium. **Amer. J. Anat.**, 65(1): 27-38.

ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.

WAKE, M. H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. the gonads and the fat bodies. **J. Morph.**, 126(3): 291-331.

FIGURAS

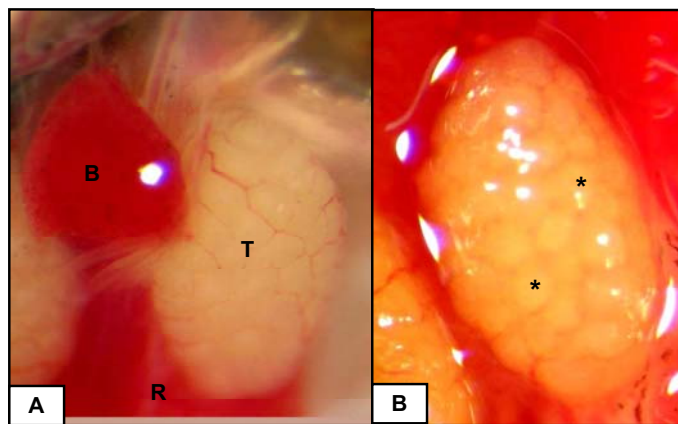


Figura 1: Forma, coloração dos testículos de *Dendropsophus minutus*. A = B – baço, T – testículo, R – rim; B = * detalhe mesoscópico de um lóculo seminífero. Aumento 37,5x

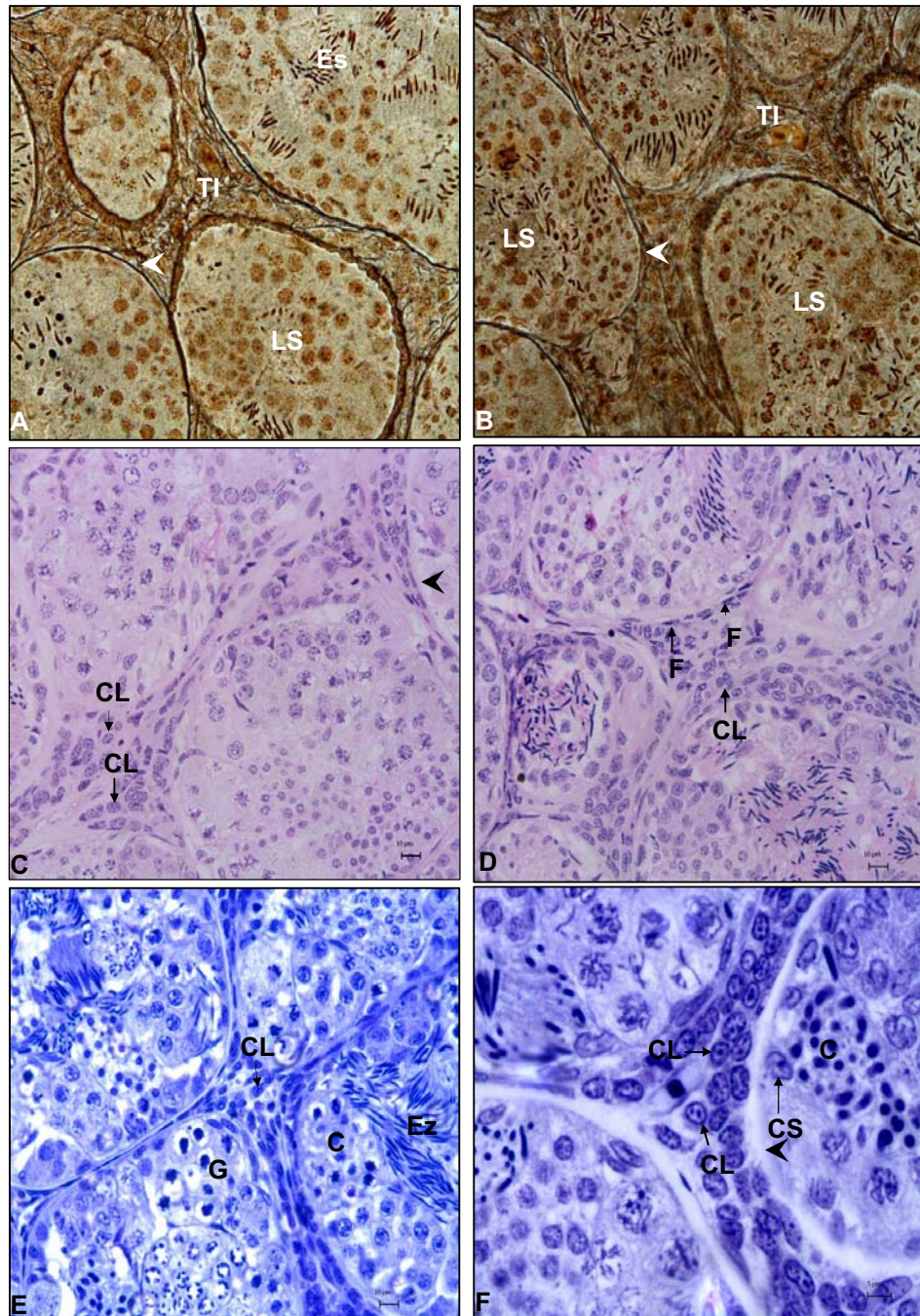


Figura 2: Aspecto geral da arquitetura histológica testicular de *Dendropsophus minutus*. A e B - Reticulina de Gömöri, 400x; C e D - Hematoxilina/eosina, 400x; E e F -Azul de Toluidina com bórax, 400x e 1000x. TI - tecido intersticial; LS - lóculo seminífero; CL - célula de Leydig; CS - célula de Sertoli; F - fibroblasto; G - espermatogônia; C - espermatócitos em diferenciação; Es - espermátides finais; Ez - espermatozóides; cabeça da seta - parede locular.

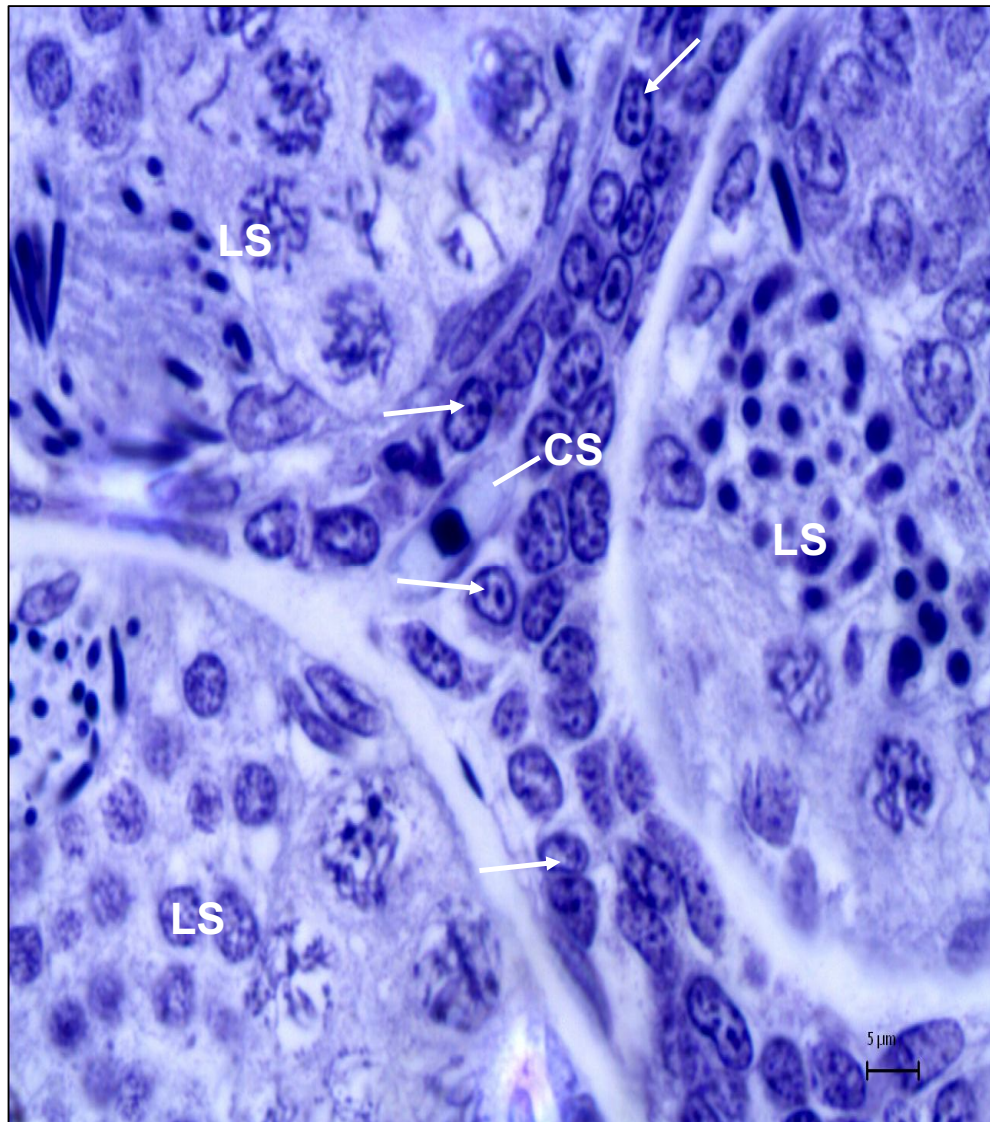


Figura 3: Distribuição das células de Leydig no interstício testicular. Note que as células de Leydig estão localizadas em espaços angulares formado pela aproximação dos lóculos seminíferos. Estas células apresentam núcleo evidente e possui forma ligeiramente alongada ou ovalada e o citoplasma reduzido. LS: lóculo seminífero; Seta: célula de Leydig; CS: capilar sanguíneo, aumento 1000X, Azul de Toluidina.

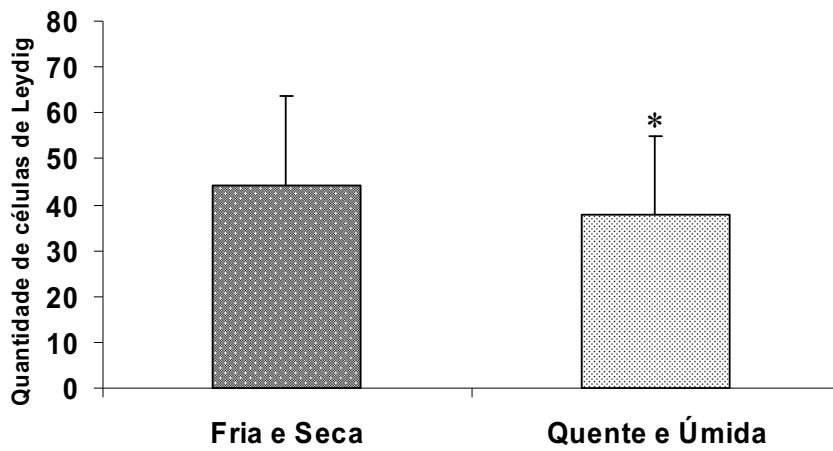


Figura 4: Média (\pm erro padrão=10) da quantidade de células de Leydig, quando comparada entre as estações. Diferença estatística (*), (Teste *t Student*: $t=3,86$; $p=0,00$).

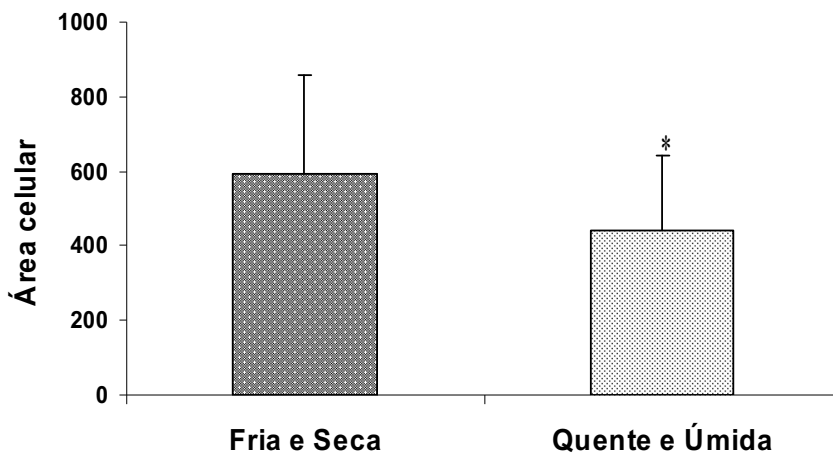


Figura 5: Média (\pm erro padrão=5) da área das células de Leydig, quando comparada entre as estações. Diferença estatística (*), (Teste Mann-Whitney: $U=1628,00$; $p=0,00$).

