



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Ciclo Reprodutivo de Machos de *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae)

Lia Raquel de Souza Santos



MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

2006

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LIA RAQUEL DE SOUZA SANTOS

**Ciclo Reprodutivo de Machos de *Dendropsophus minutus*
(Anura, Hylidae)**

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.

Data da Defesa: 24/02/2006

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Classius de Oliveira
(Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Simões Leite Vilamaior

Assinatura

Suplentes:

Prof. Dr. Alan Peres Ferraz de Mello

Assinatura

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Assinatura

ÍNDICE

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
I - INTRODUÇÃO.....	05
I.1 - Panorama geral dos anfíbios.....	05
I.2 - A família Hylidae.....	06
I.3 - A espécie.....	08
I.4 - Aparelho reprodutor masculino.....	09
I.5 - Fatores ambientais x Anfíbios anuros.....	10
I.6 - Justificativa do trabalho.....	13
II - OBJETIVOS.....	14
II.1 - Geral.....	14
II.2 - Específico.....	14
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	15
III.1 - Análise das variáveis biométricas, morfométricas e climáticas.....	15
III.1.1 - Local de coleta.....	15
III.1.2 - Delineamento experimental.....	18
III.2 - Análise da população celular.....	22
III.3 - Dados climáticos.....	23
III.4 - Análise dos dados.....	23
III.4.1 - Análise das variáveis biométricas, morfométricas e climáticas.....	23
III.4.2 - Análise da população celular.....	24

III.5 – Comitê de Ética.....	25
IV - RESULTADOS.....	26
V - DISCUSSÃO.....	31
V.1 - Aspectos morfofuncionais.....	31
V.2 - Aspectos morfológicos.....	32
V.3 - Considerações do ciclo reprodutivo e gônadas.....	37
V.4 - Considerações do ciclo reprodutivo e corpos adiposos.....	42
V.5 - Considerações do ciclo reprodutivo e células germinativas.....	44
V.6 - Síntese da discussão.....	49
VI - CONCLUSÕES.....	52
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
VIII - FIGURAS.....	63

O tempo amadurece todas as coisas.

Nenhum homem nasce sábio!

(autor desconhecido)

Pai e Mãe

*É com grande satisfação que dedico este trabalho a vocês, que souberam me dar com
dignidade a maior de todas as heranças: o estudo.*

É com muito amor e carinho que agradeço de coração por mais esta oportunidade!!!

Agradecimentos

Um dos momentos mais difícil é este, agradecer sem esquecer de alguém. Agradeço à todas àquelas pessoas que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, da minha formação profissional e pessoal. Mas fica aqui alguns nomes especiais que, sem dúvidas foram peças fundamentais neste meu percurso.

- *Ao professor **Dr. Classius de Oliveira**, meu orientador e amigo. Agradeço pela oportunidade de tornar um sonho.....realidade, embasada em uma orientação profissional e ética; pelos ensinamentos passados e por ter acreditado. Muito obrigada!*
- *Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal** que contribuíram para minha formação profissional, sempre dispostos a solucionar dúvidas que surgiram durante o curso de mestrado.*
- *Aos professores **Dr. Sebastião Roberto Taboga e Dra. Lílian Casatti**, pelas sugestões no exame de qualificação.*
- *As amigas que ganhei durante a Pós-Graduação; amigos, sempre dispostos a ajudar.....obrigada pelo companheirismo! Aos amigos da turma de 2004: **Fernando R. de Carvalho, Pétersson R. Demite, Flávio L. Tatsumi, Valéria Ap. David, Paulo B. F. Filho, Cristiane P. Ferreira, Ana L. Ferrarezi, Sabrina S. Rochel, Vitor H. M. do Prado, Conceição Lizidactis, Mário P. Scatena** e em especial, **Francine Z. de Mendonça**, mais que uma amiga.....uma irmã, que sempre esteve ao meu lado.*
- *Agradeço também aos amigos egressos da Pós-Graduação e aos amigos que me ajudaram nas coletas em campo, em especial: **Fausto Nomura, Rodrigo D. Daud, Rita L. Peruquetti, Thais B. Carvalho, Carlos E. Conte, Rodrigo Zieri, Rinneu E. Borges, Paula M. Omena.***

- *A todos os amigos de laboratório: **Lílian F. Belussi, Thaise Y. M. Massura, Ana Claudia Gavioli, Silvia Pagliarini, Carlos E. S. Zago**, em especial o Zí (**Msc. Rodrigo Zieri**) e a profa. **Dra. Adelina Ferreira**, pelos ensinamentos passados durante os procedimentos práticos.*
- *A **Msc. Thaís Billalba Carvalho** pela incansável ajuda nas análises estatísticas.....valeu!*
- *Ao **Laboratório de Microscopia e Microanálise** da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José de Rio Preto.*
- *Aos meus pais, **Maria e Carlos**, e as minhas irmãs, **Elisangela e Vânia**..... por compreender minha ausência que nos tiraram momentos de vivência em família.*
- *A família **Zanini Martins**, em especial, **Carlos Henrique**, meu namorado que abriu mãos de horas de nosso convívio para que eu alcançasse meus objetivos.*
- *Ao Sr. **Ilário Júnior**, proprietário do Sítio Santa Luzia, por permitir a realização deste trabalho em sua propriedade, tornando disponível os locais de coleta.*
- *Em especial fica aqui minha imensa gratidão a todas as pessoas que me ajudaram nas coletas em campo. Muito obrigada!*
- *A todas as pessoas que não aqui não foram citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*
- *A **Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada – CATI**, de São José do Rio Preto.*

- *A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processo n°. 02/08016-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo auxílio financeiro destinado ao trabalho.*
- *A Deus por tudo!*

Resumo

Em ambientes sazonais, mudanças climáticas geralmente influenciam na reprodução da maioria das espécies de anfíbios, onde fatores abióticos, como temperatura e pluviosidade, podem estar diretamente relacionados com as diferentes estratégias reprodutivas das espécies. Para anuros, há muitos trabalhos relatando o comportamento reprodutivo, mas poucos foram desenvolvidos para descrever o ciclo reprodutivo com ênfase na análise morfológica testicular das gônadas. Neste estudo, objetivou-se descrever o ciclo reprodutivo anual do macho de *Dendropsophus minutus* (= *Hyla minuta*), com base em análises biométricas do animal, das gônadas e dos corpos adiposos; e análises morfométricas (diâmetro dos lóculos seminíferos, volume ocupado pelas células germinativas e quantidade de espermatozóides), verificando assim, se há alguma variação estrutural referente à reprodução relacionado às condições climáticas. Também é realizado um estudo descritivo (anatomia, histologia e espermatogênese). Os animais foram coletados mensalmente (n=5) entre abril de 2004 a março de 2005 (com exceção de agosto e setembro de 2004), e os registros das análises biométricas e morfométricas foram correlacionados entre si e com as condições climáticas do ano. Foi realizada uma análise da população celular para verificar a dinâmica destas células ao longo do ciclo reprodutivo. Foram adotados os métodos convencionais para a microscopia de luz e também utilizadas análises estatísticas apropriadas para interpretação e objetividade dos resultados. Houve relação parcial entre os parâmetros morfométricos e biométricos analisados, bem quanto relação destes às variáveis climáticas (temperatura, pluviosidade e fotoperíodo). *Dendropsophus minutus* são animais pequenos, apresentam testículos com coloração esbranquiçada e forma ovalada. Os testículos são formados por unidades esféricas, denominados lóculos seminíferos, os quais abrigam as células da linhagem germinativa. Diferentes tipos celulares (espermatogônias,

espermatócitos, espermatídes e espermatozóides) foram descritos e encontrados em maior ou menor frequência nos lóculos seminíferos, caracterizando uma gametogênese do tipo contínua. A análise da população celular indica que há um período preferencial para a reprodução, no qual houve um aumento significativo do volume ocupado pelas espermatídes e espermatozóides, dentro de um lóculo seminífero, além de verificar uma quantidade significativa de espermatozóides na mesma época. Machos de *Dendropsophus minutus* apresenta um pico máximo de atividade reprodutiva de outubro a março com um subsequente período pós-reprodutivo observado em uma apreciável diminuição na quantidade média das células germinativas em estágio final de desenvolvimento. Tanto anatomica quanto histologicamente (diâmetro e a área locular) não há mudança na estrutura do quadro testicular ao longo do ciclo reprodutivo.

Abstract

In seasonal environments, climatic changes usually influence in the reproduction of most of the species of amphibians, where abiotic factor, such as temperature and rainfall, may be directly related to the different reproductive strategies of the species. For anurans, there are many studies about the reproductive behavior, but only a few were developed to describe the reproductive cycle with emphasis on the testicular morphologic analysis of the gonads. In this study, it was aimed to describe the male's annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (= *Hyla minuta*), based in biometric analysis of the animal, of the gonads and of the fatty bodies; and based on morphometric analysis (diameter of the seminiferous locules, volume occupied by the germ cells and spermatozoid amount), thus verifying if there is any structural variation referent to the reproduction related to the climatic conditions. Also a descriptive study is accomplished (anatomy, histology and spermatogenesis). The animals were collected monthly (n=5), from april, 2004 to march 2005 (except 2004 august and september), and the registrations of the biometric and morphometric analysis were correlated among themselves and to the climatic conditions of the year. An analysis of the cellular population was accomplished to verify the dynamics of these cells along the reproductive cycle. Conventional methods for light microscopy were used and also appropriate statistical analysis for the interpretation and objectivity of the results. There was partial relationship among the biometric and morphometric parameters analysed, as well as a relationship of these with the climatic variables (temperature, rainfall and photoperiod). *Dendropsophus minutus* are small animal that present testicles with whitish coloration and oval form. The testicles are formed by spherical units, denominated seminiferous locules, which shelter the cells of the germinative lineage. Different cellular types (spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozooids) were described and found in

larger or smaller frequency in the seminiferous locules, characterizing a continuous type gametogenesis. The analysis of the cellular population indicates that there is a preferential period for the reproduction, in which there was a significant increase of the volume occupied the espermatids and spermatozoids, inside of a seminiferous locules, besides verifying a significant amount of spermatozoids in the same period. Males of *Dendropsophus minutus* present a maximum pick of reproductive activity from october to march, with a subsequent post-reproductive period observed in an appreciable decrease in the medium amount of the germinative cells in final stage of development. Both anatomically and histologically (diameter and the locular area) there is no change in the structure of the testicular picture along the reproductive cycle.

I – Introdução

I.1 - Panorama geral dos anfíbios

A classe Amphibia (Linnaeus, 1758) foi o primeiro grupo de vertebrados a conquistar o ambiente terrestre, há cerca de 350-400 milhões de anos, no período Devoniano e está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Linzey, 2001; Pough *et al.*, 2003). As subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as pioneiras sobre a face da Terra, tendo se extinguido após 200 milhões de anos. Os Amphibia ainda existentes, ou Lissamphibia apareceram no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 150 milhões de anos (Linzey, 2001).

Atualmente são conhecidos três grupos de anfíbios: as salamandras (Caudata), com 502 espécies, amplamente distribuídas, principalmente no hemisfério norte; as cobras-cegas (Gymnophiona), com 165 espécies, caracterizadas pela ausência de membros; e os anuros (Anura), com 4.873 espécies, conhecidas como sapos, rãs e pererecas, que constituem o principal grupo de anfíbios encontrados no Brasil (Bastos *et al.*, 2003).

A fauna de anfíbios da América do Sul é a mais rica do planeta, com aproximadamente 1.740 espécies distribuídas por 140 gêneros e 16 famílias (Duellman, 1999). No Brasil, atualmente são conhecidas 600 espécies de anfíbios (Lewinsohn e Prado, 2004), sendo o país que possui a maior diversidade; 60% destas espécies são endêmicas, ou seja, ocorrem única e exclusivamente no Brasil (Feio *et al.*, 1998).

A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possui os membros posteriores modificados para o salto (Orr, 1986). Ocorre em todos os continentes, com exceção da Antártica, com a proporção de 77% das suas famílias com centro de

distribuição tropical, 14% em áreas subtropicais do hemisfério norte e 9% distribuídas pelo restante do globo (Pough *et al.*, 1999). Os anfíbios anuros apresentam ampla distribuição geográfica, porém, nas florestas tropicais é que encontramos a maior diversidade de espécies. Possuem diferentes hábitos, ocupam ambientes diversificados e somente não habitam regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas (Duellman e Trueb, 1994). A estabilidade climática e da vegetação, a grande complexidade do meio e a grande quantidade de precipitações são fatores que fazem das florestas equatoriais e subtropicais ambientes favoráveis ao desenvolvimento de maior número de espécies.

Em geral, os anuros possuem deslocamento reduzido afastando-se a pequenas distâncias do local onde nasceram. Isto aliado a grande diversidade climática e fitofisionômicas, é que permite a ocorrência de grande número de endemismo. De outra parte, o fator de grande potencial adaptativo aliado a outros fatores, alguns anuros acabaram por se distribuir por quase todo o Brasil, como é o caso de *Dendropsophus minutus*, que pertence à família Hylidae.

I.2 - A Família Hylidae

A família Hylidae é constituída por aproximadamente 870 espécies, agrupadas em três subfamílias: Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hylinae; com ampla distribuição nas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia (Faivovich *et al.*, 2005). Está representada por uma grande variedade de espécies, alcançando nas regiões neotropicais um maior grau de diferenciação, como ocorre no Brasil (Almeida, 1984). Possuem discos bem desenvolvidos nas pontas dos dedos indicando que o principal modo de locomoção é trepar por adesão e fricção. São

extremamente variáveis em tamanho (de 1,7 a 14,0 cm) e na aparência externa (Rossa-Feres, 1982).

Recentemente, o trabalho de Faivovich *et al.* (2005), traz uma revisão sistemática da família Hylidae com base em uma revisão taxonômica e análise filogenética baseada em dados moleculares. Segundo Faivovich e colaboradores, uma atenção especial foi dada à subfamília Hylinae para a qual avaliaram o monofiletismo dos táxons atualmente reconhecidos e examinaram as bases do arranjo taxonômico aceito no presente. A análise filogenética inclui aproximadamente 5100 pares de bases de 4 genes mitocondriais e cinco genes nucleares, além de um pequeno conjunto de dados sobre a musculatura do pé. Faivovich *et al.* (2005), diz ainda que em suas análises Hylinae é composta por quatro grandes clados. O primeiro deles inclui todas as rãs gladiadoras, as espécies andinas de *Hyla* que se reproduzem em riachos e um clado dos *Tepuis*. O segundo grande clado é composto por *Scinax*, *Sphaenorhynchus*, “*Pseudídeos*”, *Scarthyla* e as espécies de *Hyla* com 30 cromossomos. O terceiro grande clado é composto por *Phrynohyas*, *Nyctimantis* e todas as seguintes pererecas-de-capacete da América do Sul e Índias Ocidentais: *Argenteohyla*, *Aparasphenodon*, *Corythomantis*, *Osteocephalus*, *Osteopilus*, *Tepuihyla* e *Trachycephalus*. O quarto e último grande clado é composto pela maioria dos grupos de espécies de *Hyla* centro-americanos/holárticos e pelos gêneros *Acris*, *Anotheca*, *Duellmanohyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptychohyla*, *Pternohyla*, *Smilisca* e *Tripion*. Assim, estes autores apresentaram uma nova proposta monofilética espelhando estes resultados, onde Hylinae é dividida em quatro tribos, e o monofiletismo desta família é apoiado através de duas sinapomorfias. Das espécies correntemente incluídas em *Hyla*, 297 de 353 são alocadas em 15 gêneros, dos quais quatro são correntemente reconhecidos, quatro são nomes revalidados e sete são novas descrições. O gênero *Hyla* fica restrito aos grupos de *H. arborea*, *H. cinerea*, *H.*

eximia, *H. femoralis* e *H. versicolor*. *Phrynohyas* é sinonimizada a *Trachycephalus*; *Pternohyla* é sinonimizada a *Smilisca* e *Duellmanohyla* é sinonimizada a *Ptychohyla*. O gênero *Dendropsophus* é revalidado para as espécies de *Hyla* com ou presumivelmente tendo 30 cromossomos.

Somente as espécies do grupo de *Hyla microcephala* foram inicialmente relatadas a ter 30 cromossomos (Duellman e Cole, 1965; Duellman, 1967 *apud* Faivovich *et al.*, 2005). Entretanto, como as espécies de outros grupos também foram relatadas a ter 30 cromossomos (Duellman, 1970; Bogart, 1973 *apud* Faivovich., *et al.*, 2005) torna-se evidente que esta foi uma característica de muitos grupos de espécies. Atualmente, acredita-se que os grupos de *H. columbiana*, *H. decipiens*, *H. garagoensis*, *H. labialis*, *H. leucophyllata*, *H. marmorata*, *H. microcephala*, *H. minima*, *H. minuta*, *H. parviceps* e *H. ribicundula*, mais várias espécies não catalogadas podem formar um grupo monofilético que apóia este caracter.

I.3 - A espécie

O grupo *Hyla minuta* foi primeiro definido por Cochran (1955) *apud* Faivovich *et al.* (2005); e o estado de caracter utilizado por este autor para distinguir este grupo, foi a superfície anterior e posterior imaculadas da coxa, um estado de caráter que também é compartilhado por diversas *Hyla* com 30 cromossomos. Desta forma, por *Hyla minuta*, apresentar estas características, esta espécie foi renomeada à *Dendropsophus minutus*.

Dendropsophus minutus (= *Hyla minuta*) foi descrita por Peters em 1872 de Nova Friburgo (RJ). É uma espécie muito comum, com 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). Apresenta grande variação no padrão do desenho dorsal e muitos autores já as descreveram como sendo espécies distintas devido a essa variação (Jim, 1980). A sua ampla distribuição, a presença em locais já perturbados pelo homem, bem como a ocorrência em grande quantidade durante o ano todo em algumas regiões (Cardoso, 1981), favorecem estudos com esta espécie. Por ser uma espécie pequena os machos utilizam como sítios de vocalização para atraírem fêmeas, ramos ou talos de vegetação e pequenas plantas aquáticas que emergem de charcos e lagoas, e como estes animais não são exigentes, reproduzem-se em corpos d'água sem correnteza (Haddad, 1987); sendo, portanto considerada uma espécie com ampla plasticidade na ocupação de microhábitats (Giovanelli, 2004). A maioria das espécies é de atividade noturna e iniciam a atividade de vocalização próximo ao horário do pôr do sol e segundo Giovanelli (2004), três horas após o pôr do sol, ocorre o pico de suas vocalizações em termos de machos ativos. Esse anuro apresenta vocalizações de alta intensidade, que facilitam a sua localização (Cardoso e Haddad, 1984).

I.4 - O aparelho reprodutor

O sistema urogenital dos anfíbios é constituído por órgãos sexuais primários, as gônadas, e órgãos acessórios, incluindo ductos e outras estruturas. Nos anfíbios anuros, os testículos são estruturas pares, arredondados, compactos e de coloração geralmente amarelada (Goin e Goin, 1962), estes normalmente são mais lisos, firmes e menores que os ovários na mesma espécie e, entre os dois membros do par, não é rara a ocorrência de assimetria de tamanho e posição (Hildebrand, 1995).

Devido à transparência da túnica albugínea (cápsula de tecido conjuntivo que reveste externamente os testículos), pode-se observar que os testículos são constituídos por unidades aproximadamente esféricas de coloração geralmente esbranquiçada e que alojam as células da linhagem germinativa, sendo denominados lóculos seminíferos (Oliveira, 1996).

No epitélio germinativo, as células da linhagem germinativa se agrupam com células de sustentação, ou de Sertoli, e assim constituem cistos espermatogênicos ou espermatocistos. 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; Báó *et al.*, 1991; Oliveira, 1996). É interessante ressaltar que embora o padrão de coloração citado acima ocorra na maioria das espécies, *Physalaemus cuvieri* e *Eupemphix nattereri* (= *Physalaemus nattereri*) (Leptodactylidae), apresentam uma pigmentação conspícua no testículo conferindo uma coloração escura. Esta tonalidade de cor é devida à presença de células que contêm intensa pigmentação em seu citoplasma, com função ainda desconhecida, e que são denominadas melanócitos (Oliveira e Zieri, 2005).

Na margem anterior dos testículos estão presentes os corpos adiposos abdominais, de coloração geralmente amarelada e com muitos prolongamentos delgados. Estes corpos adiposos são estruturas ricas em colesterol e triglicerídeos, servindo como uma reserva nutricional para as gônadas (Brown, 1964; Fitzpatrick, 1976); e constituem uma característica estrutural comum a todos os anfíbios (Duellman e Trueb, 1994). Geralmente, os corpos adiposos e os próprios testículos apresentam pronunciadas diferenças de tamanho no decorrer do ciclo reprodutivo (Goin e Goin, 1962).

Ao contrário das espécies pertencentes às regiões temperadas, poucos trabalhos foram desenvolvidos para descrever as características morfológicas dos testículos de anuros de regiões neotropicais.

I.5 - Fatores ambientais x Anfíbios anuros

O sucesso da dispersão dos vertebrados tem dependido da adaptação de seus ciclos reprodutivos ao ambiente no qual eles estão envolvidos. Dentre todos os ambientes habitáveis com alguns graus de flutuação, a adaptação nestes ambientes requer alguns controles necessários do ciclo reprodutivo para produzir descendência em um período no ano em que a maioria da prole tenha maiores chances de sobrevivência. Tal controle dos ciclos reprodutivos requer que os organismos sejam capazes de perceber mudanças no ambiente e assim modificar sua fisiologia de acordo com as condições necessárias, e isto é realizado através de modulação do sistema neuroendócrino (Callard *et al.*, 1978).

A atividade reprodutiva de anuros em ambientes sazonais está geralmente associada ao período de umidade em países de clima tropical (Hoogmoed e Gorzula, 1979; Aichinger, 1987), onde processos ecológicos anuais, como chuva e/ou seca, são vitais para assegurar a reprodução da maioria das espécies. No período chuvoso a maior parte das espécies iniciam suas atividades reprodutivas, o que facilita o reconhecimento das espécies pelo registro de suas vocalizações e formações de agregações reprodutivas. Para anfíbios que apresentam estreita dependência de água livre no ambiente; a maior disponibilidade de corpos d'água permanentes e a periódica transformação de extensões de biótopos aquáticos possibilitam o estabelecimento de populações vigorosas durante a estação chuvosa (Alho *et al.*, 2002). Entretanto, durante décadas o declínio de

anfíbios tem surgido como um exemplo de crise de biodiversidade global. Muitas hipóteses foram propostas para tentar explicar o declínio de anfíbios: destruição de hábitat, pesticidas carregados pelo vento, aumento da radiação UV-B, introdução de predadores exóticos e doenças (Davidson *et al.*, 2002). Modificações ambientais resultantes de práticas inadequadas de agricultura e pecuária extensiva são consideradas também importantes fatores (Strussman *et al.*, 2000).

Mudanças ambientais relativamente pequenas podem substancialmente modificar o desempenho reprodutivo. Tais mudanças interferem na espermatogênese e estabelecem ciclos contínuos ou descontínuos (Huang *et al.*, 1997). Blaustein *et al.* (2002), relatam ainda que estas mudanças afetando a reprodução, certamente afetam a estrutura de uma comunidade.

Alguns fatores como o vento e possivelmente a pressão atmosférica, embora oscilem durante o ano, são mais importantes no comportamento dos anuros com relação ao seu posicionamento no hábitat. Estes não interferem de modo intenso na abundância e frequência da maioria dos anfíbios anuros durante sua época ativa. As condições físicas do ambiente que mais interferem na determinação dos períodos favoráveis de ocorrência dos anuros são a temperatura do ar e a umidade relativa estreitamente relacionada ao índice pluviométrico. O aumento da temperatura, concomitantemente com o aumento da precipitação pluvial, aumenta a ocorrência da maioria das espécies de anfíbios anuros. Essas variáveis determinam a época favorável do ano e a duração em que se mantém ativos os anuros, isto é, determinam a distribuição estacional (Jim, 1980).

Dajoz (1973) diz que a temperatura e a umidade são dois fatores ecológicos essenciais e que muitas vezes influenciam por sua ação, os organismos. Segundo ele, a temperatura preferencial ou preferendo térmico, varia muito segundo a espécie e seu estágio de

desenvolvimento. Ainda afirma que a importância do preferendo térmico é grande e explica muitas vezes as particularidades da distribuição dos animais em seus biótopos assim como seus deslocamentos. Mais adiante, diz que a adaptação fisiológica às temperaturas extremas pode manifestar-se ainda por um intervalo dos períodos de aparecimento durante o ano e com relação a umidade, diz este autor que os anfíbios anuros são “higrófilos”, isto é, só podem viver em meios úmidos, freqüentemente saturados ou próximos da saturação.

No Brasil, os estudos sobre aspectos reprodutivos dos anuros descrevem principalmente o comportamento reprodutivo (Haddad e Sawaya, 2000; Bastos e Haddad, 2002). No entanto são poucos os estudos anatômicos com ênfase na morfologia gonadal que tentam explicar como os diversos fatores podem influenciar na sobrevivência e reprodução dos anuros. Os trabalhos de Taboga e Dolder (1991), Oliveira *et al.*, (2003) descrevem características histológicas dos testículos de alguns anuros, e poucos registros sobre os ciclos reprodutivos (alguns de Sasso-Cerri *et al.*, 2004) no Brasil, com ênfase em uma análise morfológica (Ferreira *et al.*, *in press*) foi encontrado.

Segundo Oliveira (1996), o estudo da reprodução de qualquer espécie é de fundamental importância para sua própria sobrevivência, e para se avaliar a importância do processo reprodutivo, torna-se lúcido que as características morfofuncionais, bem como a ação do meio ambiente deve ser considerada como um todo.

I 6- Justificativa do trabalho

A escassez de trabalhos sob ponto de vista morfológico relatando ciclos reprodutivos de anuros, foi um dos principais fatores que nos motivou a desenvolver esta pesquisa. Como a

reprodução é um dos imperativos para perpetuação da espécie e por estar bastante relacionada às condições ambientais, trabalhar com ciclo reprodutivo, não apenas nos mostrará se os parâmetros abióticos podem afetar a organização estrutural das gônadas e o modo reprodutivo da espécie, como também, permite verificar a época mais crítica para a espécie fornecendo subsídios para medidas de conservação.

II – Objetivos

II.1 - Geral:

O trabalho proposto descreve o ciclo reprodutivo anual dos machos de *Dendropsophus minutus* com base nos parâmetros biométricos e morfométricos (no aspecto histológico testicular) das gônadas e as relações com as circunstâncias ambientais na área de estudo. O potencial de estudos da morfologia gonadal de uma espécie, além de proporcionar uma visão ampla de como estes animais se reproduzem ao longo do ano, também permite verificar se há alguma influência climática em seu processo reprodutivo.

III.2 – Específico

- Descrever a anatomia das gônadas masculinas, através de análises biométricas;
- Descrever a organização morfológica das gônadas;
- Descrever histologicamente as células da linhagem germinativa em microscopia de luz;
- Analisar a dinâmica da população celular da linhagem germinativa através do volume de cada tipo celular;
- Caracterizar o tipo de ciclo reprodutivo da espécie.

III – Material e Métodos

III.1 – Análise das variáveis biométricas, morfométricas e climáticas

Cinquenta exemplares de *Dendropsophus minutus* (Fig. 1) foram capturados através de coletas mensais durante o período de abril de 2004 à julho de 2004 e de outubro de 2004 à março de 2005, por meio de excursões noturnas no Município de São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil.

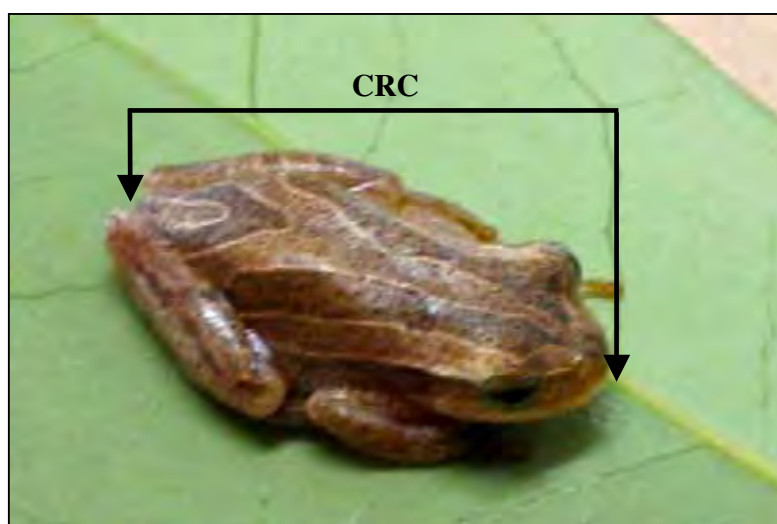


Figura 1: Machos de *Dendropsophus minutus*. Comprimento médio ($2,31 \pm 0,07$ cm).

III.1.1 – Local de coleta

A propriedade particular - Sítio Santa Luzia -, situa-se a $20^{\circ} 45' 47,5''\text{S}$ e $49^{\circ} 19' 38,8''\text{W}$, com uma elevação de 520 m de altitude. Para a caracterização ambiental, tomou-se como critério dois aspectos fundamentais, o tipo de corpo d'água quanto a persistência durante o ano e o tipo de cobertura vegetal. O local de coleta dos animais, é considerado um corpo d'água temporário

com constante troca de água (Jim, 1980) é circular (20 x 15 m), com metade da margem plana e metade barranco. É uma área de pastagem, degradada pela ação antrópica. O solo é do tipo argiloso e a vegetação é predominantemente herbácea com representantes das famílias Ciperaceae e Poligonaceae, as quais são encontradas distribuindo-se em grande parte na região marginal e dentro do corpo d'água, alcançando em torno de 30 cm até 1 metro de altura (Fig. 2).



Figura 2: Local de coleta. Sítio Santa Luzia (20°45'47,5"S e 49°19'38,8"W).

As figuras 3 e 4 ilustram respectivamente, as condições meteorológicas e a do ambiente, durante o período estudado, condições estas a que estavam sujeitos os animais. No mês de agosto houve captura apenas de 3 animais e em setembro nenhum indivíduo foi capturado, isso pode ser um indicativo das condições ambientais que de alguma forma pode promover uma pressão na aparição dos animais em campo, uma vez que de acordo com dados meteorológicos obtidos, nesses meses não houve nenhuma precipitação, acompanhada de altas temperaturas. Desta forma justifica-se a não utilização dos referidos meses nas análises estatísticas como apresentado.

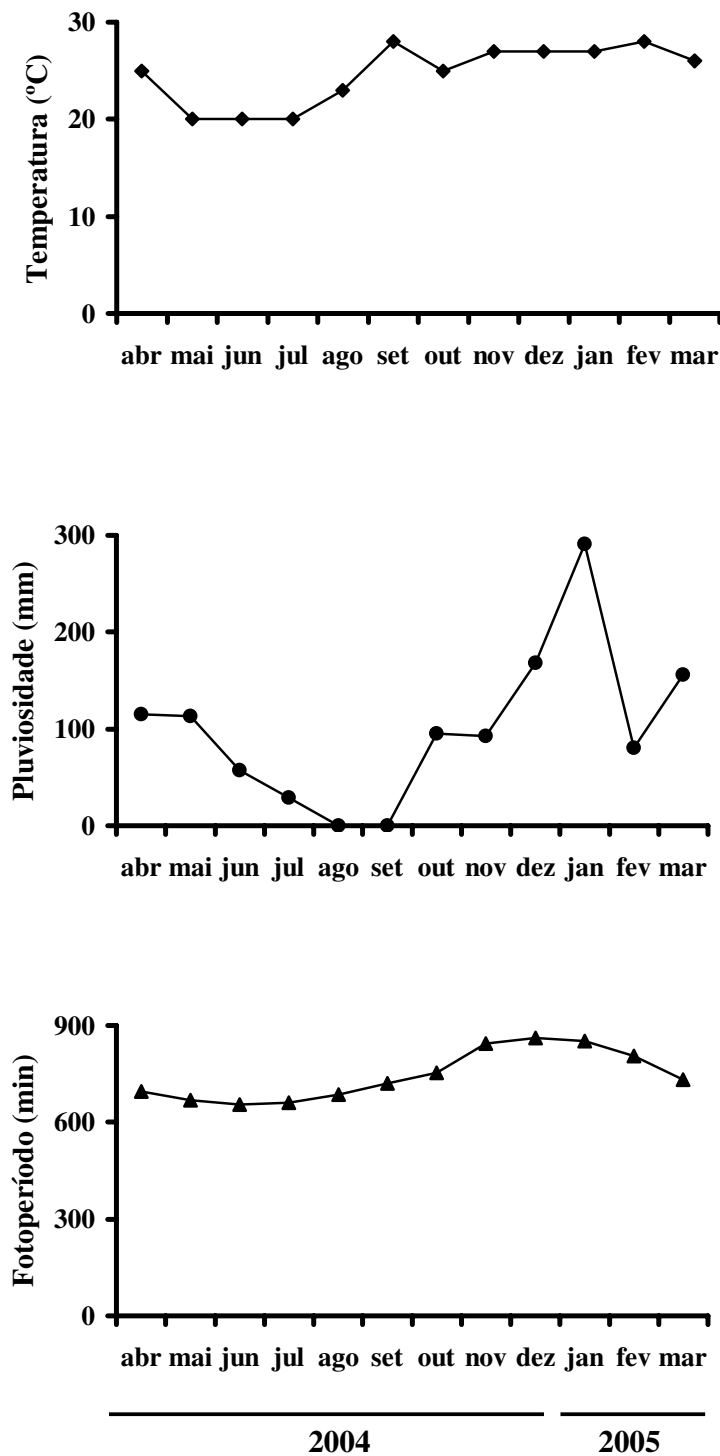


Figura 3: Temperatura média (°C), pluviosidade total (mm) e fotoperíodo (minutos) e sua distribuição ao longo do período amostrado. **Fonte:** CATI e **site:** <<http://www.apollo11.com/index.php>>

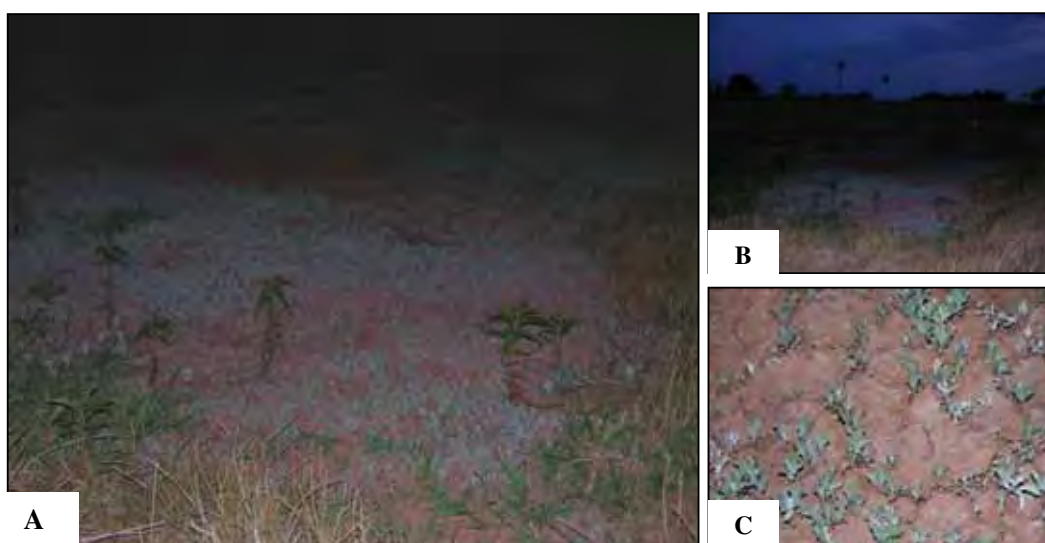


Figura 4: Local de coleta nos meses de agosto e setembro. A e B - vista geral, C – detalhe do solo no local.

III.1.2 Delineamento experimental

Os animais foram coletados mensalmente ($n=5$) em períodos regulares, acondicionados em sacos plásticos com água e vegetação do ambiente de coleta, depois transportados ao Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto-SP e mantidos vivos em terrário. No dia seguinte, os animais foram anestesiados (saturação em éter etílico) e levados a óbito por parada cardíaco-respiratória, e só então destinados às análises.

Dados de natureza biométrica do animal, como o comprimento total (cm), foram obtidos por meio da utilização de um paquímetro de metal com precisão de 0,05 mm onde mediu-se o comprimento rostro-cloacal (CRC); e o peso total (g) foi obtido através da utilização de balança analítica de precisão (0,001g).

Com uma incisão mediana ventral sua parede corporal foi rebatida e observados e descritos os órgãos reprodutores (Fig. 5) e os corpos adiposos. Os corpos adiposos foram

classificados em três categorias de acordo com o seu grau de desenvolvimento; em 1 (pouco desenvolvido), 2 (desenvolvimento médio) e 3 (muito desenvolvido), dentro da cavidade corporal de acordo com observações em análises prévias (estudos pilotos). Para esta chave de classificação, tomou-se como base o tamanho dos testículos aos quais os corpos adiposos estavam aderidos junto ao pólo cranial dos testículos. A categoria 1, compreende os corpos adiposos com tamanho relativamente menor ao da gônada associada; seus prolongamentos são finos e sua presença na cavidade abdominal é inconspícua. Na categoria 2, os corpos adiposos tem tamanho igual ou muito próximo ao da gônada, seus prolongamentos e sua presença são mais evidentes. Na categoria 3, os corpos adiposos tem tamanho muito maior ao da gônada e ocupam grande volume na cavidade abdominal (Fig. 6). O padrão de coloração bem quanto a vascularização, não foram parâmetros utilizados para esta classificação.



Figura 5: Vista ventral de *Dendropsophus minutus*. Observação dos órgãos reprodutores.

F – fígado, P – pulmão, E – estômago, T – testículo, I – intestino.

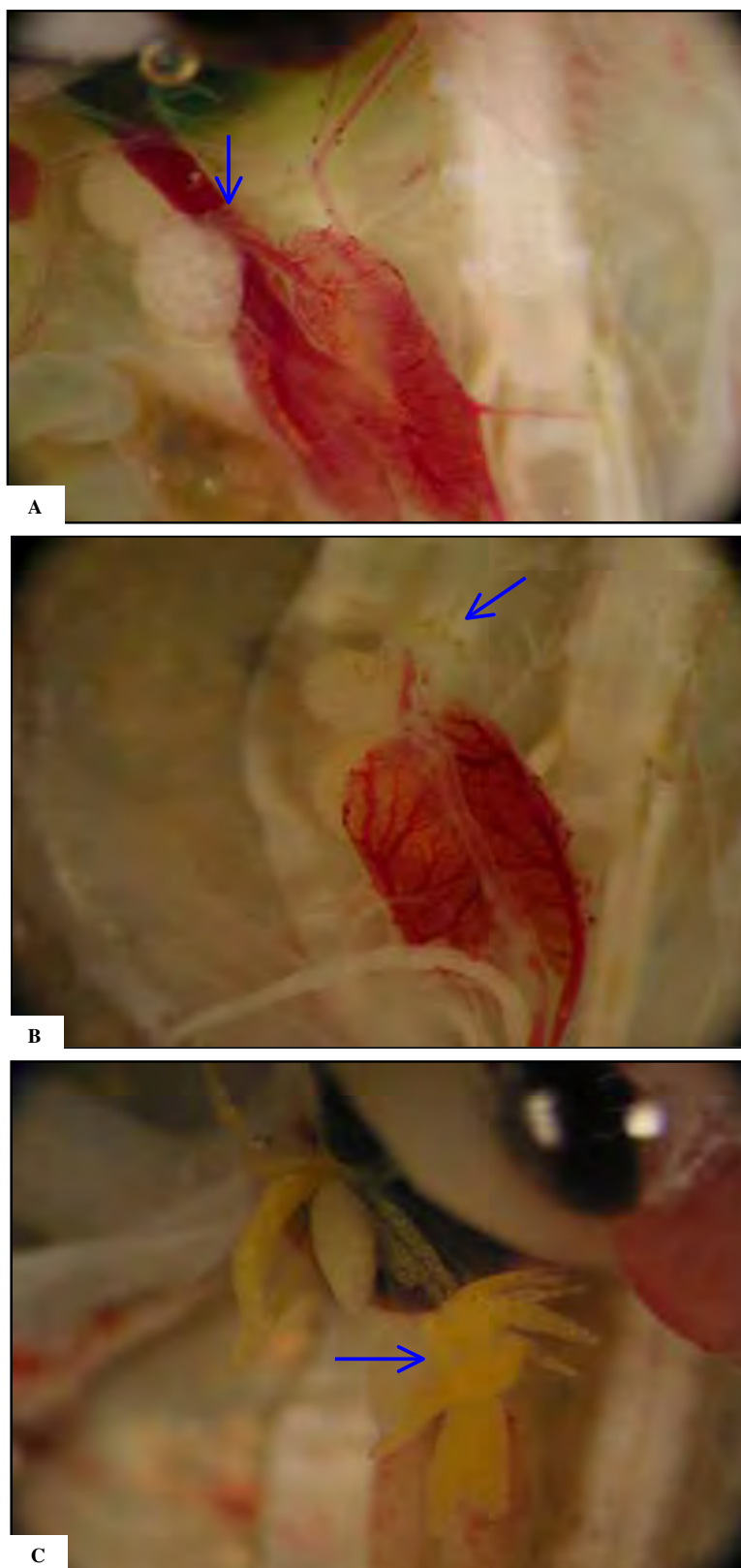


Figura 6: Classificação dos corpos adiposos. A - estágio 1 (pouco desenvolvido), B - estágio 2 (desenvolvimento médio) e C - estágio 3 (muito desenvolvido). Corpo adiposo (seta).

Com a utilização de materiais cirúrgico-oftalmológicos, os testículos foram removidos, medidos (comprimento maior - mm) com a utilização de papel milimetrado e depois pesados (g) em uma balança analítica de precisão (0,001g) (dados biométricos das gônadas). Foram fixados em solução Bouin por 24 horas e depois desidratados em série crescentes de álcool (Hopwood, 1990). Os testículos foram incluídos em resina do tipo Methacrilato glicol (Historesin Leica®) seccionados à 2,0 μm e corados com Azul de Toluidina com bórax (1:1) (Robinson e Gray, 1990). Para análise morfológica, as lâminas montadas foram observadas ao microscópio Olympus BX 60 e analisadas através do programa Image Pró-plus para análises de imagens, no centro de microscopia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto-SP, Brasil.

Dados morfométricos, tais como, o diâmetro maior de cinco lóculos seminíferos de cada animal (n=250), e contagem manual dos espermatozóides (espermatozóides livres no lume) de no mínimo duas secções diferentes, num total de cinco lóculos aleatórios de cada animal (n=250), foram então examinados. É importante esclarecer que a contagem dos tipos celulares que padronizamos como as células que se apresentam em estágio final de desenvolvimento, foram aquelas que tinham preferencialmente como característica uma distribuição aleatória no lume locular. Esta padronização é importante a fim de evitar a contagem de tipos celulares que não apresentam um estágio avançado de desenvolvimento, bem como facilitar ao pesquisador suas análises.

Os lóculos aleatorizados foram fotodocumentados e desta forma foi possível a contagem dos tipos celulares utilizando-se de caneta tinteira ponta fina. Para cada mês analisado, obteve-se uma média mensal da quantidade total das células contadas bem como a média do diâmetro locular.

III.2 – Análise da população celular

Para a análise do volume celular que cada tipo/cisto celular ocupa em um lóculo seminífero, 3 animais foram capturados a cada mês durante 10 meses (n=30). Os testículos foram removidos e fixados em solução Bouin por 24 horas segundo a metodologia de Hopwood (1990); depois emblocados em resina do tipo Methacrilato glicol (Historesin Leica®) seccionados à 2,0 μm e corados com Azul de Toluidina com bórax (1:1) (Robinson e Gray, 1990). As células germinativas analisadas foram as espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides (considerados em uma única categoria). Para a análise dos cistos celulares, um total de nove lóculos seminíferos foi aleatorizado de três animais (três lóculos/animal/mês). Destes lóculos seminíferos (n=90) foram então feitas medidas da área onde se obteve uma média. Para representar a área média, foi empregado o método do Diagrama graticulado de Weibel (1963). Este diagrama, apresenta em sua estrutura, um total de 168 pontos. A partir de uma área locular média, obtivemos o número de pontos que representava 100% (cem por cento) a área locular média; assim, 120, é o número de pontos que representa a área média de um lóculo seminífero. A partir daí, os tipos celulares foram devidamente identificados e feita a contagem dos pontos que incidia em cada tipo de cisto. Obteve-se assim uma média mensal de pontos para cada tipo celular (cisto) encontrado nos lóculos seminíferos, onde foi calculado então a porcentagem que cada tipo/cisto celular ocupa em um lóculo tomando como base os 120 pontos (que representa a área locular).

Pela matemática de regra de três simples, foi calculado a porcentagem em volume que cada tipo/cisto celular ocupa em um lóculo seminífero.

Para ambas as análises, os animais utilizados foram identificados, fixados em álcool 70% e devidamente preservados para outros estudos e como material testemunho. Os exemplares estão depositados na coleção de Anfíbios do Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP (**DZBSJRP**), sob os lotes: 8080; 8653; 8899 à 8901; 8904 à 8910; 8913 à 8915; 8919 à 8923; 8928 à 8932; 8934 à 8948; 8950 à 8954 e 8956 à 8960.

III.3 – Dados climáticos

Dados meteorológicos mensais como a temperatura do ar (°C) e pluviosidade (mm) foram conseguidos através da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - **CATI**, e o fotoperíodo obtido através do *site* <http://www.apolo11.com/index.php>, os quais foram empregados para descrever e relacionar as condições ambientais com a atividade reprodutiva dos animais. Além das análises mensais, as condições climáticas foram relacionadas a morfologia segundo duas estações bem distintas: fria e seca (março a julho) e quente e úmida (outubro a fevereiro). Análises estatísticas são descritas a seguir.

III.4 - Análise dos dados

III.4.1 – Análise das variáveis biométricas, morfométricas e climáticas

Primeiramente foi verificada a existência de valores discrepantes (*outliers*), em seguida, a normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk, e quando necessários, foram submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$ (Lehner, 1996). Todos os resultados obtidos foram comparados entre os meses de abril de 2004 à março de 2005 (com exceção de agosto e setembro de 2004). Os dados biométricos do animal foram analisados pela One-Way-ANOVA quando paramétricos e por Kruskal-Wallis ANOVA quando não paramétricos, sendo completados quando necessários, por testes para comparações múltiplas (Tukey e Dunn, respectivamente). Dados biométricos das gônadas foram analisados entre os meses pelo teste Kruskal-Wallis e para cada mês (entre a gônada direita e esquerda) através do teste Wilcoxon. O diâmetro locular foi analisado pelo teste One-Way ANOVA, já a quantidade de espermatozóides e as variáveis climáticas, pelo Kruskal-Wallis e quando necessário, completado pelo Teste de Dunn. Para testar se há variação significativa da quantidade de espermatozóides entre as estações, foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

A dependência entre as variáveis climáticas e os parâmetros biométricos e morfométricos, foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Foram feitos testes de correlação de Pearson (dados paramétricos) e de Spearman (dados não paramétricos) entre os parâmetros biométricos e morfométricos, bem quanto entre eles. Foi considerado $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

III.4.2 – Análise da população celular

Depois de verificado a existência de valores discrepantes (*outliers*), aplicamos o teste de Shapiro-Wilk, para testar a normalidade e quando necessário, os dados foram submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$ (Lehner, 1996). Todos os resultados obtidos foram comparados entre os meses amostrados e o volume obtido de cada tipo celular foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA, quando os dados foram não paramétricos e pelo teste One-Way ANOVA, quando paramétricos. Para verificar se havia variação da área locular e do volume total ocupado pelos tipos celulares ao longo do ano foi aplicado o teste One-Way ANOVA. Foi aplicado o teste de Regressão linear simples entre os dados climáticos e o volume médio ocupado pelas espermátides e espermatozóides, como também Correlações de Pearson (dados paramétricos) e Spearman (não-paramétricos) com os demais parâmetros biométricos do animal, proposto na análise do ciclo reprodutivo. Utilizamos o teste t de *Student*, para verificar se há variações sazonais referente ao volume ocupado pelas espermátides e espermatozóides. Foi considerado $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

III.5 – Comitê de Ética

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEIA).

IV Resultados

Os testículos de *Dendropsophus minutus* estão localizados na cavidade celomática, em posição ventral aos rins e em sintopia com a face visceral destes. Os rins se encontram em posição imediatamente ventral à parede dorsal da cavidade abdominal e estão intimamente associados aos testículos através do mesentério gonadal ou mesórquio (Fig. 7). Os testículos apresentam uma coloração branco-leitosa, possuem forma ovalada, comprimento médio de 1,90 ($\pm 0,13$ mm) (Fig. 8 A) e peso médio de 0,002 ($\pm 0,00$ g).

Externamente, os testículos são revestidos por uma túnica albugínea constituída basicamente por fibras colágenas, e pela delgada espessura confere transparência a esta estrutura, permitindo assim, verificar que os testículos são formados por unidades circulares ou esféricas, de aspecto granuloso, que refere-se aos elementos seminíferos (Fig. 8 B).

Através da microscopia, podemos observar as unidades que constituem estruturalmente os testículos, estas abrigam em seu interior as células da linhagem germinativa e são denominadas de lóculos seminíferos (Fig. 9 A e B). 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.

A área média de um lóculo seminífero da espécie estudada é de $36012,57(\pm 2128,66\mu\text{m}^2)$ (ou $0,03\text{ mm}^2$) (Fig. 9 C) e é ocupado em aproximadamente 88% (Fig. 10) de sua área por células da linhagem germinativa. O restante 12% é constituído basicamente por restos de citoplasma, espaços do lume seminífero e demais tipos celulares não proposto na análise e que estão presentes no tecido germinativo do lóculo seminífero. Estatisticamente, essa área locular não

apresentou variação significativa (One-Way ANOVA: $F=0,76$; $p=0,65$) ao longo do período amostrado, assim como quase todos os tipos celulares analisados (Fig. 11).

Com relação aos parâmetros biométricos das gônadas, o comprimento (Kruskal-Wallis: $H=11,24$; $p=0,25$) e o peso (Kruskal-Wallis: $H=3,71$; $p=0,92$) não apresentaram variação entre os meses analisados (Fig. 12 e 13), mas estes parâmetros estavam correlacionados entre si, ou seja, a variação de um é acompanhada pela variação no outro (Correlação de Spearman: $t=2,20$; $p=0,03$). O comprimento e o peso, entre as gônadas direita e esquerda, para cada mês analisado, não apresentou diferença significativa (teste Wilcoxon: $p>0,05$), o que nos permitiu aleatorizar qualquer uma das gônadas para as análises. Tanto o comprimento quanto o peso dos testículos, não manifestaram qualquer relação com os demais parâmetros analisados.

Os corpos adiposos são encontrados na extremidade cranial dos testículos e apresentam-se formados por muitos prolongamentos delgados, com sua coloração variando do esbranquiçado ao amarelado. Estatisticamente os corpos adiposos, apresentaram variação significativa ao longo dos meses estudados (kruskal-Wallis: $H=28,90$; $p=0,00$) (Fig. 14), mas não manteve relação com nenhum dos parâmetros biológicos (biométricos e morfométricos) analisados, bem quanto aos climáticos.

Quanto à análise biométrica do animal, o comprimento ($2,31\pm0,07$ cm) não teve apreciáveis variações significativas (Kruskal-Wallis: $H=15,50$; $p=0,07$) ao longo dos meses analisados, mas apresentou-se correlacionado com os fatores ambientais (Regressão linear simples; temperatura: $F=8,98$; $p=0,00$; pluviosidade: $F=4,68$; $p=0,03$; fotoperíodo: $F=9,40$; $p=0,00$) (Fig. 15), ao peso do animal (Correlação de Spearman; $t=8,46$; $p=0,00$) (Fig. 16) O peso ($0,725\pm0,08$ g), diferente do comprimento, demonstrou variação no decorrer do período

amostrado (One-Way ANOVA: $F=3,96$; $p=0,00$) (Fig. 17), e também apresentou-se associado aos fatores climáticos (Regressão linear simples; temperatura: $F=20,62$; $p=0,00$; pluviosidade: $F=8,23$; $p=0,00$; fotoperíodo: $F=23,69$; $p=0,00$) (Fig. 18).

Com relação aos parâmetros morfométricos, temos que a quantidade média de espermatozóides (297 ± 110 células) (Fig. 19) demonstrou variação significativa durante o período estudado (Kruskal-Wallis: $H=21,42$; $p=0,01$) e quando comparado entre as estações (Mann-Whitney: $U=179,00$; $p=0,00$) (Fig. 20). Também apresentou-se associada as variáveis climáticas (Regressão linear simples: temperatura: $F=11,03$; $p=0,00$; pluviosidade: $F=8,86$; $p=0,00$; fotoperíodo: $F=5,27$; $p=0,02$) (Fig. 21) ao comprimento (Correlação de Spearman: $t=2,21$; $p=0,03$) (Fig. 22) e peso do animal (Correlação de Spearman: $t=2,29$; $p=0,02$) (Fig. 23). O diâmetro locular médio ($221 \pm 13 \mu\text{m}$) não variou ao longo dos meses amostrados (One-Way ANOVA: $F=0,67$; $p=0,72$) e não manifestou qualquer outra associação aos demais parâmetros analisados (Fig. 24).

Pela análise da população celular verificou-se que os machos de *Dendropsophus minutus* apresentam diferentes tipos celulares germinativos em seus lóculos seminíferos e que estas células variam desde espermatogônias primárias à espermatozóides maduros (Fig. 25).

As espermatogônias primárias são células grandes, localizadas na periferia locular e apresentam uma cromatina granular (Fig. 26 A), ocupam em média 3,43% do volume locular e não apresentaram variação significativa (Kruskal-Wallis: $H=10,35$; $p=0,32$) referente ao seu volume durante o período analisado. As espermatogônias secundárias apresentam uma coloração mais intensa que os demais cistos, as células são menores que as espermatogônias primárias e normalmente também são encontradas na periferia do lóculo (Fig. 26 B e C), ocupam em média 10,80% do volume locular e como as espermatogônias primárias, não apresentaram variação

(Kruskal-Wallis: $H=13,53$; $p=0,14$) ao longo do ciclo reprodutivo. Na sequência da diferenciação celular, temos os espermátócitos que apresentam dois tipos morfológicamente distintos; os espermátócitos primários, que são células grandes, embora menor que as espermatogônias primárias e tem uma cromatina mais frouxa (Fig. 26 D); os espermátócitos secundários são células bem menores e sua população celular é maior que as suas antecessoras (Fig. 26 E e F). Geralmente os espermátócitos são observados em diferentes fases da primeira divisão meiótica, apresentando, portanto diferentes graus de compactação do material nuclear. Os espermátócitos primários ocupam em média 23,48% do volume locular, já os espermátócitos secundários, apenas 9,92%. Ambos, não apresentaram variação significativa ao longo dos 10 meses estudados (One-Way ANOVA e Kruskal-Wallis: $p>0,05$; respectivamente) (Fig. 26 G).

Foi verificada, uma variação significativa (One-Way ANOVA: $F=5,46$; $p=0,00$) do volume ocupado pelas espermátides e espermatozóides (40,31%) em um lóculo seminífero. As espermátides são decorrentes da segunda divisão meiótica e apresentam população celular com aspectos muito heterogêneos nos quais encontramos células que variam desde um formato esférico ao alongado, podendo também ser distinguido dois tipos morfológicamente distintos. As espermátides redondas (Fig. 26 H) apresentam-se arredondadas, núcleo ligeiramente compactado e dentre estas características, podem ser diferenciadas dos espermátócitos secundários quando algumas células mostram-se ligeiramente alongadas. As espermátides alongadas são células cujo núcleo sofre alongamento concomitantemente a uma progressiva compactação nuclear. Neste momento se desfaz a organização cística para se arranjar em feixes sustentados pelas células de Sertoli, embora ainda a consideramos como um cisto germinativo (Fig. 26 I e J). Os espermatozóides por sua vez, são caracterizados por uma extraordinária compactação nuclear e redução citoplasmática. Geralmente os espermatozóides em desenvolvimento estão arranjados em

pacotes muito bem organizados devido a sua associação com as células de Sertoli, e quando em graus mais avançados de maturação, ganham uma certa desorganização e normalmente são encontrados no lume locular (Fig. 26 K). O volume médio ocupado pelas espermatídes e espermatozóides foi correlacionado positivamente com as variáveis ambientais (Regressão linear simples; temperatura: $F=7,18$; $p=0,02$; fotoperíodo: $F=20,08$; $p=0,00$) e com o peso do animal (Correlação de Pearson: $r=0,76$; $p=0,01$). Na Fig. 27 observamos que a partir do mês de outubro, espermatídes e espermatozóides apresentaram um aumento significativo, e que os demais tipos celulares manifestaram pouca diferença com relação ao volume ocupado no lóculo seminífero ao longo do ciclo reprodutivo. Quando comparamos o volume ocupado por estes tipos celulares entre as estações (fria e seca e quente e úmida), foi possível detectar diferença significativa entre estas (Teste *t Student*: $t = -5,83$; $p = 0,00$) (Fig. 28).

As células da linhagem germinativa estão organizadas em cistos caracterizando uma espermatogênese cística para estes animais. Esta organização se deve a uma associação das células de Sertoli às células germinativas, agrupando células que se apresentam no mesmo estágio de diferenciação, formando cistos espermatogênicos ou espermátócitos (Fig. 29).

Pela análise histológica constata-se que *Dendropsophus minutus* apresenta ciclo gametogênico do tipo contínuo, pois diferentes tipos celulares foram observados em maior ou menor proporção nos lóculos seminíferos durante todo ciclo anual (Fig. 30). A tabela 1 e 2 ilustra os valores de p resultante das análises de correlação e regressão.

V – Discussão

V.1 – Aspectos morfofuncionais

Dendropsophus minutus é uma espécie de formação aberta, encontrada trepada em vegetação herbácea ou gramínea que cresce junto à margem ou debruçando sobre a água. Como também observado por Jim (1980), esta espécie mostra preferência para corpos d'água temporários de constante troca e apresenta ampla plasticidade na ocupação de microhabitat. Na sua época favorável de reprodução surgem em grandes quantidades formando densas concentrações de indivíduos.

Em vertebrados os testículos têm duas importantes funções: 1-produção de hormônio (andrógeno) e 2-produção de espermatozóides (Emerson, 1997). Duellman e Trueb (1986), descrevem os testículos dos anfíbios anuros como estruturas pares, esféricas ou ovais, localizadas numa posição ventral ao nível da metade anterior dos rins, podendo em algumas espécies ser longos e se estenderem até a extremidade posterior dos rins; e ainda segundo Goin e Goin, (1962) estas estruturas são compactas e de coloração geralmente amarelada.

Os testículos de *Dendropsophus minutus* estão localizados na cavidade celomática, em posição ventral aos rins e em sintopia com a face visceral destes. Os rins se encontram em posição imediatamente ventral à parede dorsal da cavidade abdominal e estão intimamente associados aos testículos através do mesentério gonadal ou mesórquio. Os corpos adiposos estão aderidos à extremidade cranial dos testículos e as gônadas masculinas apresentam certa assimetria quanto sua localização, assim como para outras espécies de anfíbios anuros. Este órgão pode ser deslocado para 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 digestivo, o que sem dúvida alguma é uma característica extremamente protetora para o processo gametogênico (Oliveira, 1996). Uma caracterização morfológica geral dos testículos semelhante a esta é apresentada para *Caudiverbera caudiverbera* (Hermosilla *et al.*, 1983), *Scinax fuscovarius* (Oliveira e Vicentini, 1998), *Eupemphix nattereri* (Oliveira e Zieri, 2005) e também para outras espécies (Lofts, 1974).

Nos machos de *Dendropsophus minutus* como também para outro anuro hilídeo, *Scinax fuscovarius* (Oliveira e Vicentini, 1998) os testículos apresentaram coloração branco-leitosa e essa coloração embora ocorra na maioria das espécies de anfíbios anuros, difere em algumas espécies, como por exemplo, no leptodactylideo *Eupemphix nattereri*, que devido a tipos celulares conspícuos muito pigmentados denominados melanócitos viscerais é conferida uma tonalidade de preto mesclado com branco a este órgão (Oliveira e Zieri, 2005). A forma, o pequeno tamanho e o peso dos testículos refletem uma característica anatômica associada ao pequeno porte e biótipo do animal, pois os machos de *Dendropsophus minutus*, alcançam maturidade reprodutiva em torno de 2,31 cm de comprimento rostro-cloacal. Estes dados também foram encontrados por Prado e Haddad (2005), em seu trabalho com tamanho de testículos e modos reprodutivos em Hilídeos.

V.2 – Aspectos morfológicos

Segundo Lofts (1974), os testículos dos anuros são circundados por uma camada fibrosa elástica, que consiste de uma massa de túbulos seminíferos convolutos limitados por um epitélio

germinativo, que geralmente é ocupado por um grande número de cistos germinativos em diferentes estágios de desenvolvimento. Estes túbulos seminíferos estão entremeados num tecido intersticial composto de tecido conjuntivo, capilares sanguíneos e tecido produtor de esteróide (as conspícuas células intersticiais de Leydig). *Dendropsophus minutus* não difere deste clássico padrão morfológico.

Nos anfíbios a espermatogênese é cística (Lofts, 1974), ou seja, a proliferação das células germinativas ocorre em grupos organizados e bem definidos, que recebem a denominação de cistos germinativos, o que também foi observado em *Dendropsophus minutus* e em várias espécies de anuros (Cavicchia e Moviglia, 1983; Rastogi *et al.*, 1988 e Bão *et al.*, 1991). Trata-se de uma característica fundamental e comum nos testículos dos anfíbios, que é a ocorrência da espermatogênese dentro destas estruturas foliculares, onde as células de cada grupo estão sempre no mesmo estágio de diferenciação (Lofts, 1974; Rastogi, *et al.*, 1988 e Bão *et al.*, 1991).

As observações microscópicas dos testículos em *Dendropsophus minutus*, como também documentado para *Scinax fuscovarius* (Oliveria e Vicentini, 1998), revelam estruturas esféricas ou ovais denominadas de lóculos seminíferos, o que nos embasa afirmar um arranjo locular ou túbulo-locular seminífero, mas não túbulo seminífero como aqueles dos vertebrados amniotas. Os cistos, formados por células foliculares somáticas ou de Sertoli associadas às células germinativas, tem como característica geral e que ocorre outros grupos animais, a formação de uma barreira hematotesticular entre estas células. Acredita-se que tal mecanismo mantém diferenças entre a composição do sangue ou hemolinfa e o fluido testicular, o que resulta na formação de um microambiente apropriado para o desenvolvimento das células germinativas haplóides (Cavicchia e Moviglia, 1983 e Bergmann *et al.*, 1983).

As células de Sertoli alongam os espermatozóides antes de liberá-los e depois de liberados; tornam-se densamente lipoidal, separam-se da parede do lóculo e se agregam no lumen locular (Callard *et al.*, 1978). Normalmente as células de Sertoli permanecem até o final do processo espermatogênico, onde liberam os espermatozóides no lume locular, desta forma sua função pode estar relacionada não apenas na manutenção e desenvolvimento das células germinativas como também no direcionamento das células no processo final da espermatogênese. Estas características estruturais foram também relatadas de maneira similar para *Scinax fuscovarius* (Oliveira e Vicentini, 1998 e Oliveira *et al.*, 2003) *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* e *Eupemphix nattereri* (Oliveira e Zieri, 2005) sendo, considerada comum para a maioria das espécies de anfíbios anuros.

Pela análise dos tipos celulares da linhagem espermatogênica verifica-se que os machos de *Dendropsopus minutus* apresentam em seus lóculos seminíferos tipos celulares diferentes, que variam desde espermatogônias primárias aos espermatozóides maduros em maior ou menor proporção de cada um destes e dos tipos celulares intermediários.

De acordo com Lofts (1974) as espermatogônias primárias são as maiores células da linhagem germinativa e repousam nas adjacências da lâmina basal dos elementos seminíferos. Observações similares foram documentadas em *Dendropsopus minutus* e outras espécies: *Bufo arenarum* (Cavicchia e Moviglia, 1983); *Pachymedusa dacnicolor* (Rastogi *et al.*, 1988); *Hyla rank* (Taboga e Dolder, 1991); *S. fuscovarius* (Oliveira e Vicentini, 1998) e *Odontophrynus cultripes* (Báo *et al.*, 1991).

As espermatogônias primárias passam por um processo mitótico, ou se dividem em duas novas espermatogônias primárias independentes e embainhadas por células foliculares, ou então,

durante o período de intensa atividade espermatogênica, se dividem várias vezes para formar um grupo de células que permanecem unidas dentro de um cisto comum, constituído de duas ou mais células, cujo citoplasma e núcleo, agora esférico passam a ser denominadas de espermatogônias secundárias (Lofts, 1974). Em *Dendropsophus minutus* as características das espermatogônias são similares às aquelas descritas para a maioria dos anfíbios anuros. Dentre as mais notáveis diferenças que ocorrem durante a citodiferenciação das espermatogônias primárias em secundárias, destacam-se a diminuição do tamanho e a grande redução do citoplasma, com um núcleo que se torna cada vez menos lobulado até alcançar uma forma esférica durante a transformação da espermatogônia secundária em espermátócito primário (Rastogi *et al.*, 1988).

Ainda segundo Lofts (1974) o desenvolvimento dos cistos de espermatogônias secundárias define um “período de multiplicação”, no qual uma espermatogônia primária pode ter originado um cisto contendo aproximadamente duzentas células. Segundo Oliveira (1996) no decorrer deste período multiplicacional, identificam-se dois tipos de espermatogônias secundárias. As primeiras foram denominadas de espermatogônias secundárias – tipo claro, uma vez que seus núcleos são mais claros que os de suas sucessoras, porém elas são observadas como um pequeno grupo de células de aspecto “manchado” e sempre localizadas próximas à parede do lóculo seminífero, geralmente se agrupando em forma de rosetas. As espermatogônias secundárias – tipo escuro, possuem um núcleo muito compactado e intensamente corado, que freqüentemente possui forma de “gota”. Geralmente este último tipo celular forma cistos germinativos grandes, que se estendem até o lume do lóculo seminífero. Embora não tenha sido evidente a identificação das espermatogônias secundárias tipo escuro, as mesmas características

morfológicas das espermatogônias secundárias tipo claro, foram observadas em *Dendropsophus minutus* como também documentadas para outras espécies (Oliveira, 1996).

As espermatogônias secundárias são células menores que as primárias e todas as integrantes do mesmo cisto germinativo são de tamanho similares. Todas as células se desenvolvem numa taxa uniforme e se dividem sincronicamente, de maneira que o cisto aumenta de tamanho e número de espermatogônias secundárias (Lofts, 1974). A partir da diferenciação das espermatogônias secundárias, temos os espermatócitos primários. Estes geralmente são observados na prófase da primeira divisão meiótica, com diferentes grau de compactação cromatínica. Estas células, espermatócitos primários, geralmente são maiores que as espermatogônias secundárias. Com a primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários, originam-se células muito menores, os espermatócitos secundários. Uma característica própria deste estágio é o aparecimento gradual de pequenos espaços intercelulares, que coalescem e tornam-se mais evidentes nos cistos de espermatócitos secundários (Hermosilla *et al.*, 1983).

De acordo com Lofts (1974), os vacúolos intercelulares que já são observados nos cistos de espermatócitos primários aumentam de tamanho e coalescem em um vacúolo central, transformando o cisto em uma vesícula oca com as espermatídes, que inicialmente são esféricas e relativamente pequenas, arranjadas ao longo da parede interna. Descrição similar foi observada em *Caudiverbera caudiverbera* (Hermosilla *et al.*, 1983). Porém em *Dendropsophus minutus* não existe a formação deste vacúolo central, mas as células apresentam características morfológicas semelhantes; e com a formação das espermatídes alongadas, o arranjo cístico se desfaz para que estas células se organizem em compactos feixes que são sustentados pelas células de Sertoli. Descrição similar em outro hílideo foi apresentada por Oliveira e Vicentini (1998).

Com a formação das espermatídes iniciais, as células esféricas e relativamente pequenas; encerram o ‘período de maturação’. Estas células começam a se alongar e a se organizar em feixes (Lofts, 1974). Esta organização em feixes é relatada em diversas espécies, na qual os filamentos caudais normalmente estão direcionados para o centro do lume e a cabeça das espermatídes ficam encravadas nas células de Sertoli. Desta forma estas células mantêm uma relação morfofuncional com as células da linhagem germinativa, o que ainda é mais evidente durante o processo espermiogênico (Cavicchia e Moviglia, 1983; Rastogi *et al.*, 1988; Taboga, 1990 e Bão *et al.*, 1991).

As espermatídes apresentam uma extraordinária heterogeneidade morfológica, uma vez que passam de um formato esférico ao cilíndrico alongado, através de alterações núcleo citoplasmáticas inerentes a espermiogênese (Oliveira, 1996).

Em *Caudiverbera caudiverbera* (Hermosilla *et al.*, 1983), *Odontophrynus cultripes* (Bão *et al.*, 1991), *Scinax fuscovarius* (Oliveira, 1996), como também em *Dendropsophus minutus* as espermatídes jovens, num primeiro estágio, apresentam um núcleo esférico e com fina granulação, em seguida os núcleos tornam-se ovais e a cromatina granular é homogeneamente distribuída. Os estádios seguintes são caracterizados por alongação celular e nuclear, que ocorre simultaneamente a condensação cromatínica. Segundo Oliveira (1996), analisando-se superficialmente as espermatídes destes anfíbios, observa-se que a citodiferenciação não diverge daquela que ocorre nos vertebrados amniotas, nos quais ocorre a individualização de uma região nuclear, cabeça, uma peça intermediária e o filamento caudal, constituindo a cauda do futuro espermatozóide.

Para finalizar, durante a formação dos espermatozóides ocorre um processo de eliminação de porções citoplasmáticas que é o principal responsável pela diminuição do seu volume, juntamente com a compactação do material nuclear. Em *Dendropsophus minutus* os espermatozóides maduros atingem certa desorganização no lume do lóculo seminífero, estando, portanto aptos a serem liberados para as vias gametogênicas através de ductos eferentes.

V.3 – Considerações do ciclo reprodutivo e gônadas

Referente ao processo da espermatogênese, verificou-se entre os meses analisados a presença de muitos dos diferentes tipos celulares germinativos, além de espermatozóides livres, nos lóculos seminíferos, como também observado para *Hyla rank* (Taboga e Dolder, 1991). Não é incomum, especialmente em áreas tropicais, anuros que se reproduzem durante o ano todo, mesmo em ambientes sazonais (Aichinger, 1987; Barreto e Moreira, 1996), desde que os locais sejam favoráveis à reprodução e estejam disponíveis ao longo do ano (Ferreira *et al.*, *in press*).

Segundo Huang *et al.* (1997) e Lofts (1974) os ciclos gametogênicos dos anuros, foram classificados em tipos descontínuos, potencialmente contínuos e contínuos. Os tipos descontínuos são comumente encontrados em espécies de zonas temperadas e geralmente têm um discreto ciclo de reprodução com pronunciadas mudanças no tamanho das gônadas, produção de gametas e estruturas sexuais acessórias. O tipo potencialmente contínuo exibe uma parada parcial na atividade espermatogênica durante algumas estações no ano, mas espermatogônias primárias permanecem sensíveis à estimulação gonodotrófica. Espécies que habitam regiões tropicais, onde as condições climáticas não mostram apreciáveis flutuações, têm um tipo contínuo de ciclo

espermatogênico. Callard *et al.* (1978), diz ainda que no tipo contínuo de ciclo gametogênico, ocorrem ondas espermatogênicas sucessivas, portanto sem interrupção na produção de espermatozóides.

Com base nestas descrições, sugerimos que *Dendropsophus minutus* apresenta ciclo gametogênico do tipo contínuo; reproduzindo-se o ano todo (Haddad e Cardoso, 1992), como também encontrado para outras espécies da família Hylidae, *Lysapsus limellus* (Ferreira *et al.*, *in press*) e anuros de regiões tropicais. Segundo Saidapur (1983) em espécies com ciclo gametogênico do tipo contínuo, os espermatozóides geralmente são produzidos ao longo do ano e os testículos sempre contêm ninhos de células espermatogênicas como também um espectro completo das fases da espermatogênese. Em anuros de zonas tropicais que se reproduzem ao longo de todo o ano, as células da linhagem germinativa que ocupam o testículo, se encontram em vários estádios de maturação (Duellman e Trueb, 1986); já nos anuros de zonas temperadas as células espermáticas amadurecem uniformemente em todo o testículo (Lofts, 1974). Em *Rana erythraea* cada lóculo contém células num único estágio, porém o testículo freqüentemente contém células em todos os estádios da espermatogênese (Inger e Greenberg, 1963). Em anuros como *Hyla rank* (Taboga, 1990), *Scinax fuscovarius* (Oliveira, 1996) e *Dendropsophus minutus* que possuem uma espermatogênese contínua ao longo de todo período reprodutivo, torna-se possível a identificação de diferentes tipos celulares em um único lóculo seminífero, ou seja, todas as células da linhagem germinativa ocupam o mesmo lóculo e se diferenciam simultaneamente.

A atividade reprodutiva de anuros que vivem em ambientes sazonais, é geralmente associada com os períodos chuvosos, tanto em climas tropicais (Hoogmoed e Gorzula, 1979;

Aichinger, 1987) como nos climas temperados (Banks e Beebee, 1986; Caldwell, 1987). 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. Além disso, outros fatores podem interferir na reprodução, tais como, temperatura da água, pressão por predação, competição por alimento (Prado e Uetanabaro, 2000) e fotoperíodo. Mesmo embora, os parâmetros analisados neste trabalho, não incluam umidade relativa; temperatura, pluviosidade e fotoperíodo já nos fornecem importantes informações acerca de como estas variáveis podem interferir no processo reprodutivo dos machos de *Dendropsophus minutus*.

Segundo Jim (1980), para se compreender o padrão de distribuição estacional dos anfíbios anuros, ele propõe a divisão de cada uma das estações em três subestações baseado no período de maior atividade das espécies. Desta forma, categorizou-se: espécies precoces - aquelas que têm maior atividade nos dois primeiros meses da estação; espécies plenas, - maior atividade nos dois meses do meio da estação, e espécies tardias - maior atividade nos meses finais da estação. De acordo com seus dados, *Dendropsophus minutus* da região de Botucatu, tem seu pico de atividade reprodutiva de outubro à março e descreveu ainda que esta, é uma espécie plena de estação quente e úmida. Esses dados corroboram com o encontrado neste trabalho, pois para a região de São José de Rio Preto, o período de atividade reprodutiva, foi o mesmo para esta espécie; onde coincidentemente se teve o início da estação chuvosa. Com base no período de maior atividade reprodutiva (por observar animais em campo em amplexo) e características morfométricas obtidas, podemos considerar que esta espécie apresenta-se na categoria de espécie plena de estação quente e úmida.

Segundo Huang *et al.* (1997), os três maiores fatores ambientais que tem implicações na regulação do ciclo reprodutivo dos anfíbios são: umidade, fotoperíodo e temperatura. Umidade pode influenciar no comportamento reprodutivo de vários anuros (Lofts 1974). Foi demonstrado que o fotoperíodo modifica potencialmente a atividade testicular de *Rana esculenta* e regula a reprodução em muitos vertebrados (Rastogi *et al.*, 1976). Variação sazonal no comprimento do fotoperíodo é importante sinal de que são usados para sincronizar a atividade reprodutiva nas estações apropriadas. Os receptores da retina enviam este sinal ao sistema neuroendócrino através de uma ligação neural (Joshi e Udaykumar, 2000), assim, o sinal do fotoperíodo é transferido na forma de um impulso neural na produção de melatonina (sinal hormonal) pela glândula pineal, desempenhando um importante papel na regulação da reprodução das espécies (Udaykumar e Joshi, 1996). A temperatura tem sido mostrada iniciar um importante papel na regulação dos níveis de andrógenos no plasma sincronizando as diferentes fases do ciclo sazonal testicular em muitas espécies de anuros (Pierantoni *et al.*, 1985).

Dos parâmetros analisados, apenas o comprimento e o peso do animal, a quantidade de espermatozóides e o volume ocupado pelas espermatídes e espermatozóides, apresentaram relação com as variáveis climáticas. Este fato pode ser explicado pelo início da época favorável à reprodução, pois através dos dados meteorológicos obtidos, verificamos que o período chuvoso e quente vai de outubro ao final de março e o frio e seco do final de março a julho, para a região de São José do Rio Preto-SP.

Estas relações podem em parte ser explicada pelo início da estação chuvosa em outubro, depois de um período de estiagem que compreendeu 82 dias exatos (final de julho a setembro). Ao aumento da temperatura e ao início da estação chuvosa, provavelmente houve o crescimento da vegetação e conseqüentemente um favorecimento no desenvolvimento de muitas espécies de

insetos e outros organismos que podem ser incluídos na cadeia alimentar dos animais presentes no local estudado. Este fato também foi observado por Pradeiro e Robinson (1990), para *Colostethus trinitatus* que notou um aumento na produção de ovos nos ovários durante a estação chuvosa e atribuiu este fato ao um aumento na disponibilidade de alimentos para as fêmeas durante este período. Segundo Wolda (1978) é provável que a presença sazonal de espécies de insetos é sincronizada com a presença sazonal na disponibilidade de alimento; e a produção de folhas e brotos parece estar fortemente correlacionada à pluviosidade. De acordo com Boinski e Fowler (1989) a relativa abundância de artrópodes varia sazonalmente, com pico na abundância no começo da estação úmida e uma diminuição no final desta estação.

Os picos na produção de espermatozóides pode ser um reflexo das condições ambientais, uma vez que foi verificada correlação entre estes parâmetros, bem como ao comprimento e peso do animal. Além disto, Smith-Gill e Berven (1980) verificaram que em *Rana sylvatica*, que a quantidade de espermatozóide produzido está relacionado ao peso corporal do animal, e concluíram que machos maiores têm mais habilidade para produzir descendentes do que machos menores, pois é esperado um maior sucesso de fertilização. Ainda um experimento realizado por Woodward (1986) com *Spea multiplicata* (anuro), obtiveram evidencia de que machos maiores transmitem seus genes com maior sucesso do que jovens em crescimento; e segundo Mitchell (1990) machos maiores e mais pesados produzem descendência 10% mais pesada do que machos menores.

Com base nestas observações, podemos dizer que a oferta alimentar pode estar disponibilizando uma maior proporção no investimento de energia, refletindo no desenvolvimento de animais maiores e mais pesados. Como *Dendropsophus minutus* é um animal territorialista (Cardoso e Haddad, 1984), e devido ao fato da metodologia empregada para

capturar estes animais ser realizada com base em suas vocalizações, fica claro considerar que animais que apresentam melhores capacidades “físicas”, estão aptos a ganhar uma disputa pelo território e, portanto são os que provavelmente estarão em “atividade reprodutiva”. Como relatado por (Verrell, 1983) eleição dos machos pelas fêmeas com base em diferentes tamanhos tem sido observada em várias espécies de anuros e a reprodução dos machos de maior tamanho parece ser mais freqüente, pois machos maiores são mais maduros e devem apresentar boas qualidades genéticas, pois seus fenótipos tiveram êxito em sobreviver a uma ampla gama de variações desfavoráveis do ambiente (Howard, 1978).

V.4 – Considerações do ciclo reprodutivo e corpos adiposos

Com relação à energia armazenada, encontramos na margem anterior dos testículos, os corpos adiposos abdominais. Estas estruturas são de coloração amarelada com muitos prolongamentos delgado, comum a todos os anfíbios (Duellman e Trueb, 1986), e servem como uma reserva nutricional para as gônadas (Fitzpatrick, 1976) e para o próprio animal. Histologicamente, os corpos adiposos são observados como estruturas vacuolizadas num arranjo reticular conjuntivo. Em *Dendropsophus minutus*, diferente de *Scinax fuscovarius*, (Oliveira e Vicentini, 1998) a cor do corpo adiposo variou de esbranquiçado ao amarelado, e esta variação no padrão de coloração pode ser devido à sua constituição lipídica. Embora apresente esta variação anatômica quanto à cor, uma similaridade morfológica destas estruturas foi no aparelho reprodutor feminino e masculino de *Scinax fuscovarius* (Oliveira e Santos, 2004; Oliveria e Vicentini, 1998), bem como para o aparelho reprodutor masculino da espécie em questão.

Segundo Jorgensen (1986), o peso dos corpos adiposos variam de acordo com as condições ambientais e disponibilidade de alimento. Os corpos adiposos de *Dendropsophus minutus* apresentaram pronunciadas diferenças de tamanho de acordo com seu grau de desenvolvimento, como também relatado para *Scinax fuscovarius* (Oliveira e Vicentini, 1998). Porém nossos dados não foram correlacionados às variações climáticas; indicando, portanto, que estas variáveis não atuam diretamente nestas estruturas. Esta variação observada na forma de estruturas reduzidas ou muito desenvolvida pode refletir uma alteração anatômica que varia de acordo com o estado funcional de acúmulo lipídico; fato também observado em *Eupemphix nattereri* (Oliveira e Zieri, 2005). Mas, diferente do encontrado para *Pleurodema thaul* (Díaz-Páez e Ortiz, 2001), *Rana perezii* (Delgado *et al.*, 1989) e outras espécies de anuros (Fitzpatrick, 1976), a energia armazenada nos corpos adiposos, não foi correlacionada com a atividade espermatogênica. Então este fato nos leva a aceitar que os corpos adiposos podem ter sofrido ação indireta das variáveis ambientais uma vez que estes fatores, de certa forma disponibilizaram maior oferta alimentar para os indivíduos. Como não houve relação dos corpos adiposos com os demais parâmetros analisados, cabe considerar, portanto, que possivelmente a energia armazenada nestas estruturas podem ter sido utilizada para outros parâmetros não analisados neste trabalho, como comportamento de corte, defesa de território, canto e qualquer outro fator, que possa também estar relacionado à reprodução. Os picos observados nos meses de maio e dezembro podem ser explicados ao fato de que em dezembro, a energia acumulada pode estar sendo utilizada em outros processos relacionados à reprodução que não foram analisadas neste trabalho e a energia acumulada em maio pode ser uma outra estratégia do animal, pois ele precisará se manter com esta energia nos períodos que sucede o mês de maio, período no qual as condições climáticas não são favoráveis à sua sobrevivência, pois é época de estação seca e fria e,

conseqüentemente, haverá uma baixa oferta alimentar. Como relatado por Wolda (1978), na estação seca a abundância da maioria dos insetos é relativamente baixa, e apenas aumenta durante a estação úmida. Segundo Randall *et al.* (1997), os ectotérmicos vivem com taxas metabólicas menores, pois suas temperaturas corporais geralmente são mais próximas da temperatura do ambiente, e assim, eles não precisam gastar energia para elevar sua temperatura corporal. Desta forma, a energia metabólica assim economizada, pode ser dirigida para a reprodução e outros processos que promovam a sobrevivência da espécie, pois o ato da reprodução constitui-se no principal compromisso com a energia adquirida e estocada.

V.5 – Considerações do ciclo reprodutivo e células germinativas

A variação significativa da quantidade média dos espermatozóides e do volume ocupado pelas espermatídes e espermatozóides durante os meses amostrados estão relacionados com as condições climáticas. Notamos que em abril, houve um pico na quantidade média dos tipos celulares (482 ± 282 células) que consideramos como espermatozóides maduros, prontos a serem liberados para as vias ductulares. Assim, poderíamos considerar este mês, como o marco entre o final da estação reprodutiva e o início do período pós-reprodutivo, devido a grande quantidade destas células neste mês, das condições ambientais e da diminuição significativa na quantidade destes tipos celulares nos meses em que sucede a abril (maio, junho e julho). Além disso, verificamos nestes meses que os espermatócitos primários e secundários ocupam um volume maior (mas não detectável estatisticamente) neste período, do que nos outros. Isto é esperado quando temos em mente que um período pós-reprodutivo é basicamente caracterizado por uma fase em que normalmente encontramos mais células em estágio inicial de desenvolvimento

(células em maturação) do que células maduras (espermatozóides). Nos meses em que as condições climáticas foram propícias à reprodução, verificamos que espermátides e espermatozóides ocuparam significativamente um volume muito maior nos lóculos seminíferos do que os espermatócitos primários e secundários. Quando comparamos tanto ao longo do ano quanto sazonalmente entre as estações, fica clara esta relação. Diferente do volume ocupado pelas espermátides e espermatozóides, o volume dos espermatócitos secundários não apresentou variação significativa ao longo do ciclo reprodutivo. De acordo com nossas observações (espermatogônia primária 3%, espermatogônia secundária 11%, espermatócito primário 23%) seria esperada uma seqüência progressiva no aumento de volume dos espermatócitos secundários, na mesma condição. Ao contrário do esperado, verificamos que este volume demonstrou uma pequena porcentagem (9,90%) quando observado o tipo celular que é seu antecessor. Como não temos trabalhos que tratam do estado temporal da dinâmica celular fica difícil averiguar qual é realmente o fator desta manifestação. Provavelmente, o volume expressado em uma baixa porcentagem pode ser devido ao estado temporal da citodiferenciação durante a segunda divisão meiótica, a qual é um estágio menos complexo e muito mais rápido de desenvolvimento, do que ocorre na primeira divisão meiótica (Alberts *et al.*, 2004). Cabe considerar ainda, que as espermatogônias primárias, ocupam um volume bastante uniforme ao longo do ciclo, isto deveria ser esperado, pois estes tipos celulares são células basais e que dão origem às demais células da linhagem germinativa, portanto muitas vezes denominadas de protogônias.

Quanto ao período pós-reprodutivo, a temperatura neste período é mais baixa (média = 20° C) que as apresentadas nos outros meses, e há pouco volume de água devido ao baixo índice pluviométrico registrado durante este período, não disponibilizando corpos d'água para o desenvolvimento dos filhotes. Segundo Jim (1980) há evidências circunstanciais de que o padrão

de distribuição estacional é influenciado pela quantidade de água disponível no ambiente, pois durante a época chuvosa há um aumento no volume dos corpos d'água existentes e há formação de novos corpos d'água. Convém lembrar que, de modo geral para a maioria das espécies, o período que o girino geralmente tem para completar sua metamorfose varia entre 30 à 40 dias após a fertilização dos ovos, desta forma, a grande quantidade de espermatozóides verificada no mês de abril, pode ser devida a falta de locais para ovoposição, devido a baixa disponibilidade de locais para reprodução. Assim, a quantidade de células (espermatozóides) verificadas em abril pode ser um indicativo de que as espécies não se reproduziram (retendo temporariamente os espermatozóides até sua reabsorção ou inutilização), pois este é um período marcado por uma estação fria e seca, não havendo assim estímulo para a reprodução. Desta forma a espécie pode não ter estímulo para reproduzir neste período aguardando melhores condições ambientais.

Segundo Ko *et al.* (1998), o início de um novo ciclo espermatogênico e a formação de espermátides finais parecem ser controlados por mais de um fator ambiental, tais como temperatura, pluviosidade, comprimento do dia (fotoperíodo) e alimentos. Convém lembrar que o volume ocupado pelas espermátides e espermatozóides, como a quantidade de espermatozóides, também foi correlacionado às variáveis ambientais; reforçando, portanto, que as condições climáticas interferem na produção de células finais. Coincidentemente, o volume ocupado por estas células, compreendeu o mesmo período em que a quantidade média de espermatozóides foi significativa. Como também verificado em *Bufo melanostictus* (Huang *et al.*, 1997), a comparação do número de células finais mostrou que elas são significantemente maiores no período reprodutivo do que durante os outros períodos.

Devemos considerar que *Dendropsophus minutus* embora seja uma espécie que apresenta um tipo contínuo de gametogênese, também apresenta uma época preferencial para sua

reprodução, pois a partir de outubro, houve não apenas um aumento significativo na produção de espermatozóides como também no volume ocupado por estas células e espermátides no mesmo período (de outubro a início de março). Isto mostra a ampla plasticidade do animal para se reproduzir visto então que ela aproveita ao máximo todas as condições ideais para consolidar seu esforço reprodutivo.

Outro aspecto importante a ser considerado é que as variações climáticas foram insuficientes para estimular uma variação no comprimento e peso dos testículos; situação também encontrada para *Rana perezi* (Delgado *et al.*, 1989); bem como na área e diâmetro dos lóculos seminíferos; ou pelo próprio tipo de ciclo reprodutivo esta variação não deve ocorrer. Este fato pode ser considerado uma boa estratégia reprodutiva com relação à economia de energia, pois o gasto energético para o estabelecimento de uma reorganização estrutural no testículo, pode ser muito maior do que o gasto para manter o testículo em sua organização contínua; situação também observada para *Lisapsus limellus* (Ferreira *et al.*, *in press*). Segundo Huang *et al.* (1997), variação sazonal na atividade testicular normalmente reflete no peso gonadal. Tais padrões é geralmente exibido por espécies que exibe um tipo potencialmente contínuo de ciclo espermato gênico e aqueles com ciclo testicular do tipo descontínuo, tais como *Rana temporária*, no qual o peso testicular é um índice apropriado da função testicular. Com base nesta afirmação, cabe considerar, portanto, que tanto comprimento e peso quanto a estrutura microscópica dos testículos não é um bom índice para se atribuir status reprodutivo da espécie em questão. Isto pode se aplicar para a maioria dos anuros de regiões neotropicais, pois como observado; tanto anatomicamente quanto estruturalmente, os testículos não apresentaram variações significativas ao longo do ciclo de reprodução, nos fornecendo subsídios para aceitar que a produção de células germinativas finais, independe do estado anatômico das gônadas.

É importante ressaltar que os machos de *Dendropsophus minutus* foram vistos vocalizando durante todos os meses, em maior e menor proporção; com exceção de setembro, onde não houve nenhuma captura justamente por que o método empregado nas coletas foi baseado em suas vocalizações. Cabe considerar também que, no mês de agosto, apenas 3 animais foram coletados, mas que por razões estatísticas foram excluídos das análises para evitar uma incorreta interpretação dos resultados; mas que de forma indireta, foram utilizados para entender e discutir estes resultados. Em agosto e setembro, não houve nenhuma precipitação, o que nos leva a inferir que esta variável climática é um importante fator, senão o principal controlador da atividade reprodutiva destes animais, como também relatado por Ferreira *et al.*, *in press*, onde a variação da pluviosidade ao longo do ano é um fator externo e extremamente relevante para a reprodução de anuros; e que as condições climáticas, principalmente as pluviométricas determinam a distribuição estacional da maioria das espécies de anfíbios anuros (Jim, 1980).

Segundo Liley e Stacey (1983) no período reprodutivo ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, que controla a maturação das gônadas, o desenvolvimento de características sexuais secundárias e o próprio comportamento reprodutivo por meio do aumento da liberação de andrógenos gonadais. É usualmente aceito que andrógenos estão relacionados ao início da atividade reprodutiva e à expressão sexual do comportamento animal (Duellman e Trueb, 1986) e que o controle da espermatogênese é mantido por uma interação entre ritmos endógenos e fatores externos.

Segundo Ko *et al.* (1998), o alto nível de testosterona encontrado nos testículos, é fortemente correlacionado com o número de células intersticiais e ao tamanho do núcleo destas células. Embora neste trabalho não ter sido verificado este aspecto (controles endógenos), sabe-se

que em muitos anuros neotropicais, ele é tão importante fator controlador da reprodução, quanto os climáticos analisados.

V.6 – Síntese da discussão

Em resumo, verificamos que *Dendropsophus minutus* apresenta ciclo gametogênico do tipo contínuo, com um período preferencial para sua reprodução (outubro a março). A produção de células germinativas, como na maioria dos anfíbios anuros, ocorre em unidades estruturais denominadas de lóculos seminíferos, onde apresentam células foliculares (células de Sertoli) na qual através de prolongamentos de seu citoplasma, forma juntamente com as células germinativas, cistos espermatogênicos ou espermatocistos, caracterizando uma espermatogênese cística para estes animais. Assim, as células da linhagem espermatogênica desenvolvem-se dentro de cada cisto celular, estabelecendo, portanto, uma sincronia no desenvolvimento. Observamos que os tipos celulares que ocorrem nos testículos de *Dendropsophus minutus* são semelhantes aos descritos para os demais anfíbios anuros e que como descrito por muitos autores, estas células mostram características próprias de acordo com seu estágio de desenvolvimento. São comumente descritos: espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozóides. Todos estes tipos celulares foram observados nos testículos de *Dendropsophus minutus*, em maior ou menor proporção, caracterizando assim uma gametogênese contínua para estes animais; como documentado para a maioria das espécies de regiões neotropicais.

Verificamos também que animais maiores e mais pesados são os que provavelmente conseguirão se reproduzir, pois, devido a estas características físicas provavelmente ganham a

disputa pelo território, e conseqüentemente sítio de reprodução. Sendo assim, a percepção das condições climáticas ideais (chuva, temperatura e fotoperíodo) levou estes animais a uma produção intensa de células germinativas, pois nos meses em que as condições climáticas foram apropriadas, estes animais apresentaram alta quantidade de células em estágio final de desenvolvimento e um significativo volume ocupado por estas células dentro do lóculo seminífero.

Como, não foi verificada nenhuma variação tanto na anatomia (peso e comprimento) quanto nas estruturas microscópicas (área e diâmetro dos lóculos seminíferos) que constituem as gônadas masculinas de *Dendropsophus minutus*, interpretamos que as variações nos parâmetros abióticos utilizados neste trabalho (variáveis climáticas), não são suficientes para promover mudanças nestas estruturas e que, portanto dados da biometria da gônada (seja ela macro ou microscópicas) não podem ser utilizadas como parâmetro para se estudar biologia reprodutiva (ou status reprodutivo) de anuros de regiões tropicais. Esta peculiaridade nos leva a aceitar que a quantidade de produção celular, independe do estado anatômico dos testículos, pois mesmo embora não mudando sua estrutura (anatômica ou microscópica), os animais continuam a sua produção celular em maior ou menor proporção. Esta característica pode ser considerada como uma boa estratégia reprodutiva por parte destes animais, pois assim, a energia economizada pelo animal em não ter que reorganizar a estrutura testicular pode ser desviada para outros parâmetros não analisados neste trabalho e que podem estar relacionados à reprodução; como por exemplo, comportamento de corte, canto nupcial, canto territorialista, que por sua vez requer alta demanda de energia. Este fato pode ainda ser reforçado pelo estado apresentado pelos corpos adiposos, pois embora não tenha apresentado correlação com as variáveis climáticas, e aos outros parâmetros analisados neste trabalho; há diferenças de acúmulo energético durante os meses

amostrados. Os picos observados nos meses de maio e dezembro podem ser explicados pelo fato de que em dezembro, a energia acumulada pode ser utilizada em outros processos relacionados à reprodução e; a energia acumulada em um outro momento (maio) pode ser uma estratégia do animal, pois ele poderia manter-se com esta energia nos períodos que sucede à maio, período o qual as condições climáticas não são favoráveis à sua sobrevivência, pois é o final da estação chuvosa e conseqüentemente, haverá uma baixa oferta alimentar (período pós-reprodutivo).

De maneira geral, *Dendropsophus minutus* é uma espécie que apresenta ampla plasticidade com relação a sua reprodução, e busca consolidar o seu esforço reprodutivo (mantendo evolutivamente a espécie), utilizando-se de condições climáticas favoráveis.

VI - Conclusões

1 - De modo geral, os testículos de *Dendropsophus minutus* apresentam as mesmas características estruturais, tanto no aspecto macroscópico quanto no microscópico, aos da maioria das espécies de anfíbios anuros;

2 - O tamanho e o peso dos testículos, bem como a área e o diâmetro locular permanecem inalterados ao longo do ciclo de reprodução;

3 - Estruturalmente não há mudança no quadro morfométrico testicular referente ao diâmetro locular; implicando possivelmente em economia de energia;

4 - *Dendropsophus minutus* apresenta ciclo gametogênico do tipo contínuo, pois a análise histológica evidenciou que durante os meses analisados há todos os tipos celulares (desde espermatogônias à espermatozóides maduros) no lóculo seminífero em maior ou menor proporção;

5 - Os machos de *Dendropsophus minutus* apresentam um período reprodutivo preferencial, com um subsequente período pós-reprodutivo; observado na diminuição da quantidade de espermatozóides e um baixo volume destes e das espermátides;

6 - *Dendropsophus minutus* tem pico máximo de atividade reprodutiva nos meses de outubro à março;

7 - Os fatores climáticos analisados até o momento, não são os únicos; mas estão correlacionados com a atividade reprodutiva da espécie em questão;

8 - O início da estação reprodutiva é desencadeado pelo aumento na precipitação, temperatura e fotoperíodo, meses observados de outubro à final de março.

VII - Referências bibliográficas

- AICHINGER, M. 1987. Annual activity patterns of anurans in the seasonal neotropical environment. **Oecologia**, 71: 583-592.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2004. **Biologia molecular da célula**. Trd. Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al* – 4. ed. – Porto Alegre (RS): Artmed, 1463 p.
- ALHO, C. J. A.; STRÜSSMANN, C.; VASCONCELLOS, L. A. S. Indicadores de magnitude da diversidade e abundância de vertebrados silvestres no Pantanal num mosaico de habitats sazonais. In: **SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO ECONÔMICOS DO PANTANAL: DESAFIOS DO NOVO MILÊNIO, II**, 2002. EMBRAPA, Corumbá-MS, 1-54. **Resumos...**Corumbá-MS 2002, Caderno de resumos.
- ALMEIDA, C. G. 1984. **Aspectos biológicos e citogenéticos de *Hyla fuscovaria*** (Amphibia, Anura). Campinas, Universidade de Campinas, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, 121 p.
- BANKS, B.; BEEBEE, T. J. C. 1986. A comparison of the fecundities of two species of toad (*Bufo bufo* and *B. calamita*) from different types in Britain. **J. Zool.**, Lond. 208: 325-337.
- 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.

- BARRETO, L.; MOREIRA, G. 1996. Seasonal variation in age structure and spatial distribution of a savanna larval anuran assemblage in Central Brazil. **J. Herpetol.**, 30: 87-92.
- BASTOS, R. P., HADDAD, C. F. B. 2002. Acoustic and aggressive interactions in *Scinax rizibilis* (Anura: Hylidae) during the reproductive activity in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, 23: 97-104.
- 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.
- BERGMANN, M.; GREVEN, H.; SCHINDELMEISER, J. 1983. Observations on the blood-testis barrier in a frog and salamander. **Cell. Tissue Res.**, 232(1): 189-200.
- 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.
- BOINSKI, S.; FOWLER, N. L. 1989. Seasonal patterns in tropical lowland forest. **Biotropica**, 21(3): 223-233.
- BROWM, G. W. Jr. 1964. The metabolism of amphibia. In: MOORE, J. A. (Ed.) **Physiology of the amphibia**. New York: Academic Press, 1-98.
- CALDWELL, J. P. 1987. Demografy and life history of two species of chorus frogs (Anura: Hylidae) in South Carolina. **Copeia**, 114-127.
- CALLARD, I. P.; CALLARD, G. V.; LANCE, V.; BOLAFFI, J. L.; ROSSET, J. S. 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. **Biology of Reproduction**, 18: 16-43.

- CARDOSO, A. J. 1981. **Organização espacial e temporal, reprodução e vida larvária em comunidades de hilídeos no sudeste do Brasil**. Dissertação de mestrado, não publicada, Universidade estadual de Campinas, Campinas, SP.
- 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.
- 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.
- DAJOZ, R. 1973. **Ecologia geral**. Trad. Guimarães. 2^a ed. Rev. Téc. C. G. Fröelich. São Paulo, Ed. Vozes Ltda. E Edusp, 472 p.
- DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B.; JENNINGS M. R. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-b, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. **Conservation Biology**, 16(6): 1588-1601.
- 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.
- DÍAZ-PÁEZ, H.; ORTIZ, J. C. 2001. The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. **Amphibia-Reptilia**, 22: 431-445.
- DUELLMAN, W. E. 1999. **Patterns of distribution of amphibians: a global perspective**. Johns Hopkins, Baltimore, 633p.
- 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.
- EMERSON, S. B. 1997. Testis size variation in frogs: testing the alternatives. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, 41: 227-235
- 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.
- FERREIRA, A.; DOLDER, H.; OLIVEIRA, C. *in press*. *Lysapsus limellus* Spermatogenesis (Anura, Hylidae). **European Journal of Morphology**.
- FITZPATRICK, L. C. 1976. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. **Amer. Zool.**, 16: 725-732.
- FRANCHI, E., CAMATINI, M., DE CURTIS, I. 1982. Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. **J. Ultrastruct. Res.**, 80: 253-263.
- GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B. 2004. **Atividade reprodutiva de *Hyla minuta* na região de Itirapina, estado de São Paulo**. Relatório final de iniciação científica - PIBIC/CNPq. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro - Instituto de Biociências.
- GOIN, C. J., GOIN, O. B. 1962. **Introduction to herpetology**. San Francisco: W. H. Freeman, 341p.

- HADDAD, C. F. B. 1987. **Comportamento reprodutivo e comunicação Sonora de *Hyla minuta* Peters, 1872. (Amphibia, Anura, Hylidae).** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, I.B. Campinas, São Paulo, 135p.
- HADDAD, C. F. B., SAWAYA R. J. 2000. Reproductive modes of Atlantic Forest Hylid frogs: A general overview and the description of a new mode. **Biotropica**, 32(4b): 862-871.
- HADDAD, C. F. B.; CARDOSO, A. J. 1992. Elección del macho por la hembra de *Hyla minuta* (Amphibia: Anura). **Acta Zoologica Lilloana**, 41: 81-91.
- HERMOSILLA, B. I.; URBINA, P. A.; CABRERA, P. J. C. 1983. Espermatogenesis 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. e 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). **Leiden, Zool. Meded**, 54(13): 183-216.
- HOPWOOD, D. 1990. Fixation e fixatives. Capítulo 2, 21-42. In: BANCROFT, J. D.; STEVENS, A.: Foreword by DAVID, R. T. 1990. **Theory and practice of histological techniques.** 3ª ed. Edinburgh London Melbourne and New York, 726p.
- HOWARD, R. D. 1978. The evolution of mating strategies in bullfrogs, *Rana catesbeiana*. **Evolution**, 32(4): 850-871.
- 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.
- INGER, R. F.; GREENBERG, B. 1963. The annual reproductive pattern of the *Rana erythraea* in Sarawak. **Physiol. Zool.**, 36: 21-33.

- 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.
- JORGENSEN, C. B. 1986. External and internal control of patterns of feeding, growth and gonadal function in a temperate zone anuran, the toad *Bufo bufo*. **J. Zool.** (London) 216: 211-241.
- JOSHI, B. N.; UDAYKUMAR, K. 2000. Melatonin counteracts the stimulatory effects of blinding or exposure to red light on reproduction in the skipper frog *Rana cyanophlyctis*. **General and Comparative Endocrinology**, 118: 90-95.
- KO, S. K.; KANG, H. M.; IM, W.B, KWON, H. B. 1998. Testicular cycles in three species of Korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa* and *Rana dybowskii*. **General and Comparative Endocrinology**, 111: 347-358.
- LEHNER, P. N. 1996. **Handbook of ethological methods**. Cambridge University Press, United Kingdom, 672p.
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. 2004. Biodiversidade Brasileira, síntese do estado atual do conhecimento. 2º ed. **Contexto**, São Paulo, 176p.
- LILEY, N.R. & STACEY, N.E. 1983. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. (eds.). **Fish Physiology**. Academic Press, Orlando-Flórida, vol. IXB, 477,199p.
- 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.

- LUTZ, B. 1958. **Anfíbios novos e raros das serras costeiras do Brasil**. Mem. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2(56): 373-399.
- MITCHELL, S. L. 1990. The mating system genetically affects offspring performance in Woodhouse's toad (*Bufo woodhouse*). **Evolution**, 44: 502-519.
- OLIVEIRA, C. 1996. **Estudo morfológico do testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado, 131p.
- OLIVEIRA, C., VICENTINI, C. A., TABOGA, S. R. 2003. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia**, 56(1): 75 - 83.
- OLIVEIRA, C.; SANTOS, L. R. S. 2004. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 21(4): 919-923.
- 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.
- PIERANTONI, R.; MINUCCI, R. S.; MATTEO, L. D.; FASANO, S.; VARÍALE, B.; CHIEFFI, G. 1985. Effect of temperature and darkness on the testosterone concentration in the testis of intact frogs (*Rana esculenta*) treated with gonadotropin-releasing hormone analog (HOE 766). **Gen. Comp. Endocrinol.** 58: 128-130.

- 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.
- PRADEIRO, M. J.; ROBINSON, M. D. 1990. Reproduction in the toad *Colostethus triniatus* (Anura: Dendrobatidae) in a northern Venezuela seasonal environmental. **Journal of Tropical Ecology**, 6: 333-341.
- PRADO, C. P. A.; HADDAD, C. B. F. Tamanhos de testículos e modos reprodutivos em Hilídeos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE HERPETOLOGIA, 2º** 2005, Belo Horizonte. **Resumos...**Belo Horizonte, 2005, 1 CD-ROM.
- 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.
- RANDALL, D.;BURGGREN, W.; FRENCH, K. 1997. **Fisiologia animal. Mecanismos e adaptações**. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro.
- 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.
- RASTOGI, R. K.; IELA, L.; SAXNA, P. K.; CHIEFFI, G. 1976. The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. **J. Exp. Zool.**, 196: 151-166.
- ROBINSON, G.; GRAY, T. 1990. Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining. Capítulo 27, 525-562p. In: BANCROFT, J. D.; STEVENS, A.: Foreword by DAVID, R. T. 1990. **Theory and practice of histological techniques**. 3ª ed. Edinburgh London Melbourne and New York, 726p.

- ROSSA-FERES, D. C. 1982. **Estudo sobre a sistemática dos anfíbios**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Zoologia do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola- Campus de Botucatu-Unesp.
- SAIDAPUR, S. K. 1983. Patterns of testicular activity in Indian amphibians. **Indian Rev. Life Sci.** 3: 157-184.
- 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.
- SMITH-GILL, S. J.; BERVEN, K. A. 1980. In vitro fertilization and assessment of male reproductive potential using mammalian gonadotropin-releasing hormone to induce spermiation in *Rana sylvatica*. **Copeia**, 723-728.
- STRUSSMANN, C., PRADO, C. P. A., UETANABARO, M., FERREIRA, V. L. 2000. **Amphibians and reptiles of selected localities in the southern Pantanal floodplains and neighboring cerrado areas, Mato Grosso do Sul, Brasil.**
- TABOGA, S. R. 1990. **Estudo estrutural, ultra-estutural e citoquímico da espermatogênese, com ênfase na espermiogênese de *Hyla rank* (Amphibia, anura, hylidae)**. Campinas, Universidade de Campinas, 1990. 172 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia. Universidade de Campinas.
- TABOGA, S. R., DOLDER, H. 1991. Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Cien. Morfol.**, 8: 66-71

- TELFORD, S. R.; DYSON, M. L. 1990. The effect of rainfall on interclutch interval in painted reed frogs (*Hyperolius marmoratus*). **Copeia**, 3: 644-648.
- THOREAU, H. D. Apollo 11.com. Condições do tempo. Disponível em : <http://www.apollo11.com/index.php>. Acesso em: novembro de 2004.
- 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.
- UDAYKUMAR, K.; JOSHI, B. N. 1996. Ovarian follicular kinetics in response to enucleation and parietal shielding in *Rana cyanophlyctis*. **General and Comparative Endocrinology**, 103: 244-248.
- VERELL, P. A.; 1983. Some problems in the study of anuran pairing patterns. **Oikos**, 41(1): 148-149.
- WAKE, M. H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. the gonads and the fat bodies. **J. Morph.**, 126(3): 291-331.
- WEIBEL, E. R. 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, 12: 131p.
- WOLDA, H. 1978. Seasonal fluctuations in rainfall, food and abundance of tropical insects. **Journal of Animal Ecology**, 47: 369-381.
- WOODWARD, B. D. 1986. Paternal effects on juvenile growth in *Scaphiopus multiplicatus* (the New Mexico spadefoot toad). **Amer. Nat.**, 128: 58-65.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.

VIII - FIGURAS

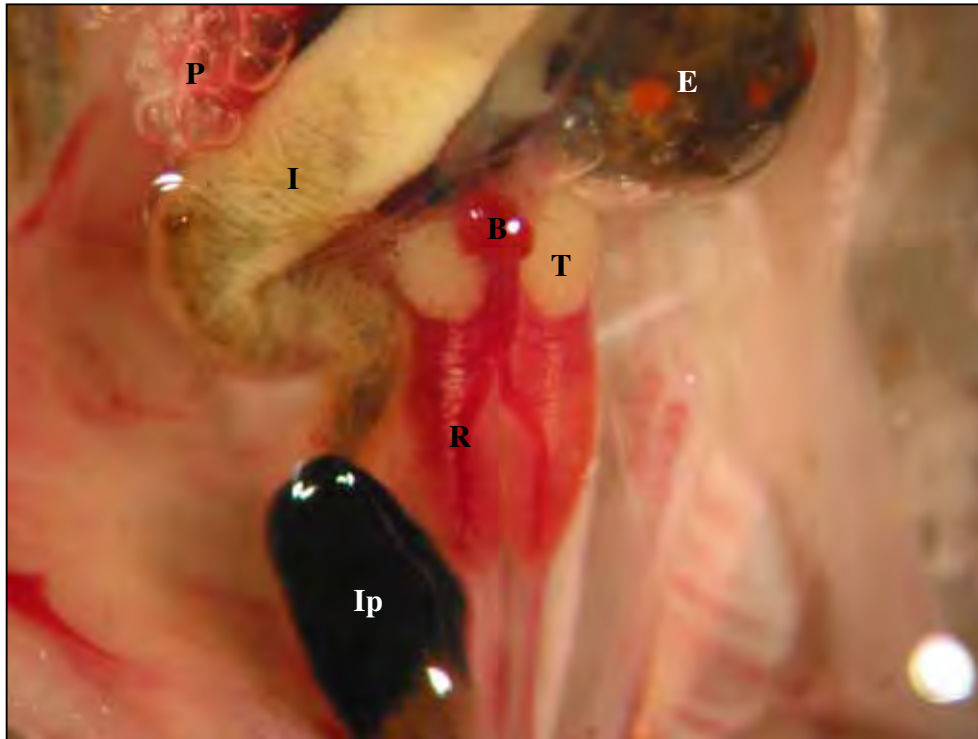


Figura 7: Localização dos testículos de *D. minutus* na cavidade abdominal e sua sintopia com os demais órgãos. E – estômago, P – pulmão, I – intestino, B – baço, T – testículo, R – rim, Ip – porção final do intestino repleto de melanócitos pigmentados. Aumento: 10x

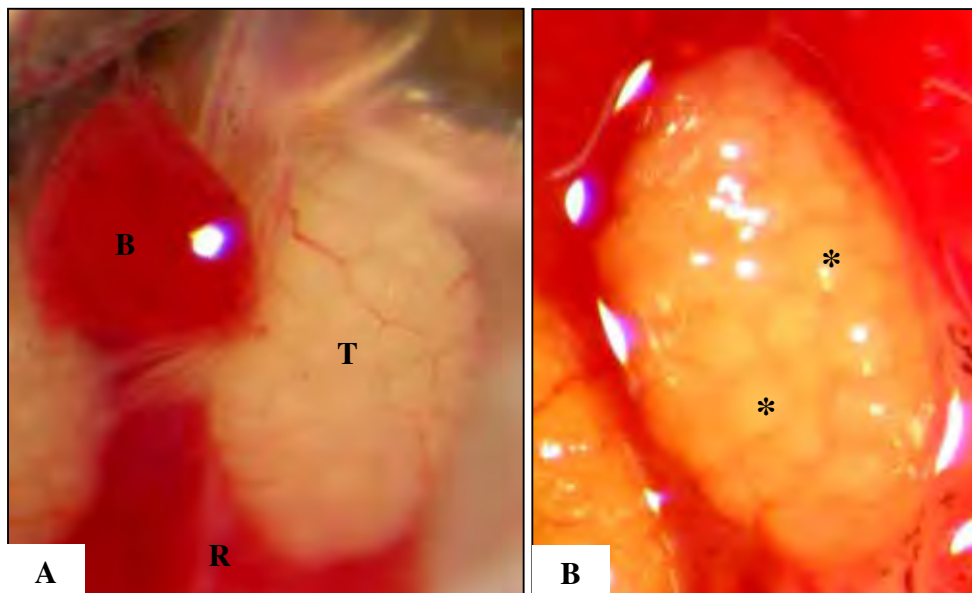


Figura 8: Comprimento (eixo longitudinal: $1,90 \pm 0,13$ mm), forma, coloração dos testículos de *Dendropsophus minutus*. A (aumento: 27,5x) = B – baço, T – testículo, R – rim; B (aumento: 37,5x) = * detalhe mesoscópico de um lóculo seminífero.

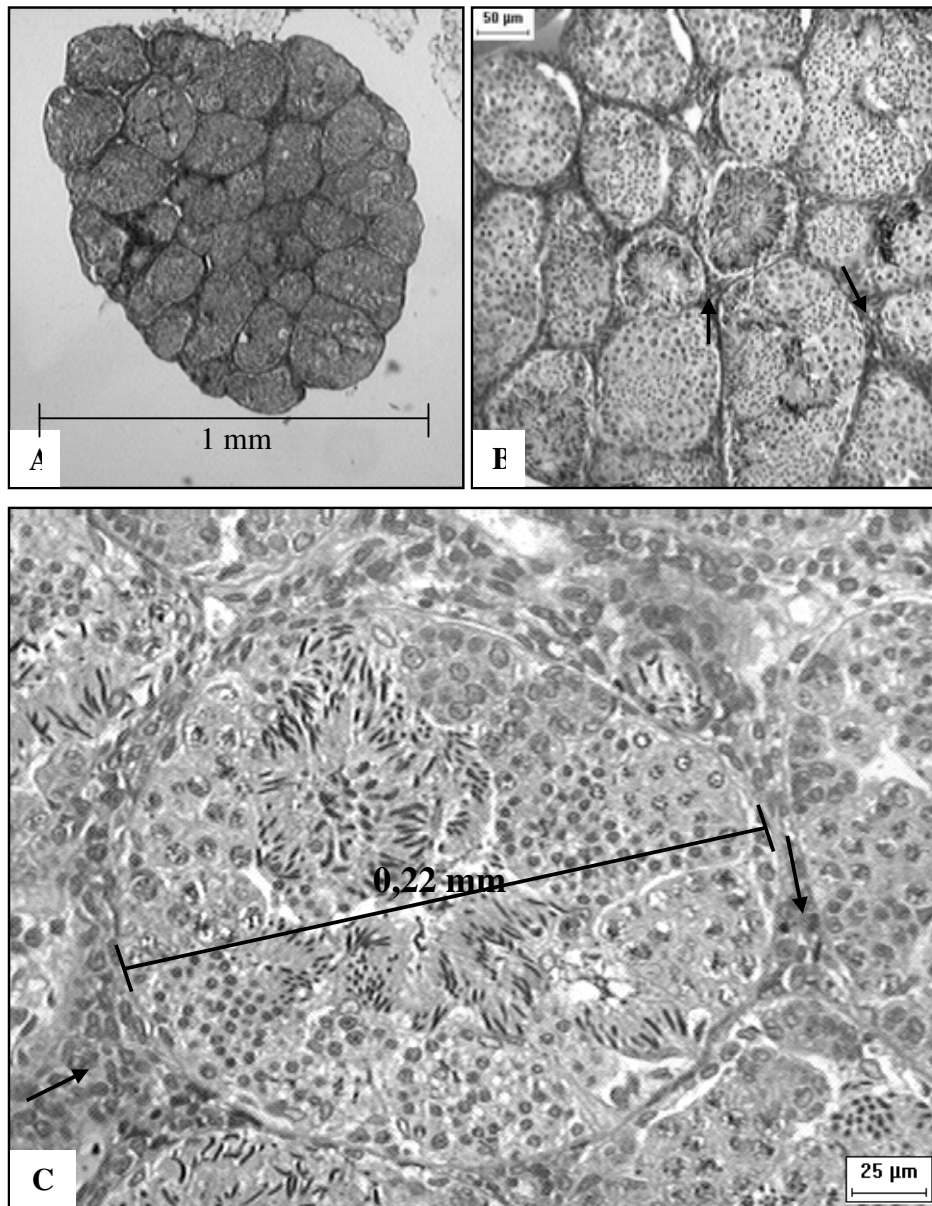


Figura 9: Secção testicular de *Dendropsophus minutus* mostrando sua organização histológica com lóculos seminíferos e tecido interlobular (setas). A: Secção transversal mostrando a organização estrutural dos lóculos; B: lóculos e tecido interlobular; C: Estrutura locular que representa a área média dos lóculos seminíferos ($36012,57 \pm 2128,66 \mu\text{m}^2$) e o diâmetro médio ($221 \pm 13 \mu\text{m}$).

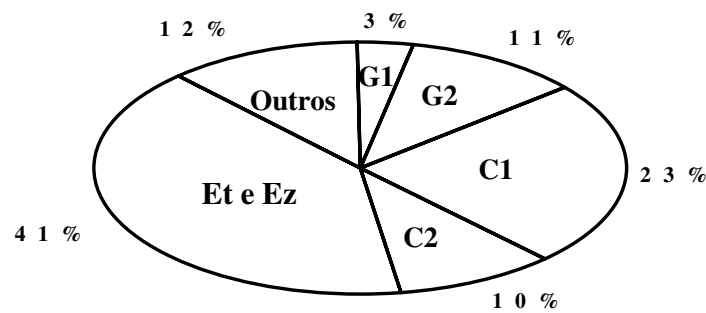


Figura 10: Volume médio que cada tipo celular ocupa em uma área locular média ($36012,57 \pm 2128,66 \mu\text{m}^2$), representada em 100%. G1 – espermatogônia primária, G2 – espermatogônia secundária, C1 – espermatócito primário, C2 – espermatócito secundário, Et e Ez – espermátides e espermatozóides e Outros – espaços do lume locular e demais células.

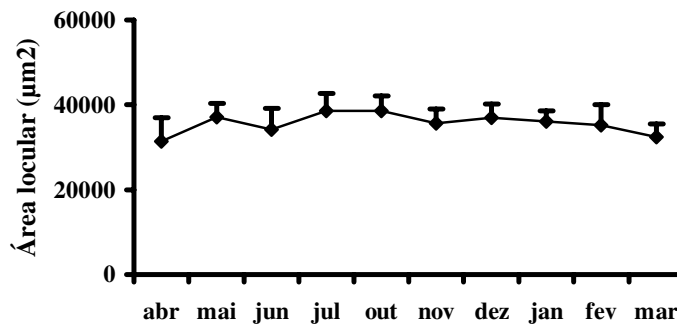


Figura 11: Média ($\pm$ erro padrão) da área locular (μm^2) (One-Way ANOVA; $F=0,76$; $p=0,65$), durante o ciclo reprodutivo.

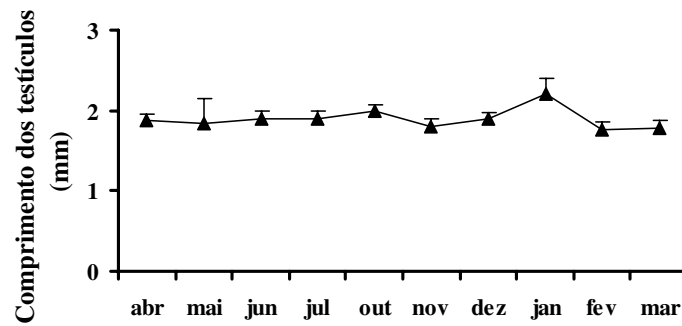


Figura 12: Média ($\pm$ erro padrão) do comprimento (mm) dos testículos de *Dendropsophus minutus* (Kruskal-wallis; $H=11,24$; $p=0,25$), durante o ciclo reprodutivo.

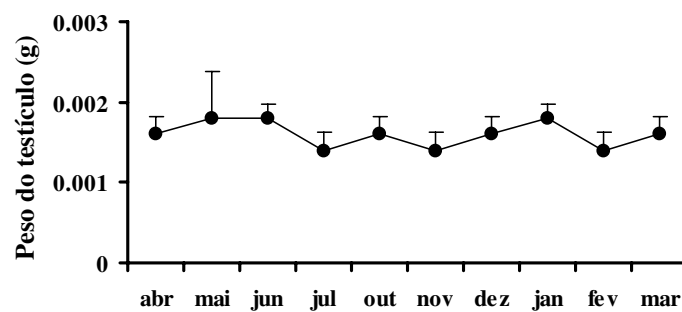


Figura 13: Média ($\pm$ erro padrão) do peso (g) dos testículos de *Dendropsophus minutus* (Kruskal-wallis; $H=3,71$; $p=0,92$), durante o ciclo reprodutivo.

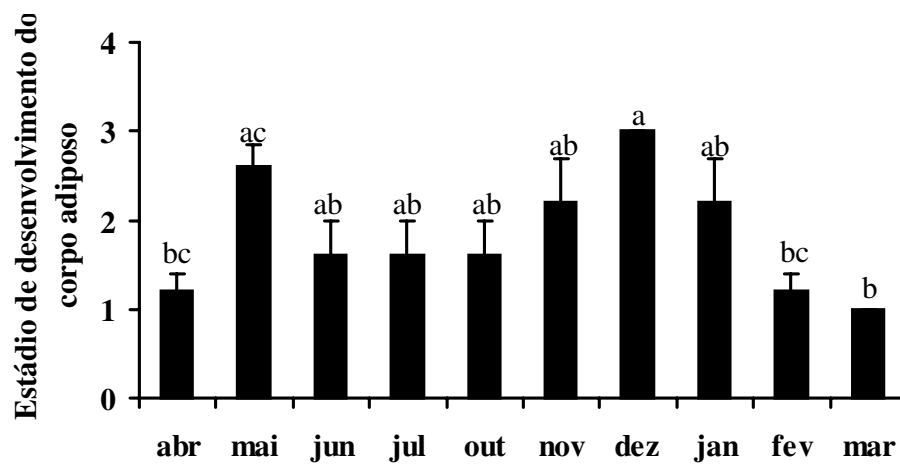


Figura 14: Estádio de desenvolvimento (média $\pm$ erro padrão, $n=5$) do corpo adiposo (Kruskal-Wallis; $H=28,90$, $p=0,00$, completado com Dunn), durante o ciclo reprodutivo. As letras diferentes indicam diferenças estatísticas, mas meses acompanhados de ao menos uma letra são semelhantes entre si.

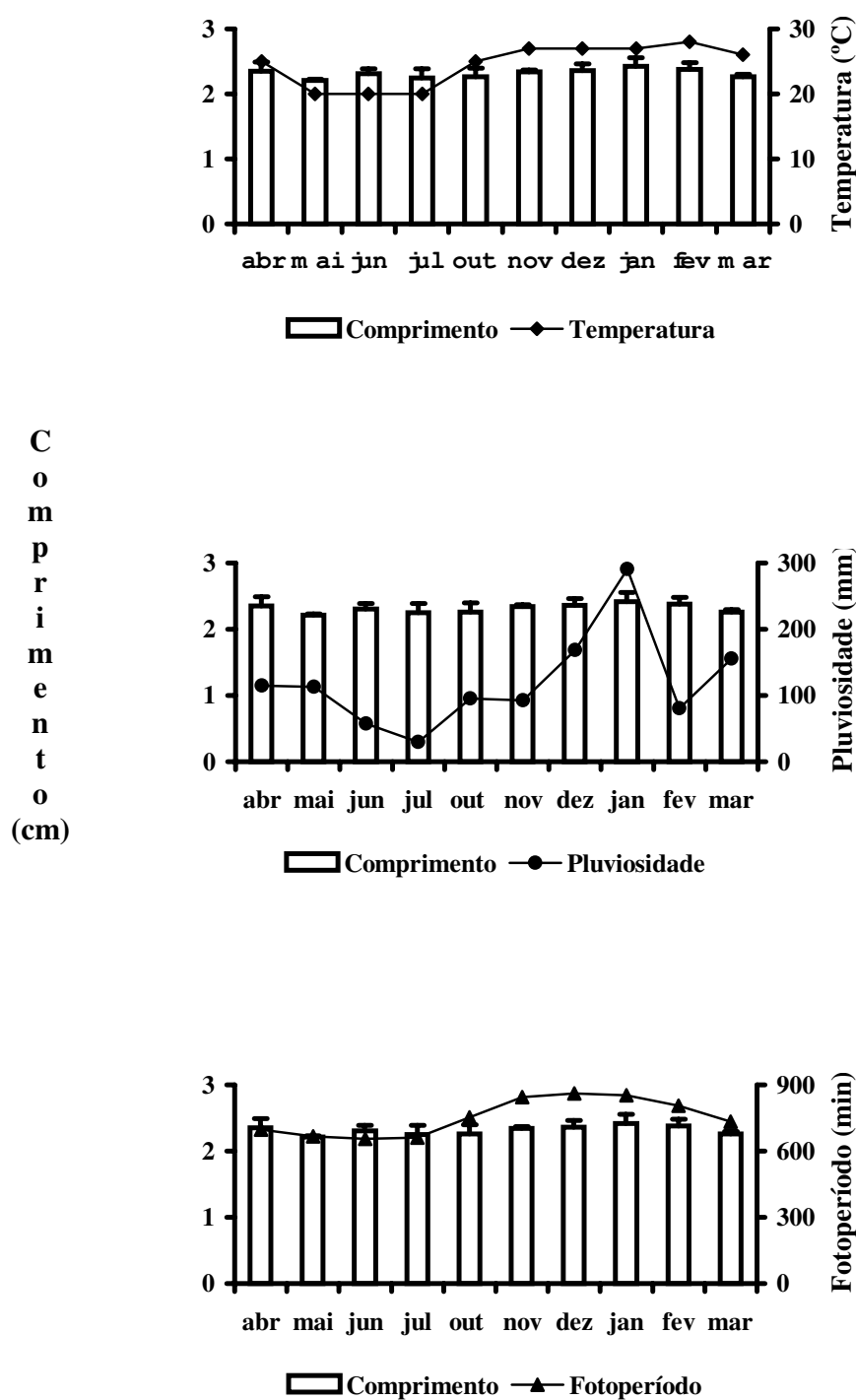


Figura 15: Relação do comprimento animal e as variáveis ambientais (Regressão linear simples; $p < 0,05$) durante o ciclo reprodutivo.

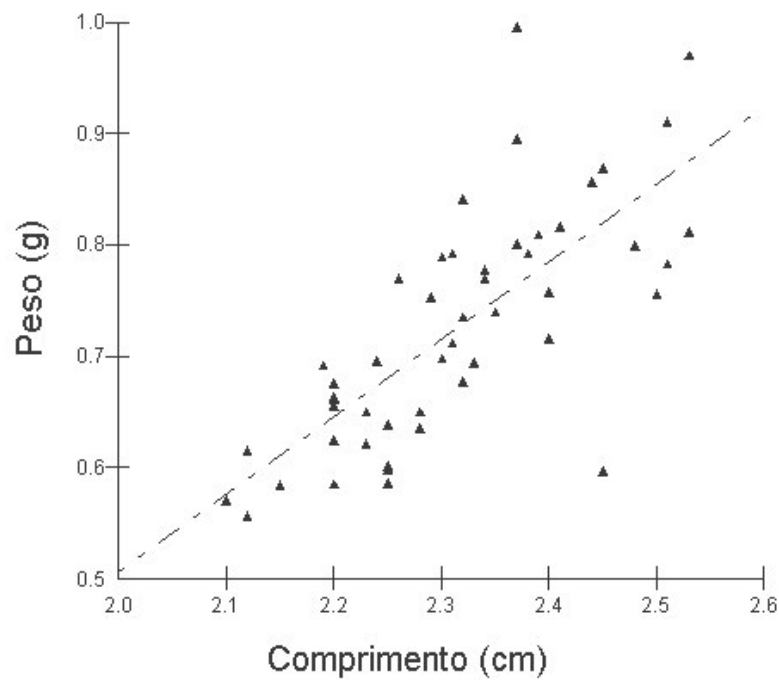


Figura 16: Relação entre comprimento (cm) e peso (g) animal, durante o ciclo reprodutivo (Correlação de Spearman; $t=8,46$, $p=0,00$).

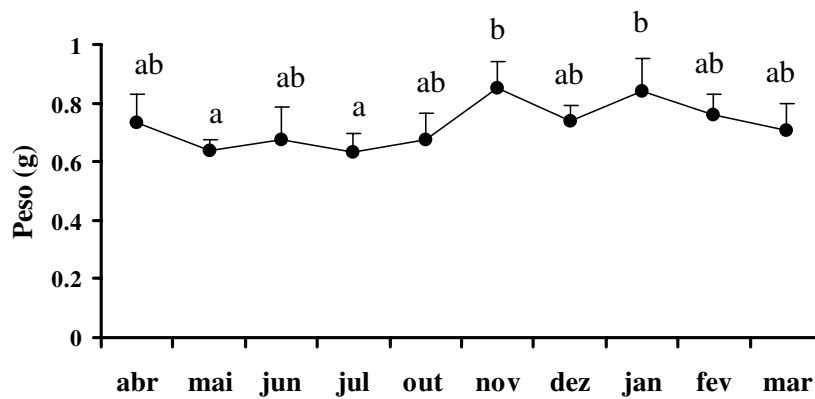


Figura 17: Variação média ($\pm$ desvio padrão) do peso (g) (One-Way ANOVA; $F=3,96$, $p=0,00$), durante o ciclo reprodutivo. As letras diferentes indicam diferenças estatísticas, mas meses acompanhados de ao menos uma letra são semelhantes entre si.

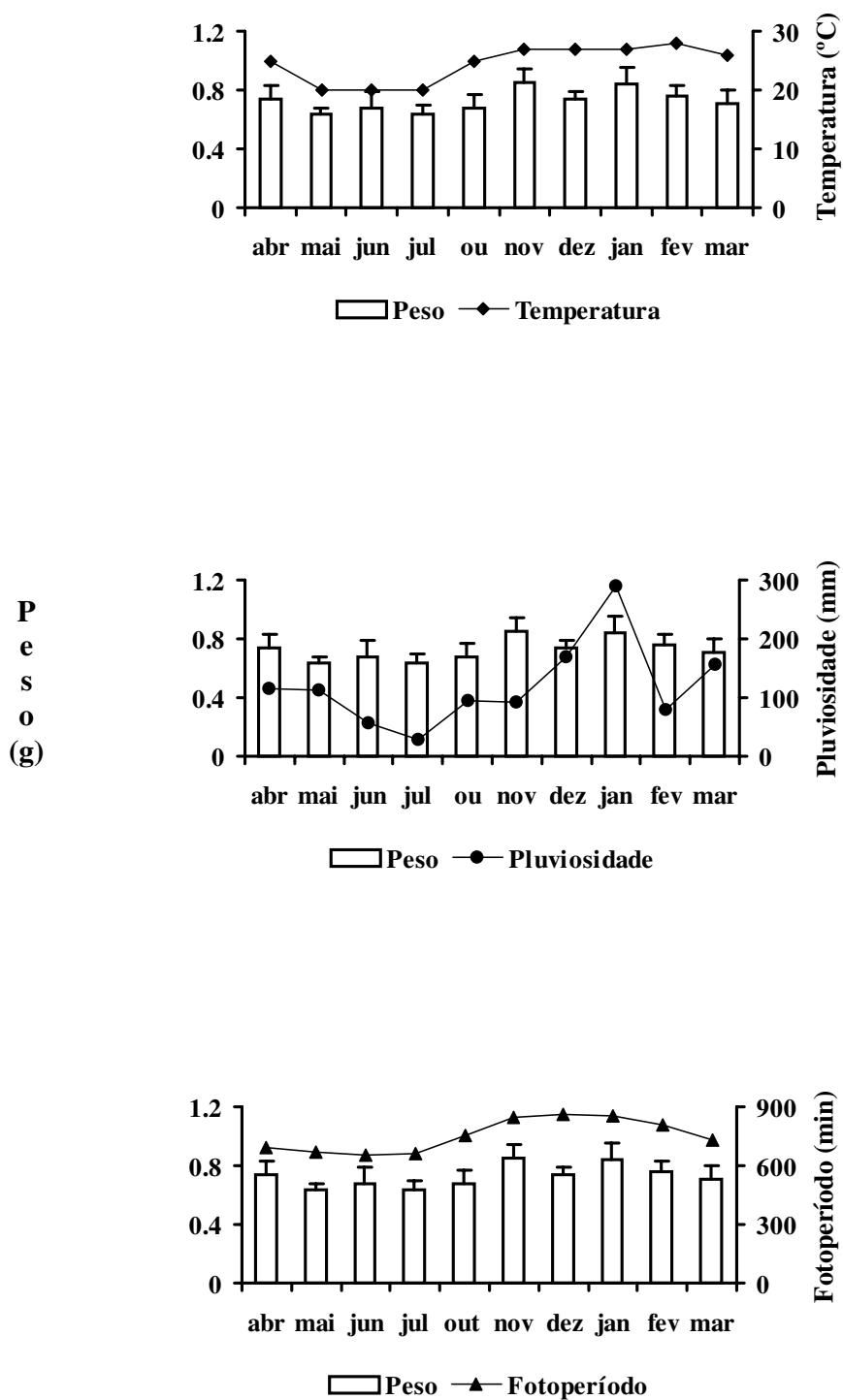


Figura 18: Relação do peso do animal e as variáveis ambientais (Regressão linear simples; $p < 0,05$) durante o ciclo reprodutivo.

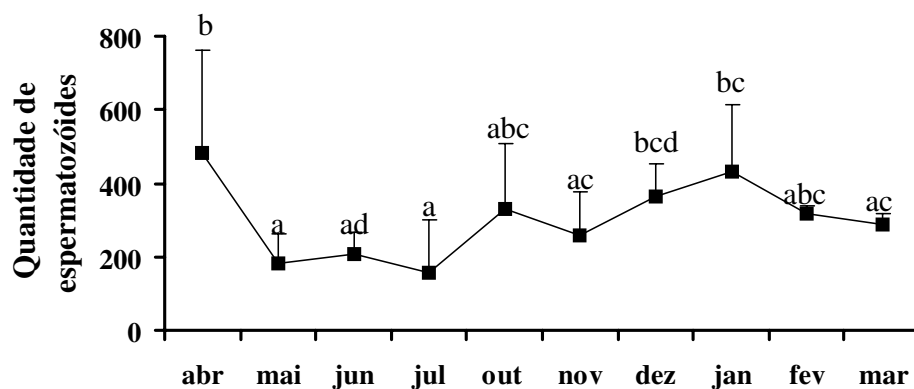


Figura 19: Número médio ($\pm$ desvio padrão) de células em estágio final de desenvolvimento (espermatozoides) (Kruskal-Wallis, $H=21,42$, $p=0,01$, completado com LSD), durante o ciclo reprodutivo. As letras diferentes indicam diferenças estatísticas, mas valores acompanhados de ao menos uma letra são semelhantes entre si.

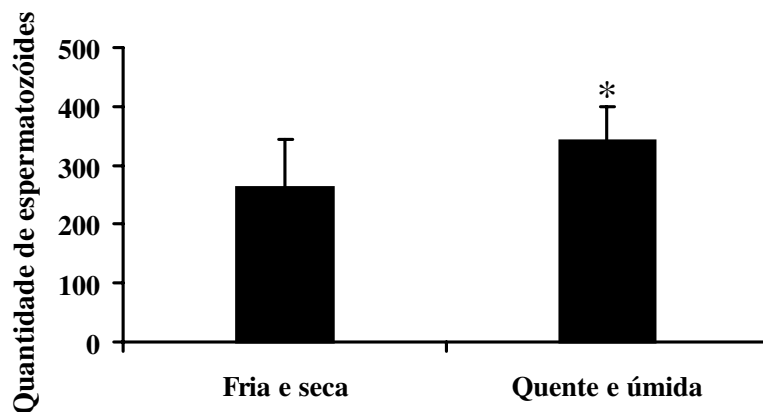


Figura 20: Média ($\pm$ erro padrão=5) da quantidade de células em estágio final de desenvolvimento (espermatozoides), quando comparado entre as estações. Diferença estatística (*), (Mann-Whitney: $U=179,00$; $p=0,00$).

Q
u
a
n
t
i
d
a
d
e

d
e

E
s
p
e
r
m
a
t
o
z
ó
i
d
e

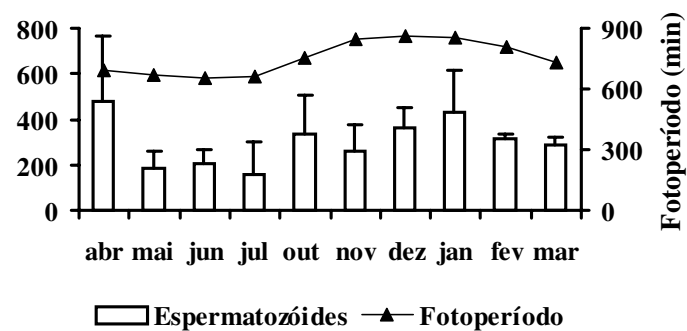
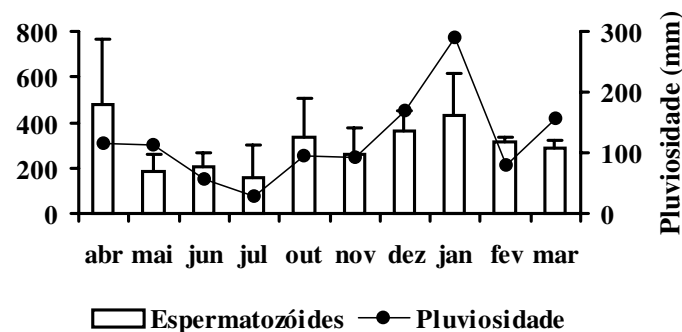
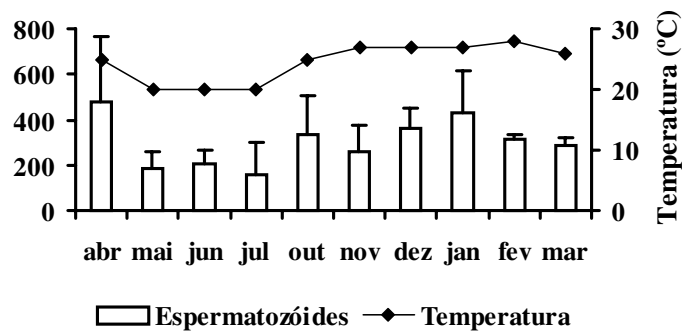


Figura 21: Relação da quantidade média de células em estágio final de desenvolvimento (espermatozoides) e as variáveis ambientais (Regressão linear simples; $p < 0,05$).

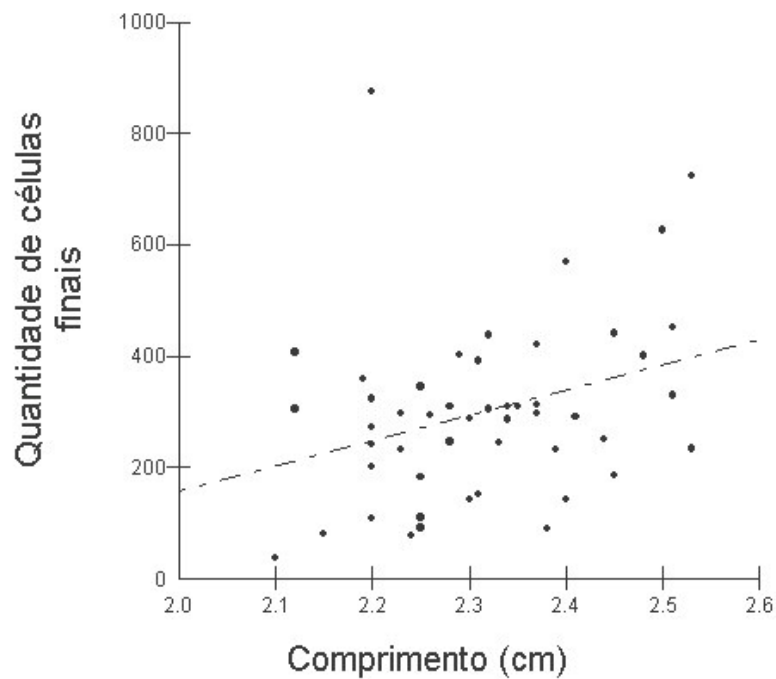


Figura 22: Relação entre comprimento do animal e a quantidade de células em estágio final de desenvolvimento (espermatozóides), durante o ciclo reprodutivo (Correlação de Spearman; $t=2,21$, $p=0,03$).

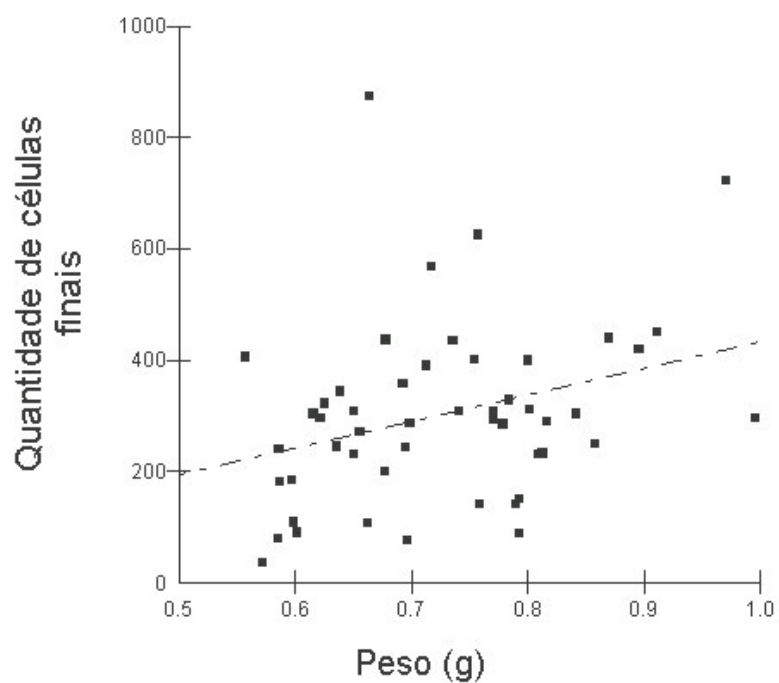


Figura 23: Relação entre o peso do animal e a quantidade de células em estágio final de desenvolvimento (espermatozóides)(Correlação de Spearman, $t=2,29$, $p=0,02$)

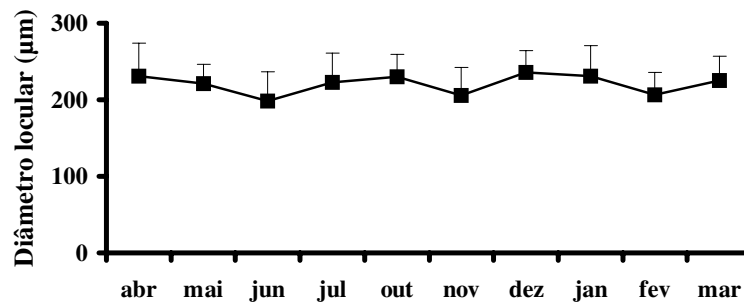


Figura 24: Média ($\pm$ desvio padrão) do diâmetro locular (μm) (One-Way ANOVA; $F=0,67$, $p=0,72$), durante o ciclo reprodutivo.

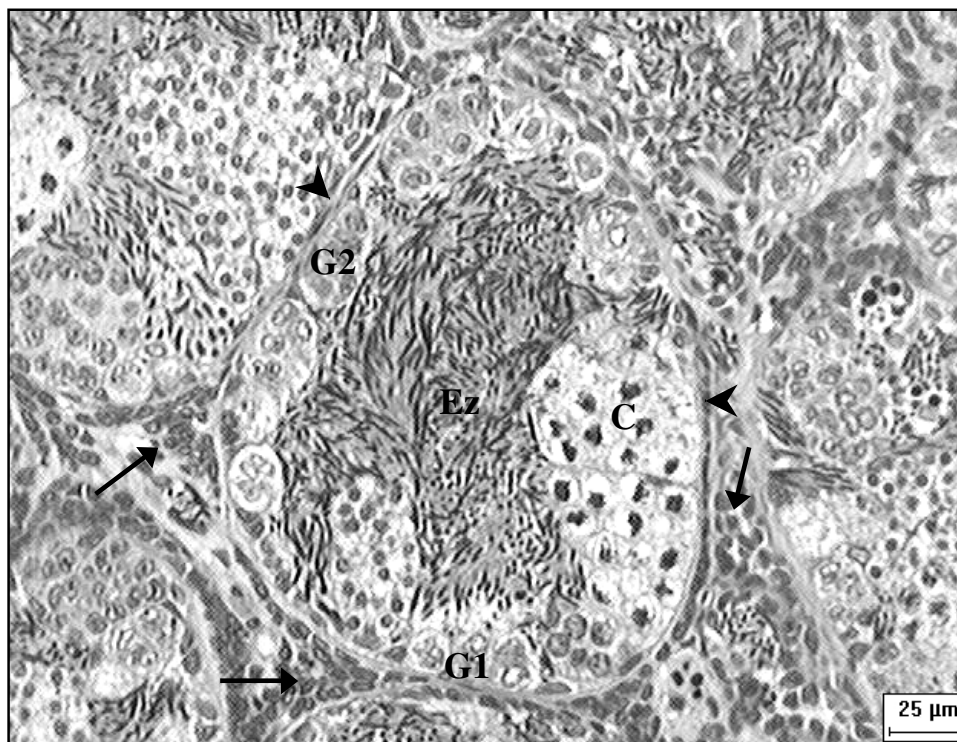


Figura 25: Aspecto geral da arquitetura testicular de *Dendropsophus minutus*. G1 – espermatogônia primária; G2 – espermatogônia secundária; C – espermatócitos em diferenciação; Ez – espermatozóides; parede locular (cabeça de seta), espaço interlocular (seta) com células de Leydig e capilares.

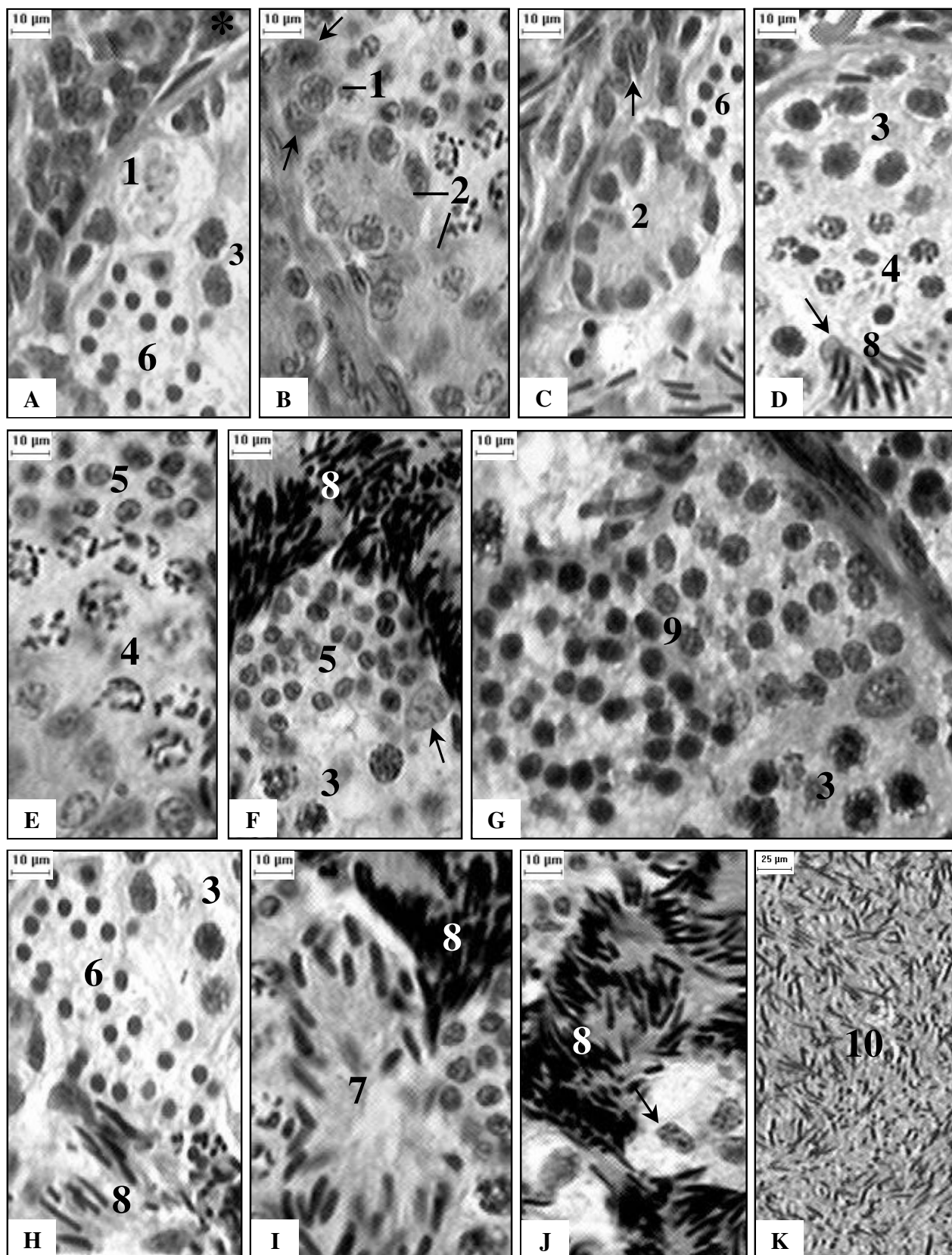


Figura 26: Estádios da diferenciação celular durante a espermatogênese de *Dendropsophus minutus*. 1 – espermatogônia primária; 2 – espermatogônia secundária; 3 – espermatócito primário; 4 – prófase da primeira divisão meiótica; 5 – espermatócitos secundários; 6 – espermátides redondas; 7 – espermátides alongadas em fase inicial; 8 – feixe de espermátides alongadas; 9 – transição de espermatócitos primários em espermatócitos secundários; 10 – espermatozóides; célula de Sertoli (seta).

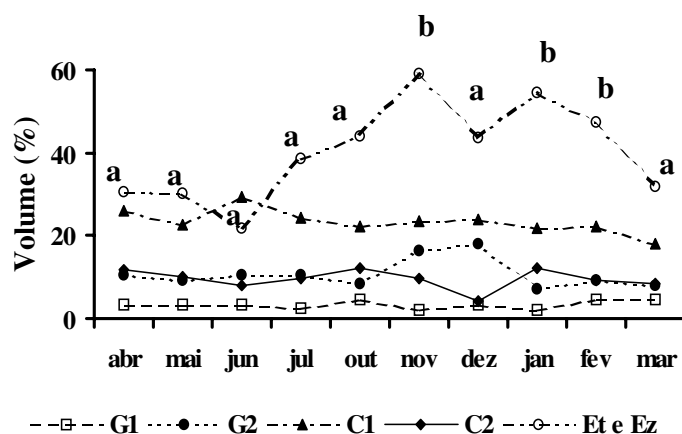


Figura 27: Distribuição do volume médio ocupado pelos diferentes tipos celulares num lóculo seminífero. Apenas o volume médio ocupado pelas espermátides e espermatozóides apresentaram diferença significativa (One-Way ANOVA: $F=5,46$; $p=0,00$, completado com Tukey) ao longo ciclo reprodutivo. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas, mas valores acompanhados ao menos uma letra, são semelhantes entre si. G1: espermatogônia primária; G2: espermatogônia secundária; C1: espermátócito primário; C2: espermátócito secundário; Et e Ez: espermátides e espermatozóides.

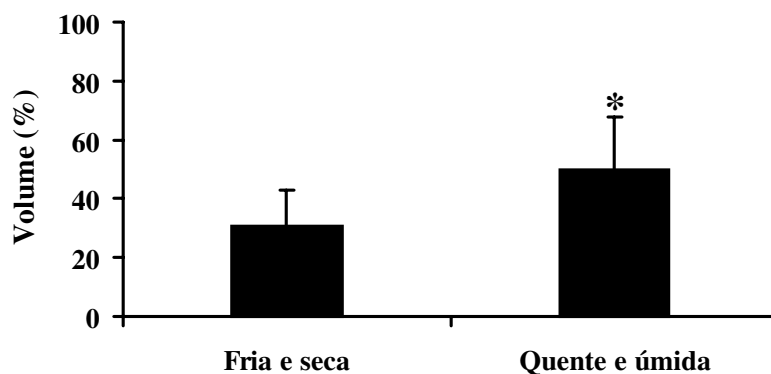


Figura 28: Média ($\pm$ desvio padrão) do volume médio ocupado pelas espermátides e espermatozóides quando comparado entre as estações. Diferença estatística (*). (Teste t *Student*: $t=-5,83$; $p=0,00$).

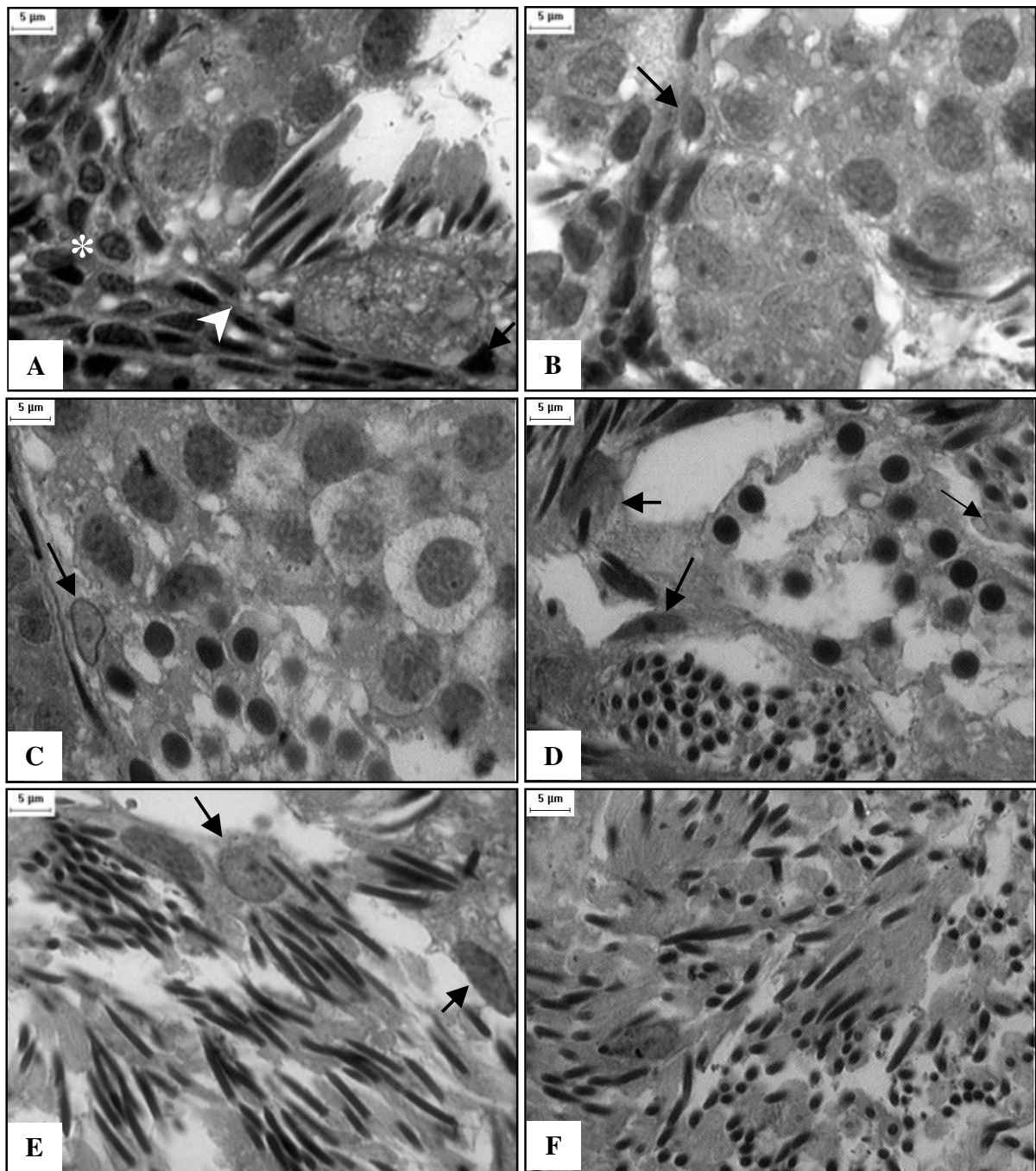


Figura 29: Célula de Sertoli (setas) com as células germinativas , constituindo o arranjo em cisto e feixes das espermatídes finais. A: células tronco (espermatogônia I) associada com uma Sertoli; B e C: células germinativas organizadas em cistos; D-E: organizadas em feixes; F: alguns espermatozóides livres no lume após liberação da formação fascicular.

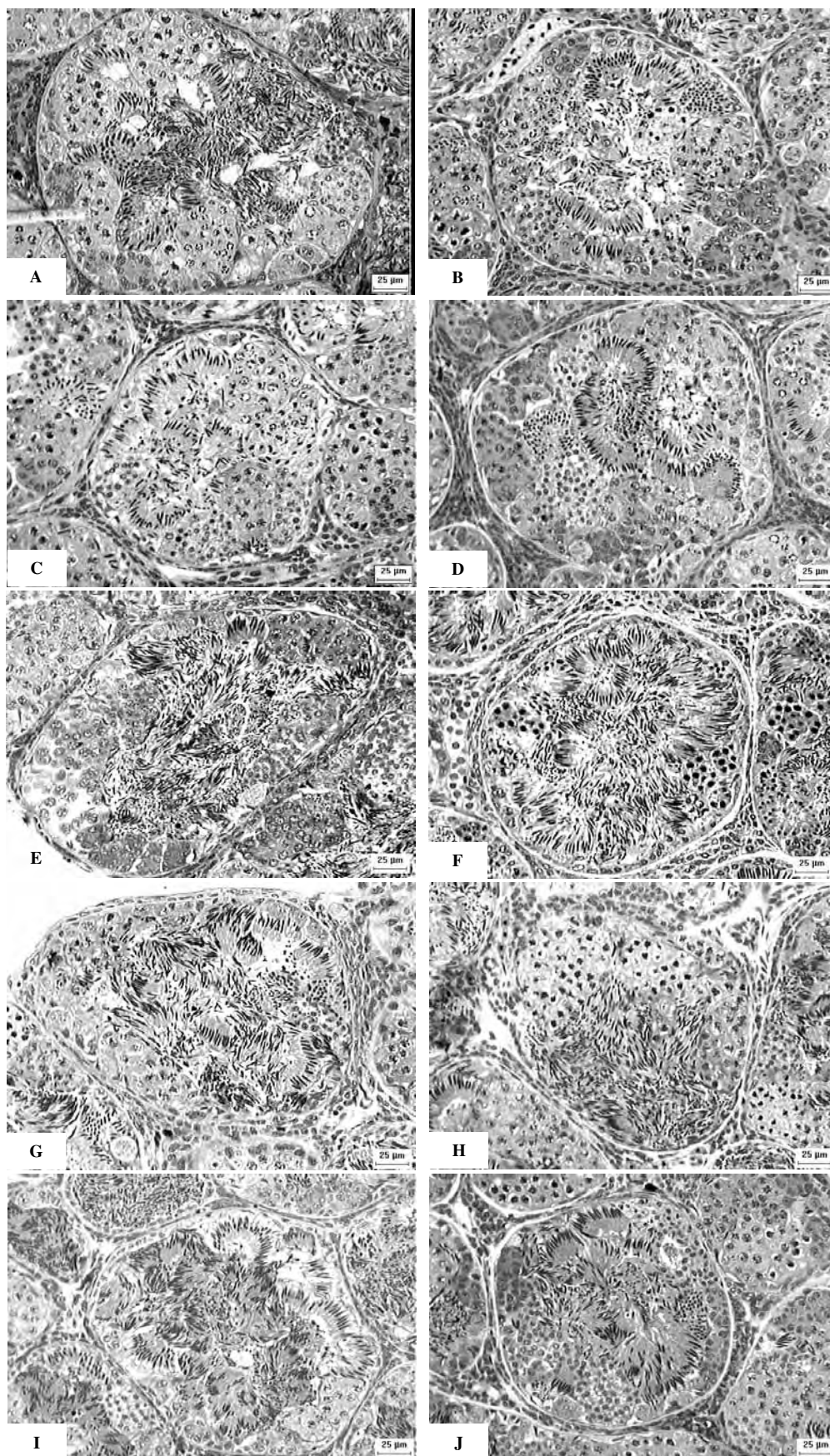


Figura 30: Fotomicrografias resumindo os aspectos dos lóculos seminíferos de *Dendropsophus minutus* durante o ciclo reprodutivo. A – abril; B – maio; C – junho; D – julho; E – outubro; F – novembro; G – dezembro; H – janeiro, I – fevereiro, J – março. (Obs: agosto e setembro meses não amostrados)

Tabela 1: Valores de p resultantes das análises de Correlação e Regressão Linear Simples entre os parâmetros biométricos, morfométricos e climáticos analisados. C A - comprimento animal; P A - peso animal; C Ad - corpo adiposo; P G - peso gônada; C G – comprimento da gônada; C F – células em estágio final de desenvolvimento (espermatozóides); D L - diâmetro locular; T (°C) - temperatura; P – pluviosidade (mm); F – fotoperíodo (min).

	C A	P A	C Ad	P G	C G	C F	D L	T °C	P (mm)	F
C A	---	0,00	0,90	0,85	0,93	0,03	0,11	0,00	0,03	0,00
P A	0,00	---	0,87	0,66	0,70	0,02	0,26	0,00	0,00	0,00
C Ad	0,90	0,87	---	0,68	0,57	0,83	0,55	0,66	0,30	0,06
P G	0,85	0,66	0,68	---	0,03	0,62	0,63	0,55	0,60	0,62
C G	0,93	0,70	0,57	0,03	---	0,67	0,37	0,91	0,07	0,53
C F	0,03	0,02	0,83	0,62	0,67	---	---	0,00	0,00	0,02
D L	0,11	0,26	0,55	0,63	0,37	---	---	0,60	0,17	0,65
T °C	0,00	0,00	0,66	0,55	0,91	0,00	0,60	---	---	---
P (mm)	0,03	0,00	0,30	0,60	0,07	0,00	0,17	---	---	---
F	0,00	0,00	0,06	0,62	0,53	0,02	0,65	---	---	---

Tabela 2: Valores de p resultantes das análises de Correlação e Regressão Linear Simples entre o volume ocupado pelas espermátides e espermatozóides (Volume Et e Ez) e os demais parâmetros analisados. C A - comprimento animal; P A - peso animal; C Ad - corpo adiposo; P G - peso gônada; C G – comprimento da gônada; C F – células em estágio final de desenvolvimento (espermatozóides); D L - diâmetro locular; T (°C) - temperatura; P – pluviosidade (mm); F – fotoperíodo (min).

	C A	P A	C Ad	P G	C G	C F	D L	T °C	P (mm)	F
Volume Et e Ez	0,11	0,01	0,62	0,14	0,90	0,38	0,83	0,02	0,30	0,00