

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual
de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 em
populações de biomas distintos

Rafaela Maria Moresco

DOUTORADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Rafaela Maria Moresco

Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual
de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 em populações de
biomas distintos

São José do Rio Preto
2013

Rafaela Maria Moresco

Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual
de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 em populações de
biomas distintos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto
2013

Moresco, Rafaela Maria

Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual de *Physalaemus*
cuvieri Fitzinger, 1826 em populações de biomas distintos / Rafaela Maria
Moresco. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

112 f. ; 14 il. ; 30 cm.

Orientador: Classius de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Anuros. 2. Ciclo Reprodutivo. 3. Melanócitos. 4. Toxicologia I.
Oliveira, Classius. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 597.8

Rafaela Maria Moresco

Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual
de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 em populações de
biomas distintos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Lia Raquel de Souza Santos
IF Goiano – Rio Verde

Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
UFG – Goiânia

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira
UNESP – Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a. Selma Maria Almeida Santos
Butantan – São Paulo

São José do Rio Preto
2013

“Tenho a impressão de ter sido como uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais que sempre incentivaram e priorizaram a educação de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado:

Ao meu orientador Prof. Dr. Classius de Oliveira por todos esses anos de dedicação para com a minha formação profissional. Agradeço as oportunidades que tive no Laboratório de Anatomia além do incentivo e compreensão no momento que escolhi me afastar do Laboratório e começar a dar aula. Agradeço pela confiança que depositou em mim quando aceitou ser meu orientador no mestrado permanecendo no doutorado. Por todos os auxílios em coletas, leitura e idéias nos trabalhos que escrevi. Muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Aos professores Dr. Rodrigo Zieri e Dra. Maria Tercília de Azeredo Oliveira por participarem da banca de qualificação, com comentários e sugestões pertinentes para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal que ao longo de todos estes anos ajudaram muito no meu crescimento e amadurecimento profissional. Em especial ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto e Profa. Dra. Lilian Casatti que foram coordenadores do programa durante este período e me auxiliaram muitas vezes sempre de maneira prestativa e atenciosa. Também ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pelas valiosas considerações

feitas durante o desenvolvimento do meu trabalho. Muito obrigada, devo a todos vocês minha formação profissional!

Ao Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana, pelo excelente empenho em me ajudar com a interpretação dos dados para aplicação dos testes estatísticos adequados.

Ao Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia, pelo auxílio com a metodologia, análise e interpretação das técnicas para utilização dos marcadores moleculares.

Ao técnico do laboratório de Microscopia e Microanálises (Ibilce) Luiz Roberto Falleiros pelo suporte nos métodos histológicos. Aos servidores técnicos da Seção de Pós-Graduação do Ibilce e demais funcionários da Instituição por serem sempre tão eficientes.

À UNESP por proporcionar a infra-estrutura que precisei para desenvolver meu trabalho.

Às minhas colegas Estela Rodrigues Pinto e Verônica Thiemi Tsutae de Sousa pelo auxílio na coleta dos casais de *Eupemphix nattereri*.

Aos meus colegas de laboratório que convivi durante esses anos Juliane Freitas, Rodrigo Zieri, Lia Raquel Santos, Thaíse Massura e Lilian Belussi, além dos demais colegas de outros laboratórios pelas inúmeras ajudas e bons momentos que passamos juntos!

Aos meus grandes amigos e/ou familiares que mesmo distantes sempre estiveram me apoiando: Jonatha Lima, Fernando Treco, Indianara Carlotto, Ana Colombo, Roberto Lui, Elaine Schornobay, Jocicleia Konerat, Leonardo Paiz, Lucas Baumgartner, Allysson Martins e Fernandes Luzzi. Muito obrigada por

todos os auxílios através de palpites, coletas, manutenção do experimento em campo e muitas discussões enriquecedoras.

Aos meus amados pais Luiz e Lai, por representarem para mim um grande exemplo de vida. Por me proporcionarem a oportunidade de estudar, entendendo e incentivando a continuidade da minha formação, até que eu conseguisse alcançar meu objetivo maior. Vocês foram fundamentais nas escolhas que fiz e sou muito feliz pela pessoa que me tornei. Muito obrigada! Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos Mariana e Rafael! Que sempre conseguiram me fazer desligar das preocupações quando eu estava precisando disso! Amo vocês dois exatamente como são e tenho muito orgulho de ser a irmã de vocês: grandes exemplos para mim!

E por fim ao meu amado esposo Vladimir! Acho que jamais conseguiria listar o quanto você me ajudou e fez parte deste trabalho e da minha formação: desde o projeto até a redação final, passando por frustrações da vida, conquistas, coletas com muitos mosquitos, alegrias, temperaturas baixas, ansiedades, novidades, dúvidas, falta de chuvas, propostas, discussões... Agradeço todos os conselhos que você passou para mim durante todos estes anos. Obrigada por sua infinita paciência e compreensão com a minha personalidade explosiva. Você sempre será fonte de inspiração e exemplo de caráter que seguirei, e prometo: depois da defesa eu não vou reclamar de mais nada. Te amo muito!

Sumário

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	III
Resumo	IV
Abstract	VI
Introdução Geral	01
Referências	08
Resultados e Discussão	12
Capítulo 1: The pioneering use of ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>) in Neotropical anurans: preliminary assessment of genetic diversity in populations of <i>Physalaemus cuvieri</i> (Amphibia, Leiuperidae)	13
Abstract	14
Introduction	15
Material and methods	17
Results	19
Discussion	21
References	24
Table and Figures	28
Capítulo 2: Ciclo reprodutivo em populações de <i>Physalaemus cuvieri</i> Fitzinger, 1826 de dois distintos biomas Brasileiros ameaçados: uma discussão integrando biologia estrutural e ecologia em um contexto espacial	32
Resumo	33
Introdução	35
Materiais e métodos	37

Resultado	40
Discussão.....	43
Referências	50
Tabelas e Figuras.....	56
Capítulo 3: Variação da área pigmentada por melanina em testículos de duas espécies de Leiuperidae: respostas na espermatogênese e espermiogênese.....	62
Resumo.....	63
Introdução.....	64
Materiais e métodos.....	67
Resultado	70
Discussão.....	72
Referências	77
Figuras.....	85
Capítulo 4: Alta frequência incomum de hermafroditismo em anuros Neotropicais: um caso relatado na rã cachorro <i>Physalaemus cuvieri</i> Fitzinger, 1826.....	88
Resumo.....	89
Introdução.....	90
Materiais e métodos.....	92
Resultado	94
Discussão.....	95
Referências	100
Tabela e Figuras	108
Considerações finais	111

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Locais de coleta das populações de *P. cuvieri*. (A) Fragmento de Mata Atlântica, Município de Marmeleiro, PR; (B) Fragmento de Cerrado, região de São José do Rio Preto, SP..... 06

Figura 2: (A) Espécime de *P. cuvieri*; (B) Casal em amplexo de *E. nattereri*. Barra = 1cm..... 06

Figura 3: Caixa utilizada no experimento para manutenção dos animais vivos durante o período regenerativo. No detalhe as medidas e disposição dos espaços. 07

Capítulo 1

Figura 1: Map of sampling sites of *P. cuvieri* populations in Brazil: Marmeleiro-PR (●), Nova Itapirema-SP (✦), Eng. Schmidt-SP (▲) and Talhado-SP (■)..... 29

Figura 2: Analysis of *P. cuvieri* populations through ISSR marker: (A) agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from the amplification of DNA samples using the primer (GGAC)₃T; (B) Neighbor-joining dendrogram based on Jaccard similarity index with 10,000 bootstrapping resamplings. (C) Scatter plot at main coordinates based on Jaccard similarity index. (L) 100 bp ladder, (●) Marmeleiro-PR, (✦) Nova Itapirema-SP, (▲) Eng. Schmidt-SP and (■) Talhado-SP 30

Figura 3: Linear regression between F_{ST} and geographic distance among *P. cuvieri* populations..... 31

Capítulo 2

Figura 1: Secção histológica transversal de testículo de *P. cuvieri* evidenciando tipos celulares registrados no período reprodutivo: 1 = espermatogônia I, 2 = espermatogônias II, 3 = espermatócitos I, 4 = espermatócitos II; 5 = espermátides I; 6 = espermátides II, 7 = espermatozóides e * = Formação em cisto espermátogênico. Coloração H/E. Barra = 30µm. Indivíduo de Mata Atlântica..... 59

Figura 2: Diagrama de ordenação produzido pela Análise de Correspondência Canônica. (+) Tipos celulares: Epg I = espermatogônia I, Epg II = espermatogônia II, Esc I = espermatócito I, Esc II = espermatócito II; Epti I = espermátide I; Epti II = espermátide II e Epz = espermatozóide. Ciclo Reprodutivo:  = Período Reprodutivo,  = Período Pré-Reprodutivo,  = Período Regenerativo. Variáveis ambientais representadas por vetores: P = Precipitação, T = Temperatura, U = Umidade Relativa e V = Velocidade do Vento..... 60

Figura 3: Secções histológicas transversais de testículos de *P. cuvieri*: (A) Período Reprodutivo, 1 = espermatozóides; (B) Período Regenerativo, 2 = espermatogônias I; (C) Período Pré-Reprodutivo, 3 = espermátide I e 4 = espermátide II. Coloração: H/E. Barra = 30µm. Indivíduos coletados no Cerrado..... 61

Capítulo 3

Figura 1: Secção histológica transversal de testículo de *P. cuvieri* evidenciando pigmentação (seta branca) ao longo do ciclo reprodutivo de *Physalaemus cuvieri*: (A) anatomia testicular, lóculos seminíferos escurecidos pela presença de melanócitos (*); (B) Período pré-reprodutivo, caracterizado pela grande quantidade de espermátide I (seta preta) e espermátide II (cabeça de seta) presentes no interior dos lóculos; (C) Período reprodutivo, caracterizado por intensa presença de espermatozóides no lúmen locular (seta preta); (D) Período regenerativo, caracterizado pelo alto número de espermatogônias I (seta preta) que evidenciam muitas divisões mitóticas além de espermatogônias II (cabeça de seta) e espermatócitos I indicando início da primeira divisão meiótica (*). Indivíduos de Mata Atlântica..... 85

Figura 2: Teste de ANOVA: variação da pigmentação testicular ao longo do ciclo reprodutivo de *Physalaemus cuvieri*. (A) Logaritmo da Média da área ocupada por melanócitos testiculares em um total de $1239.58\mu\text{m}^2$ (com desvio padrão) (ANOVA: $F_{2,27}=762.77$ e $p < 0.05$; Tukey: $p < 0.05$; letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes). (B) Logaritmo do produto entre Média da área ocupada por melanócitos testiculares em um total de $94121.37\mu\text{m}^2$ e peso da gônada (com desvio padrão) (ANOVA: $F_{2,27}=19734$ e $p < 0.05$; Tukey: $p < 0.05$; letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes)..... 86

Figura 3: Correlação linear: variação da pigmentação testicular após a ejaculação de *Eupemphix nattereri*. (A) Ausência de correlação entre área ocupada por espermátides e área ocupada por melanócitos ($r=0.044$, $p > 0.05$). (B) Ausência de correlação entre área ocupada por espermátides e área ocupada por melanócitos ($r=-0.05$, $p > 0.05$)..... 87

Capítulo 4

Figura 1: Secções histológicas transversais de testículos de *P. cuvieri* evidenciando epitélio seminífero e ovócitos (testículo intersexual). (A) Células germinativas masculinas e femininas no mesmo corte, com (*) lóculos seminíferos contendo vários morfotipos de células do epitélio germinativo masculino, (1) lóculo seminífero contendo ovócitos, e (2) corte longitudinal de um ductulo eferente intra-testicular; (B) Lóculo seminífero contendo simultaneamente células germinativas masculinas e femininas: (1) Ovócito, (2) Espermatogônia I, (3) Espermatócito I, (4) Espermátide; (C) Lóculo seminífero contendo apenas células femininas: (1) Ovócitos; (D) Lóculos seminíferos com epitélio típico do sexo masculino e destaque para intensa presença de (*) espermatozóides no lúmen. Coloração H/E. Barra (A) = $60\mu\text{m}$, Barra (B, C, D) = $30\mu\text{m}$ 109

Figura 2: Análise através do marcador ISSR para dois grupos de *P. cuvieri* (1) animais que apresentavam ovócitos nos testículos e (2) animais de uma mesma desova. Perfis eletroforéticos em gel de agarose amplificados com o primer $(\text{GGAC})_3\text{C}$ 110

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Pairwise comparisons of <i>Physalaemus cuvieri</i> populations	28
---	----

Capítulo 2

Tabela 1: Caracterização dos períodos que compõem o ciclo reprodutivo de <i>Physalaemus cuvieri</i> nos biomas de Mata Atlântica e Cerrado.....	56
--	----

Tabela 2: Resultado do teste de Monte Carlo para Autovalores e Correlação espécie-ambiente.....	57
--	----

Tabela 3: Área dos morfotipos celulares (μm^2 = Média e Desvio Padrão) nos períodos que compõem o ciclo reprodutivo de <i>Physalaemus cuvieri</i> nos biomas de Mata Atlântica e Cerrado.	58
---	----

Capítulo 4

Tabela 1: Resultado do Relatório de Ensaio Físico-Químico para análise de água coletada em corpo permanente no Município de Marmeleiro, PR	108
---	-----

RESUMO

A reprodução pode ser descrita como o conjunto de atributos fisiológicos, morfológicos e comportamentais que permitem o sucesso de uma espécie através da máxima descendência sob condições ambientais específicas. Em anfíbios, além de sujeito a um controle hormonal, e considerando o aporte genético, o ciclo reprodutivo é também influenciado por fatores ambientais que determinam o ciclo gametogênico ao longo de um ano. O presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética em duas populações de *P. cuvieri* pertencentes aos biomas de Mata Atlântica e do Cerrado com o marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Além disso, foi caracterizado o ciclo reprodutivo destas populações, relacionando as variações morfológicas gonadais com os fatores climáticos precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento, através de uma Análise de Correspondência Canônica, bem como relacionar a quantidade de pigmentos presente nos testículos com os períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e regenerativo através de ANOVA. Também se analisou em indivíduos de *Eupemphix nattereri* a relação entre a espermiogênese e a quantidade de pigmentação testicular. As populações de *P. cuvieri* pertencentes aos dois biomas revelaram índice de diferenciação genética (F_{ST}) > 0.288 , o que mostra que estas duas populações são altamente diferenciadas geneticamente. Foram caracterizados 7 tipos celulares representando o epitélio germinativo. A variância total ao longo do ciclo reprodutivo foi de 23 %, com os dois primeiros eixos responsáveis, respectivamente, por 68,7% e 10,2% da variância total acumulada na média ponderada dos tipos celulares com relação às 4 variáveis ambientais analisadas. O teste de permutação de Monte Carlo indicou que os tipos celulares e a precipitação foram significativamente correlacionados. No final do período regenerativo, caracterizado pelo tipo celular Espermatogônia I, inicia a gametogênese estimulada pelo

aumento da precipitação, sucedendo-se então o período pré-reprodutivo caracterizado pelos tipos celulares Espermátide I e II. O início do período reprodutivo, caracterizado pelo elevado número de Espermatozóides, foi determinado pelo aumento da temperatura e da umidade relativa, assim como diminuição da velocidade do vento. Com relação à pigmentação testicular, foi verificado um aumento significativo durante o período regenerativo, enquanto não houve mudança da pigmentação relacionada com o processo de espermiogênese, provavelmente devido à produção custosa de melanina contra a ação do estresse oxidativo tornar-se viável apenas para a manutenção da integridade das células germinativas durante o período regenerativo até o próximo período reprodutivo. Na população da Mata Atlântica, quatro espécimes apresentaram característica de gônada intersexual com a presença de espermatozóides e ovócitos. A análise de água constatou a presença do agrotóxico Dieldrin em concentração acima da referência recomendada. Este agrotóxico atua como desregulador endócrino, podendo ser o responsável pela alta frequência de gônadas intersexuais observadas. O presente trabalho verificou que, embora ao longo do ano o comportamento reprodutivo de vocalização, amplexo e a presença de desovas não tenham ocorrido nos mesmos meses nos diferentes biomas, a composição e a modificação dos morfotipos celulares de cada período em resposta às mudanças climáticas coincidiram, sendo que a diversidade genética pôde permitir uma alta plasticidade relacionada à sobrevivência e reprodução em ambientes tão variados, embora a estratégia reprodutiva seja a mesma, caracterizada por um ciclo reprodutivo potencialmente contínuo..

Palavras-chave: Anuros, Ciclo Reprodutivo, Marcador Molecular, Melanócitos, Toxicologia

ABSTRACT

Reproduction can be described as the set of physiological, morphological, and behavioural attributes that allow for the success of a species through maximum offspring under specific environmental conditions. In amphibians, as well as being under hormonal control, and in view of their genetic constitution, the reproductive cycle is also influenced by environmental factors that determine the gametogenetic cycle throughout the year. The aim of this study was to characterize the reproductive cycle of *Physalaemus cuvieri* in populations from the Mata Atlântica region and the Cerrado region, comparing the morphological gonad variations to the climatic factors of precipitation, temperature, relative humidity and wind speed, through a Canonical Correspondence Analysis, as well as comparing the quantity of pigments present in the testis with the pre-reproductive, reproductive and regenerative periods using the ANOVA, and estimating the genetic diversity between the populations of the two biomes with genetic markers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). The relationship between spermatogenesis and the quantity of testicular pigmentation in individuals of *Eupemphix nattereri* has also been analyzed. Seven cellular types representing the germinal epithelium were characterized. The total variance throughout the reproductive cycle was of 23%, with the first two axes accountable, respectively by 68.7% and 10.2% of the total variance accumulated in the weighted average of two cellular types with relation to the four analyzed environmental variables. The Monte Carlo permutation test indicated that cellular type and precipitation were significantly correlated. At the end of the regenerative period, characterized by the cellular type spermatogonia I, the stimulated gametogenesis began due to the increase in precipitation, followed by the pre-reproductive period characterised by the cellular type spermatid I and II. The beginning of the reproductive period, characterized by the elevated

number of spermatozooids, was determined by the increase in temperature and relative humidity, as well as by the reduction in wind speed. Regarding testicular pigmentation, a significant increase was seen during the regenerative period, whilst there was no change in pigmentation relating to the process of spermiogenesis, probably due to the costly production of melanin to act against the effects of oxidative stress only becoming viable for maintaining the integrity of the germinative cells during the regenerative period until the next reproductive period. The *P. cuvieri* populations belonging to the two biomes revealed an index of genetic differentiation (F_{ST}) > 0.288, which shows that these two populations are genetically highly dissimilar. In the population from Mata Atlântica, four specimens presented the characteristic of intersexual gonads presenting spermatozooids and oocytes. The water analyses indicate the presence of the agrototoxin Dieldrin in concentrations above the recommended dose. This agrototoxin acts as endocrine deregulator, possibly being responsible for the high frequency of intersexual gonads observed. This study verified that even though throughout the year the reproductive behavior of vocalisation, amplexus, and the presence of spawn had not occurred in the different biomes during the same months, the composition and the modification of the cellular morphotypes during each period in response to the climatic changes did coincide, being that genetic diversity can allow for a high plasticity concerning the survival and reproduction in such varied environments. However, the reproductive strategy was the same, characterized by a potentially continuous reproductive cycle.

Keywords: Anurans, Melanocytes, Molecular Marker, Reproductive Cycle, Toxicology

INTRODUÇÃO

Os anfíbios ocorrem em quase todos os continentes do mundo, não habitando somente regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas. Esta capacidade se deve principalmente ao ciclo de vida que envolve, na maioria das espécies, fase larval aquática e fase adulta terrestre. Além disso, apresentam diversos modos reprodutivos, especialmente os anuros, o que facilitou ao grupo a ocupação de ambientes variados (Duellman & Trueb, 1994). A fauna de anfíbios possui aproximadamente 7.000 espécies, das quais 6.200 são anuros, sendo a América da Sul a região que mais abriga espécies (Frost, 2013).

Em função das suas características morfológicas, principalmente relacionadas com a permeabilidade da pele, os anfíbios são altamente suscetíveis às alterações ambientais, o que lhes confere o status de ótimos indicadores da qualidade ambiental (Napoli & Caramaschi, 2000). Durante o período reprodutivo, as espécies de anuros tendem a se reunir nas adjacências de corpos d'água, permanentes ou temporários, onde vocalizam para atraírem as fêmeas que depositam seus ovos no ambiente aquático (Duellman & Trueb, 1994). Muitas vezes algumas espécies coexistem partilhando o mesmo espaço acústico, porém apresentando cantos de anúncio com estruturas e frequências distintas (Cardoso, 1986; Cardoso & Vielliard, 1990; Abruñosa *et al.*, 2001). Anuros que coexistem em um dado local geralmente utilizam recursos de maneira diferente, o que pode contribuir para a manutenção da diversidade e diminuição da competição interespecífica (Giaretta, 1994).

Muitos estudos estão voltados para interpretar o papel de pressões seletivas tais como competição, predação e condições ambientais sobre os padrões de distribuição temporal e espacial de algumas espécies em termos de sua importância no controle das populações (Skelly, 1997; Silva & Rossa-Feres, 2007; Juncá *et al.*, 2008; Sanches &

Busch, 2008). Vários fatores podem influenciar a estrutura de uma população (Bertoluci, 1998; Brommer *et al.*, 1998; Khonsue *et al.*, 2002), e a determinação e as mudanças ao longo dos anos facilita os estudos sobre as flutuações populacionais e suas causas naturais, sendo importante na obtenção de informações sobre reprodução, mortalidade, longevidade e outros fatores importantes na dinâmica de populações (Toft, 1980).

A estratégia reprodutiva de uma espécie representa o conjunto de atributos fisiológicos, morfológicos e comportamentais que levam ao número máximo de descendentes considerando-se a condição ambiental e a diversidade genética existente na população (Duellman & Trueb, 1994). Em machos de anuros, a gametogênese pode ser do tipo contínua em espécies que habitam zonas tropicais, e descontínua em espécies encontradas nas zonas temperadas apresentando um discreto período de reprodução; já a gametogênese potencialmente contínua é caracterizada pela interrupção parcial na produção de gametas em determinadas estações do ano, com as espermatogônias primárias continuando sensíveis à estimulação dos fatores responsáveis por tal evento (Lofts, 1974).

Algumas espécies por terem uma distribuição mais ampla, isto é, ocorrerem em diferentes biomas, acabam tornando-se mais interessantes para estudos comparativos. Uma destas espécies é *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 conhecida popularmente como rã cachorro, devido à vocalização que possui. Ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia e possivelmente em planícies ao sul da Venezuela. No Brasil está presente nas regiões sul, sudeste e nordeste, distribuindo-se, portanto, em ambientes com características climáticas bem distintas onde a quantidade e distribuição de chuvas e amplitudes térmicas diferem como na Caatinga, Cerrado e Matas (Nimer, 1989).

O comprimento total desta espécie varia de 24 a 32 mm. A coloração dorsal é variável, usualmente com tonalidades de castanho e verde com manchas ou linhas escuras, apresentando glândula cutânea semelhante à mancha circular escura, com centro claro e

larga faixa lateral escura. É uma espécie com reprodução restrita às estações chuvosas, que utiliza ambientes permanentes e temporários para desovar, utilizando sítios alternativos apenas em agregações superiores a 50 machos (Barreto & Andrade, 1995). Os machos vocalizam no nível da água, abrigados na base da vegetação emergente, porém em agregados com densidade superior a 50 machos vocalizam desabrigados da vegetação (Bertoluci & Rodrigues, 2002). Os ovos são depositados em ninhos de espuma e eclodem cerca de 70 horas após a desova, com desenvolvimento larval de 45 dias, característica esta que possibilita a ocupação de ambientes temporários (Kwet & Di-Bernardo, 1999; Frost, 2013). Não existem dados sobre a idade da primeira reprodução para o gênero *Physalaemus*, mas provavelmente os indivíduos de *P. cuvieri* se reproduzem na primeira estação chuvosa após a metamorfose (Andrade, 1995).

Os testículos de *P. cuvieri* são órgãos pares ovóides organizados em unidades menores chamadas de lóculos seminíferos. Nesta estrutura é onde ocorre a gametogênese, sendo delimitadas por tecido conjuntivo frouxo, e entre os lóculos existe um tecido formado por células de Leydig, fibroblastos, vasos sanguíneos, ductos eferentes e melanócitos (Oliveira *et al.*, 2002).

Os cromatóforos são células contendo grânulos de pigmentos e estão presentes principalmente na derme e epiderme dos animais. Estas células podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo pigmentar, sendo a mais conhecida denominada melanócito, que são células grandes e irregulares, e no seu conteúdo citoplasmático localizam-se os pigmentos (melanina) armazenados em grânulos denominados melanossomos, sendo a própria célula que sintetiza esses pigmentos (Zieri *et al.*, 2007). Estas células são encontradas em diversos órgãos internos de anuros, porém esta característica não é única dos anfíbios, pois para todas as Classes de vertebrados já foi registrada a presença de pigmentação visceral constituindo o sistema pigmentar extracutâneo (Galván *et al.* 2011).

Os melanócitos podem ser classificados de acordo com sua localização em melanócitos clássicos, presentes na cútis, e que possuem origem embrionária a partir de melanoblastos oriundos da crista neural que migram através da via dorso-lateral para as diferentes regiões da pele; e melanócitos não-clássicos, presentes no sistema pigmentar extracutâneo oriundos de melanoblastos que apresentaram diferente destino embrionário que não a via dorso-lateral (Brito & Kos, 2008).

Diversos estudos já mostraram a presença de melanócitos em testículos de vertebrados como peixes (Louiz *et al.*, 2009), anfíbios (Zieri *et al.*, 2007; Provette *et al.*, 2012), répteis (Guillette *et al.*, 1983), aves (Hore, 1994; Galván *et al.*, 2011) e mamíferos (Poole & Lawton, 2009). A pigmentação visceral é estudada com enfoque em vários ângulos, inclusive buscando caracterização taxonômica. Em estudos com Dendrobatidae, Grant (2006) relata a presença de melanócitos nos testículos de *Colostethus panamensis* com diferente pigmentação entre os antímeros. Já em Leiuperidae, vários estudos mostram que um grande número de células pigmentadas estão presentes na cápsula e no interstício testicular, conferindo uma tonalidade marrom escura às gônadas, visto em *Physalaemus cuvieri* (Oliveira *et al.*, 2002), *Physalaemus fuscomaculatus* (Aoki, 1969; Zieri, 2004), *Eupemphix nattereri*, *Physalaemus olfersii* e *Pseudopaludicola falcipes* (Oliveira & Zieri, 2005; Zieri *et al.*, 2007). Entretanto, espécimes de *Physalaemus marmoratus* apresentam diferente pigmentação entre os antímeros (Franco-Belussi *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Através do presente trabalho comparamos, em diversos aspectos, populações de *P. cuvieri* pertencentes à Mata Atlântica e Cerrado:

- Determinamos a diversidade genética das duas populações com o marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*);

- Caracterizamos o ciclo reprodutivo destas populações, relacionando as variações morfológicas gonadais com os fatores climáticos precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento, através de uma Análise de Correspondência Canônica;

- Relacionamos a quantidade de pigmentos presente nos testículos com os períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e regenerativo através de ANOVA. Além disso, analisamos em indivíduos de *Eupemphix nattereri* a relação entre a espermiogênese e a quantidade de pigmentação testicular.

- Analisamos indivíduos que apresentaram gônadas intersexo pertencentes ao bioma Mata Atlântica e relacionamos esta característica com a presença de contaminantes na água.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em dois fragmentos pertencentes a biomas distintos: Mata Atlântica e Cerrado (Fig. 1A, B). Foram feitas análises do ciclo reprodutivo das duas populações de *P. cuvieri* (Fig. 2A) relacionando os morfotipos celulares da espermatogênese com as variáveis ambientais destes biomas, durante os três períodos do ciclo reprodutivo ao longo de um ano: período reprodutivo, período regenerativo e período pré-reprodutivo. Foi verificada ainda a relação existente entre as mudanças morfológicas nas gônadas, intrínsecas a espermatogênese, durante estes três períodos e a presença de pigmentação testicular. A relação entre a presença de pigmentação nas gônadas e a espermiogênese foi feita com animais que haviam ejaculado, para isto, outra espécie de Leiuperidae: *Eupemphix nattereri*, foi utilizada uma vez que o número de espécimes em amplexo durante o período reprodutivo é grande (Fig. 2B).

Todos os animais coletados foram encaminhados para laboratório (Licença Permanente IBAMA: 18573-1). Em cada experimento os espécimes foram anestesiados e

levados a óbito por saturação em Benzocaína e abertos por laparotomia, seguindo o Guia para o Cuidado e o Uso dos Animais de Laboratório – Unesp (Protocolo 001/06 – CEEA).

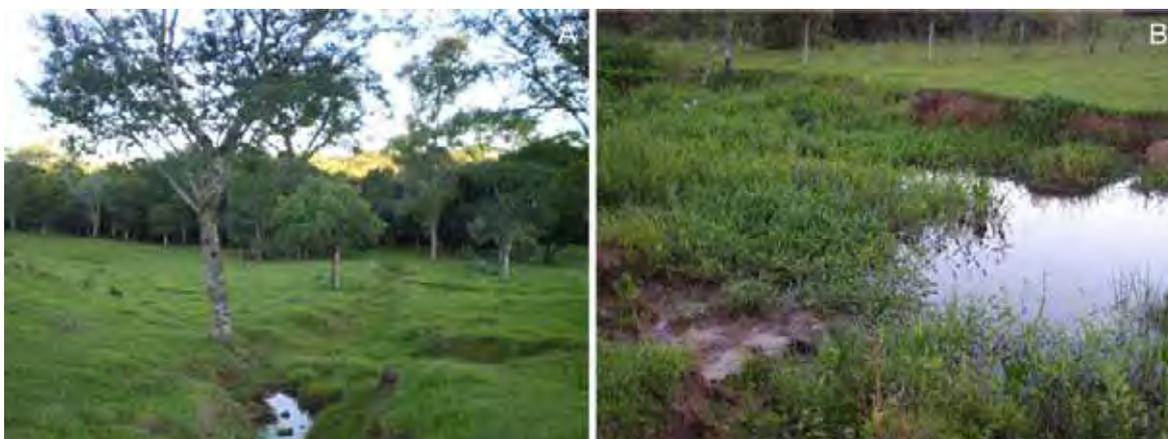


Figura 1: Locais de coleta das populações de *P. cuvieri*. (A) Fragmento de Mata Atlântica, Município de Marmeleiro, PR; (B) Fragmento de Cerrado, região de São José do Rio Preto, SP.

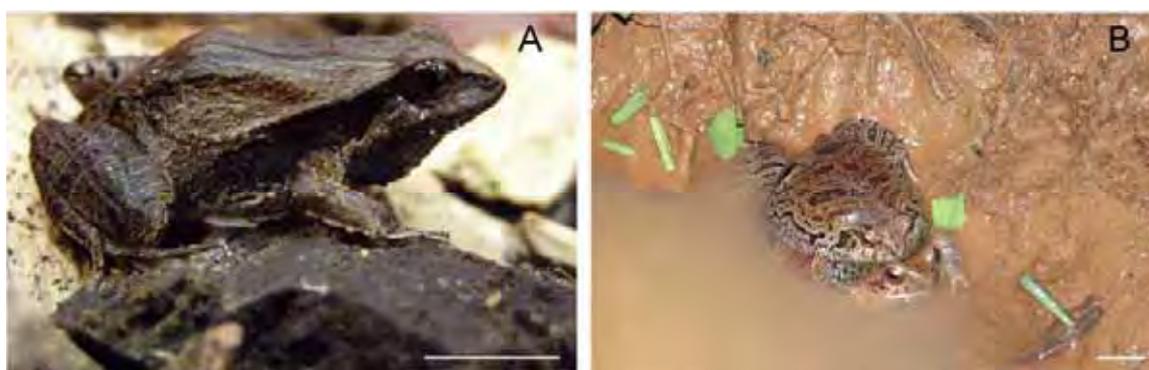


Figura 2: (A) Espécime de *P. cuvieri*; (B) Casal em amplexo de *E. nattereri*. Barra = 1cm

As coletas foram realizadas da seguinte forma em cada bioma: (1) 5 indivíduos no período pré-reprodutivo, caracterizado por poucos machos vocalizando em corpos d'água, ausência de ninhos de espuma característicos da espécie em campo, período de primavera-início de verão; (2) 5 indivíduos no período reprodutivo, caracterizado por muitos machos vocalizando em corpos d'água, presença de ninhos de espuma, período de verão; (3) 5 indivíduos no período regenerativo, caracterizado por machos sem atividade reprodutiva e

alimentar, período de inverno e outono. Para conseguir o material biológico de animais no período regenerativo, após a coleta dos indivíduos em campo ao final do período reprodutivo, estes foram mantidos vivos em caixas feitas com armação de ferro e envolvidas por tela de aço de 4 mm entre nós adjacentes, com dimensões de 75cm x 50cm x 50cm, onde permaneceram vivos até o inverno (Fig. 3). Ainda, foi colocada uma fêmea na caixa que ficou isolada dos machos em um compartimento menor, de tamanho proporcional à área utilizada por cada macho. As caixas ficaram expostas ao ambiente natural nos dois biomas estudados, e como eram envolvidas por telas, houve a entrada de presas que serviram para a alimentação dos animais aprisionados. Além disso, foi colocado um recipiente com água dentro da caixa, e algumas folhas e pedras para caracterizar melhor o ambiente. Estes recursos buscaram diminuir os efeitos da retirada dos machos de seus habitats naturais.



Figura 3: Caixa utilizada no experimento para manutenção dos animais vivos durante o período regenerativo. No detalhe as medidas e disposição dos espaços.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, A., Vitale-Calpe, R., Pisano, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 98 (1): 9-16.
- Abrunhosa, P.A., Wogel, H., Pombal Jr., J.P. 2001. Vocalização de quatro espécies de anuros do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Amphibia, Hylidae, Leptodactylidae). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia*, 472: 1-12.
- Andrade, G.V. 1995. História de vida de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) em um ambiente temporário. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 176p.
- Barreto, L.N., Andrade, G.V. 1995. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 16: 67-76.
- Bertoluci, J. 1998. Annual patterns of breeding activity in Atlantic Rainforest anurans. *Journal of Herpetology*, 32: 607-611.
- Bertoluci, J., Rodrigues, M.T. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 23: 161-167.
- Brito, F.C., Kos, L. 2008. Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell Melanoma Research*, 21: 464-470.
- Brommer, J.E., Pietiäinen, H., Kolunen, H. 1998. The effect of age at first breeding on Ural owl lifetime reproductive success and fitness under cyclic food conditions. *Journal of Animal Ecology*, 67: 359-369.
- Cardoso, A.J. 1986. Utilização de recursos para reprodução em comunidade de anuros no sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 216p.
- Cardoso, A.J., Vielliard, J. 1990. Vocalização de anfíbios anuros de um ambiente aberto, em Cruzeiro do Sul, Estado do Acre. *Revista Brasileira de Biologia*, 50: 229-242.

- Duellman, W.E., Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-Hill, 670p.
- Franco-Belussi, L., Zieri, R., Santos, L.R.S., Moresco, R.M., Oliveira, C. 2009. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. *The Anatomical Record*, 292: 178-182.
- Frost, D.R. 2013. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.6 (9 Janeiro, 2013). Endereço eletrônico de acesso: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. *American Museum of Natural History*.
- Galván, I., Moller, A.P., Erritzoe, J. 2011. Testicular melanization has evolved in birds with high mtDNA mutation rates. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 988-998.
- Giaretta, A.A. 1994. Utilização de recursos e potencial reprodutivo dos Leptodactídeos (Amphibia – Anura) de uma floresta semidecídua de altitude no sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 74p.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., Gagliarod, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, D.B., Noonan, B.P., Schargel, W.E., Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299: 1-261.
- Guillette Jr, L.J., Weigel, J., Flater, G. 1983. Unilateral testicular pigmentation in the Mexican lizard *Sceloporus variabilis*. *Copeia*, 1983: 155-161.
- Hore, B.B., Mehrotra, P.N., Hore, A. 1994. Testicular melanin pigments and the gonadal cycle in a tropical wild passerine bird, *Dicrurus adsimilis* (Passeriformes, Dicruridae). *Functional and developmental morphology*, 4: 21-24.
- Juncá, F.A., Carneiro, M.C.L., Rodrigues, N.N. 2008. Is a dwarf population of *Corythomantis greening* Boulenger, 1896 (Anura, Hylidae) a new species? *Zootaxa*, 1686: 48-56.

- Khonsue, W., Matsui, M., Misawa, Y. 2002. Age determination of Daruma pont frog, *Rana porosa brevipoda* from Japan towards towards its conservation (Amphibia: Anura). *Amphibia-Reptilia*, 23: 259-268.
- Kwet, A.; Di-Bernardo, M. 1999. Anfíbios – Amphibien – Amphibians. Porto Alegre, EdIPUCRS, 110p.
- Lofts, B. 1974. Reproduction. In: Lofts, B. (eds). *Physiology of the amphibians*. New York, Academic Press, 592p.
- Louiz I, Ben-Attia M, Ben-Hassine OK. 2009. Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): evidence of reproduction disturbance. *Fisheries Research*, 100: 266–273.
- Napoli, M.F.; Caramaschi, U. 2000. Description and variation of a new Brazilian species of the *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). *Alytes*, 17(3-4): 165-184.
- Nimer, E. 1989. *Climatologia do Brasil*. Rio de Janeiro, IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 422p.
- Oliveira, C.; Zanetoni, C.; Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia*, 20(3): 263-268.
- Oliveira, C.; Zieri, R. 2005. Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2): 454-460.
- Poole, A., Lawton, C. 2009. The translocation and post release settlement of red squirrels *Sciurus vulgaris* to a previously uninhabited woodland. *Biodiversity and Conservation*, 18: 3205-3218.
- Provete, D.B., Franco-Belussi, L., Santos, L.R.S., Zieri, R., Moresco, R.M., Martins, I.A., Almeida, S.C., Oliveira, C. 2012. Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. *Zoologica Scripta*, 41: 547-556.

- Sanchez, L.C., Busch, M. 2008. Population traits of the burrowing toad *Rhinella fernandezae* (Gallardo, 1957) (Anura, Bufonidae). *Brazilian Journal of Biology*, 68: 137-140.
- Silva, F.R. & Rossa-Feres, D.C. 2007. Uso de fragmentos florestais por anuros (Amphibia) de área aberta na região noroeste de Estado de São Paulo. *Biota Neotropica*, 7: 141-147.
- Skelly, D.K. 1997. Tadpole communities. *American Scientist*, 85: 36-45.
- Toft, C.A. 1980. Seasonal variation in populations of *Panamanian litter* frogs and their prey: a comparison of wetter and drier sites. *Oecologia* 47: 34-38.
- Zieri, R. 2004. Sistema pigmentar extracutâneo e morfologia testicular em anuro (*Physalaemus nattereri* e *Physalaemus fuscomaculatus*). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 86p.
- Zieri, R., Taboga, S.R., Oliveira, C. 2007. Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): histological, stereological and ultrastructural aspects. *The Anatomical Record*, 290: 795-800.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

**The pioneering use of ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) in Neotropical anurans:
preliminary assessment of genetic diversity in populations of *Physalaemus cuvieri*
(Amphibia, Leiuperidae)**

Rafaela M. Moresco^{1,3*}, Thiago C. Maniglia², Classius de Oliveira¹ And Vladimir P. Margarido³

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Departamento de Biologia. Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth. CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Phone: +55 17 3221 2387

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Ciências Biológicas. Estrada para Boa Esperança, km 04 - Comunidade São Cristóvão. CEP 85660-000, Dois Vizinhos, Paraná, Brazil. Phone: +55 46 3536-8431

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário. CEP 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil. Phone: +55 45 3220-3235

* Author for correspondence:

Rafaela Maria Moresco

E-mail: rafaelabiologia@yahoo.com.br

Running Head: ISSR analysis in Neotropical anurans

Artigo publicado no periódico *Biological Research*, 46: 53-57 (2013)

ABSTRACT

The greatest diversity of anurans in the world is in Brazil and one of the major challenges is to reconcile the accelerated economic development with strategies that aim to maintain this diversity in forest fragments, often representing ESUs of some biomes. This work aimed to obtain data that will subsidize conservation projects through the pioneering use of ISSR analysis in Neotropical anurans, estimating the intra- and interpopulation genetic diversity of four populations of *P. cuvieri* (Paraná and São Paulo regions). Of the 65 loci scored, 58 were polymorphic, with 0.797 of intrapopulation variation and 0.203 of interpopulation variation. The index of interpopulation genetic differentiation (F_{ST}) proved to be high among the population of Marmeleiro-PR and the three populations of SP ($F_{ST} > 0.288$), and the genetic dissimilarity was related to the geographical distance. The ISSR proved to be an efficient and useful molecular marker in comparison with other markers most widely used for preliminary diagnosis of genetic diversity in populations of amphibians, and could be applied as a tool for future conservation projects, since it could identify potential ESUs and prepare decisions on the preservation of fragments.

Keywords: ESU; F_{ST} ; Gene flow; Genetic structure; Molecular marker

INTRODUCTION

Amphibians are considered relatively poor dispersers and highly philopatric (Blaustein et al., 1994). Usually, anurans populations exhibit a high degree of spatial structure, mainly when interpopulation distances exceed several kilometers (Shaffer et al., 2000). Amphibians have become a focus for studies about the effect of habitat fragmentation on genetic diversity and population differentiation (Reh and Seitz, 1990; Hitchings and Beebee, 1998).

With more than 800 described species, Brazil has the highest species diversity of frogs in the world, with many endemic species (SBH, 2011). The barker frog *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 occurs in Argentina, Brazil, Paraguay, Bolivia, Guyana and possibly in the southern plains of Venezuela. In Brazil, therefore, *P. cuvieri* occurs in environments with distinct climatic characteristics, where the amount and distribution of rainfall and range of temperature differs, as in the Caatinga, Cerrado (Brazilian savannah) and Forest (Nimer, 1989). *Physalaemus cuvieri* is a very small Leiuperidae (about 3 cm of rostrum–anal length). It breeds in permanent, semi-permanent and temporary waterbodies, and the eggs are laid in foam nests, attached to grass stems at the margin of the pond. Males of *P. cuvieri* called on the water surface, floating by the inflation of vocal sacs and lungs. Aggressive interactions among males are frequently observed, mainly during the period of high activity levels (Barreto and Andrade, 1995). Studies using genetic molecular markers (microsatellite and RAPD) to evaluate the variation and population genetic structure of *P. cuvieri* have shown relatively low dispersion rates, high habitat fidelity and specificity (Telles et al., 2006; Conte et al., 2011).

Nowadays in Brazil, one of the greatest scientific challenges is to reconcile strategies that avoid the loss of an important part of biodiversity with economic

development, mainly related to the agricultural activities (Ewers, 2005). The Atlantic Forest and Cerrado were the most degraded biomes during this process of human occupation, making small and isolated fragments be the only actual representatives of native vegetation as well as its characteristic fauna (Ranta et al., 1998; Oliveira and Marquis, 2002). These small fragments are still very important for maintenance the diversity of amphibians, once it serves as a refuge for animals during the dry season, as a day shelter during the breeding season, foraging area and even dispersal corridors (Silva and Rossa-Feres, 2007; Silva and Rossa-Feres, 2011). According to the same authors, these fragments collaborate with the maintenance of regional rainfall regimes, essential for survival of most species of anurans.

One important components of biodiversity is the genetic variability, and with the popularization of molecular techniques, it has become a tool for determining more accurately whether a population has or not the minimum attributes for maintenance or if it is at risk of extinction (Nei et al., 1975; Leberg, 1992). Thus, molecular techniques have been used for several studies of anurans, and the most commonly used markers are the allozyme (Spasic-Boskovic et al., 1999; Bisconti et al., 2011), RAPD (Telles et al., 2006; Silva et al., 2007), mitochondrial DNA (Vences et al., 2005; Funk et al., 2007) and microsatellites (Martínez-Solano and García-París, 2005; Conte et al., 2011).

The ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) analysis has recently been used for presenting excellent results and also by having a very low cost compared to other techniques. In ISSR, fragments are amplified via PCR, obtaining dominant markers and using only one primer (anchored microsatellite sequences) composed of three or four repeating units of a microsatellite (often 18-20 base pairs) that may or may not have one to four degenerate nucleotides anchored in the 3 'or 5' ends (Zietkiewicz et al., 1994). The

amplified genomic segment is the one that lies between two blocks of microsatellite. Thus, it is not necessary a previous knowledge of the region to be amplified, neither a time-consuming nor an expensive step of genomic library construction (or cloning and sequencing) as microsatellites markers. The higher reproducibility is an advantage that makes the ISSR more promising than RAPD, due to the use of longer primers which allows the use of high annealing temperature (45-60°C) leading to higher stringency (Reddy et al., 2002), and increasing the repeatability of the experiment (for review, see Semagn et al., 2006).

The extinction of genetically unique populations has largely taken place in this century as a result of habitat destruction, pollution and overexploitation. The main agents that cause a species to lose genetic variability are the isolation of populations and the reducing of the population effective size. Such reductions may result in a decline in fitness and eventual extinction (Carvalho and Hauser, 1998). The present study provides preliminary data from the pioneering use of the ISSR technique in Neotropical anurans to estimate the intra- and interpopulation genetic diversity in populations of *P. cuvieri*, and verify the effectiveness of this technique to generate data that may subsidize proposals to the conservation of threatened forest fragments.

MATERIAL AND METHODS

Three populations of *P. cuvieri* of São Paulo (SP): Engenheiro Schmidt (20°51'58.45"S; 49°18'29.07"W), Nova Itapirema (21°05'60.00"S; 49°31'60.00"W), Talhado (20°40'51.01"S; 49°17'34.57"W), and a population of Paraná (PR): Marmeleiro (26°08'58.43"S; 53°01'31.77"W) were sampled (Fig. 1). Once this is a preliminary study for presenting new and useful information on the utility of ISSR marker to assess the

genetic variability on Neotropical anurans, only five male individuals were collected from each population (we suggest to enhance the sampling size and the number of populations for inferences on the genetic structure and conservation purposes); they were anesthetized and sacrificed in the laboratory by Benzocaine saturation, having fragments of liver removed and stored in 100% ethanol for DNA extraction, performed with *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions.

For the amplification of ISSR fragments, the following primers were previously selected and used (GGAC)₃A, (GGAC)₃C, (GGAC)₃T and (GGAC)₄. The conditions for DNA amplification via PCR were as recommended by Fernandes-Matioli et al. (2000), with modifications. The amplification reaction mixture consisted of Tris-KCl, 2 mM MgCl₂, 0.92 mM primer, 0.38 mM dNTP, 1 U/ reaction Taq DNA polymerase, DNA (10 ng) and enough water to make up to volume of 13 µL. The amplification reactions were performed in Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler scheduled for 4 cycles of 45s at 94°C, 1 min at 51°C and 1 min at 72°C, followed by 29 cycles of 45s at 94°C, 1 min at 48°C and 1 min at 72°C. After the last cycle of amplification, the reaction mixture was cooled and maintained at 4°C. Negative controls without DNA were included in each set of amplifications. Samples consisting of 7 µL of PCR reaction mixture, after amplification, were subjected to electrophoresis on 1.4% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.2 µg/mL). Electrophoresis was performed in TBE buffer (Tris-borate), 5 V.cm⁻¹, for 4 hours, the amplified fragments were visualized under ultraviolet light and the gel was photographed for analysis. The size of the fragments was estimated by comparison with 100 bp ladder marker (Invitrogen™). The fragments of ISSR were treated as dominant markers and judged as binary characters: present (1) or absent (0), so a binary matrix was

produced and from it estimated the indices of genetic diversity within and among populations. The accuracy of band assignment was done by repeating in a minimum of five replicates; the bands were bright enough that presence/absence scoring was not mixed-up by simple intensity differences and the bands were distinct enough in size from the surrounding bands.

The pairwise genetic distance matrix between individuals was obtained by Jaccard similarity index, and used to construct the Neighbor-Joining dendrogram with the program FreeTree and Mega 3.1. The scatter plot of principal coordinates was constructed using the programs DistPCoA and Statistica 7.1. Genetic differentiation was estimated by applying the Mantel test, with 10,000 permutations for the Jaccard similarity matrix using the Mantel-Struct 1.0 program. The analysis of molecular variance, expected heterozygosity and the value of genetic differentiation (F_{ST}) were obtained using the program Arlequin 3.5.1.2. The linear regression between F_{ST} and geographic distance was carried out using Statistica 7.1 considering the data in Table 1.

RESULTS

Of the 65 loci scored, 58 were polymorphic, with 0.797 of intrapopulation variation and 0.203 of interpopulation variation. The polymorphic vs total number of loci per each primer was: 15/17 for (GGAC)₃A primer; 15/17 for (GGAC)₃C primer, 14/16 for (GGAC)₃T primer and 14/15 for (GGAC)₄ primer. The primer (GGAC)₃A produced a fragment of 250 bp uniquely from the population of Marmeleiro-PR and another fragment of 210 bp uniquely from populations of SP. The amplified fragments ranged from 200 to about 1,500 bp (Fig. 2A).

The dendrogram analysis identified two main groups whose compositions determine that there is a clear relationship between genetic distance and geographical distance, and the population of Marmeleiro-PR proved to be differentiated from the other populations analyzed (Fig. 2B). The scatter plot of principal coordinates built with the two major eigenvectors (0.245 and 0.122 of variation, respectively), also obtained with the Jaccard similarity index, corroborates the dendrogram, since it shows that the population of Marmeleiro-PR is separated from the SP populations (Fig. 2C).

Genetic differentiation among populations of *P. cuvieri* quantified by the Mantel test evidenced no significant correlation only between the populations of Eng. Schmidt-SP and Talhado- SP (the smallest geographic distance), showing that these populations are not genetically differentiated ($p = 0.473$, $r = -0.011$ and $Z_{10,000} < Z$). Values of genetic dissimilarity, which is the genetic variability within and among populations, were also obtained through this test (Table 1). The intrapopulation genetic dissimilarity was almost the same for all populations, being 0.469 in the population of Marmeleiro-PR; 0.449 in Nova Itapirema-SP; 0.454 in Eng. Schmidt-SP and 0.446 in Talhado-SP. The expected heterozygosity was almost the same for all populations, being 0.513 ± 0.101 in Marmeleiro-PR; 0.488 ± 0.101 in Nova Itapirema-SP; 0.457 ± 0.091 in Eng. Schmidt-SP and 0.506 ± 0.101 in Talhado-SP. The index of interpopulation genetic differentiation (F_{ST}) was high between populations of the two different regions PR/SP ($F_{ST} \geq 0.25$), moderate among the population of Nova Itapirema and the other two SP populations ($0.25 > F_{ST} \geq 0.05$), and not different among the populations of Schmidt and Talhado ($F_{ST} < 0.05$). These results corroborate the genetic difference among Marmeleiro-PR population and SP populations, and indicate that genetic dissimilarity are related to geographical

distance, as the correlation between F_{ST} and geographic distance ($p = 0.002$, $r = 0.966$) (Table 1, Fig 3).

DISCUSSION

Although the studied populations of *P. cuvieri* are present in small preserved fragments of Atlantic Forest and Cerrado, the genetic variability present is high (around 0.45), and 0.797 of all variation is intrapopulation. A similar result was found by Telles et al. (2006) in a study with RAPD marker in 214 individuals from 18 populations of *P. cuvieri*, where most of the genetic variation was found among individuals of the same fragment (0.898). When the authors analyzed only the 6 local populations with more than 12 individuals (12 to 23 individuals), the result obtained was qualitatively similar, and indicated that unbalanced sample sizes and the relatively small sample size in some populations did not qualitatively affect the evaluation of overall population genetic structure (using AMOVA and Bayesian estimate of θ^B). In relation to the expected heterozygosity (H_e), our study shows high values ranging from 0.46 to 0.51. Similar results were obtained by Conte et al. (2011) using microsatellite markers in 85 individuals from 5 populations (14 to 21 individuals/populations), with high observed heterozygosities (H_o) ranging from 0.31 to 0.59 (and H_e ranging from 0.30 to 0.58). As already shown in other studies, forest fragments can contribute for the maintenance of species diversity of frogs (Silva and Rossa-Feres, 2007; Silva and Rossa-Feres, 2011), and the present study supports that the genetic diversity can also be maintained, and thus the populations would be potentially more protected from the extinction factor due to environmental changes.

Gene flow is geographically restricted to nearby populations, indicated by F_{ST} that increases in direct proportion to the distance. In our study, this correlation was observed,

where the highest F_{ST} occurred between populations of the two different regions PR/SP (distance ≥ 663.8 Km; Table I, Fig. 3). Similar results were obtained in *P. cuvieri* by Conte et al. (2011) using microsatellite markers, with high G_{ST} values ($G_{ST} \geq 0.20$) observed between populations isolated by long distances (ranging from 381 Km to 2936 Km). Telles et al. (2006), in RAPD studies with *P. cuvieri* at a much smaller spatial scale, indicate that genetic similarity among local populations tends to be slightly larger than expected by chance alone. Lampert et al. (2003), working with populations of *Physalaemus pustulosus* far between 260 meters on average, that is, a very small range of spatial distance, showed strong positive correlation between genetic and geographic distances. Although the genetic diversity can be either by mutation, genetic drift and selection, the differentiation between populations tends to increase with the absence of gene flow, and these data can contribute to the identification of evolutionarily significant units (ESUs) (Varvio et al., 1986). The preservation of ESUs maximizes the potential for future evolutionary success of species or population groups of species (Hey et al., 2003). The use of ESUs as targets for conservation actions is increasing; so it is very important that preliminary studies identify quickly, accurately and correctly an ESU. In the present study it was possible to determine by the ISSR marker that the level of interpopulation genetic differentiation is high among the population of Marmeleiro-PR and other SP populations ($F_{ST} > 0.288$), suggesting that this population has a genetic composition quite different from the others.

The frequent occupation of many areas of agriculture and livestock has reduced many characteristic biomes of Brazil to small fragments, surrounded by a landscape highly modified and degraded with an edge effect greatly increased, which reflects in changes of abiotic factors resulting from the abrupt transition between two adjacent ecosystems that affect the populations dynamics (Murcia, 1995; Rambaldi and Oliveira, 2003). It can also

be observed decreases in the potential for dispersal of species, the number of species and population size, resulting in reduced genetic variability (Fahrig, 2003). According to Ohmer and Bishop (2011), works from the last two decades indicate, mostly, the climate change and habitat loss as the factors most related to the worldwide decline of amphibians. Nevertheless, the small fragments are often the last remnants of a biota and start playing an important role in the preservation of these species (Silva et al., 2011).

As recommended by Fraser and Bernatchez (2001) and Aleixo (2009), the degree of vulnerability of an ESU should be assessed at the planning stage of conservation, to prevent that a species listed as threatened has one of its ESUs compromised before conservation action. The ISSR proved to be an efficient and useful molecular marker for the preliminary diagnosis of genetic diversity in populations of amphibians; it has a low cost, high repeatability, fast on getting results by not requiring prior knowledge of sequence to be amplified. Moreover, for the preliminary diagnosis of genetic diversity, the limited sample size should be compensated by a higher number of loci per sample. Thus, it can be used as a tool, for future conservation projects, helping in making decisions about the preservation of fragments, and identification of ESUs, even before it is compromised.

ACKNOWLEDGMENTS

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 474596/2010-9) and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for the support to the research.

REFERENCES

- Aleixo A (2009) Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. *Megadiversidade* 5: 87-95.
- Barreto L, Andrade GV (1995) Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 16: 67-76.
- Bisconti R, Canestrelli D, Nascetti G (2011) Genetic diversity and evolutionary history of the Tyrrhenian treefrog *Hyla sarda* (Anura: Hylidae): adding pieces to the puzzle of Corsica-Sardinia biota. *Biol J Linn Soc* 103: 159-167.
- Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP (1994) Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv Biol* 8: 60-71.
- Carvalho GR, Hauser L (1998) Advances in the molecular analysis of fish population structure. *Ital J Zool* 65: 21-33.
- Conte M, Zucchi MI, Andrade GV, Souza AP, Recco-Pimentel SM (2011) Study of closely related species within the *Physalaemus cuvieri* group (Anura): contribution of microsatellite markers. *Genet Mol Res* 10: 1434-1444.
- Ewers RM (2005) Are conservation and development compatible? *Trends Ecol Evol* 20: 159.
- Fahring L (2003) Effects of fragmentation on biodiversity. *Annu Rev Ecol Syst* 34: 487-515.
- Fernandes-Matioli FMC, Matioli SR, Almeida-Toledo LF (2000) Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genet Mol Biol* 23: 803-807.

- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol Ecol* 10: 2741-2752.
- Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padial JM, de la Riva I, Cannatella DC (2007) Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Mol Phylogenet Evol* 44: 825-837.
- Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK, Harrison RG (2003) Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends Ecol Evol* 18: 597-603.
- Hitchings SP, Beebee TJC (1998) Loss of genetic diversity and fitness in Common Toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *J Evol Biol* 11: 269-283.
- Lampert KP, Rand AS, Mueller UG, Ryan MJ (2003) Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Mol Ecol* 12, 3325-3334.
- Leberg PL (1992) Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46: 477-494.
- Martínez-Solano IR, García-París M (2005) The impact of historical and recent factors on genetic variability in a mountain frog: the case of *Rana iberica* (Anura: Ranidae). *Anim Conserv* 8: 431-441.
- Murcia C (1995) Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends Ecol Evol* 10: 58-62.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Nimer E (1989) *Climatologia do Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE: Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

- Ohmer ME, Bishop PJ (2011) Citation rate and perceived subject bias in the amphibian-decline literature. *Conserv Biol* 25: 195-199.
- Oliveira PS, Marquis RJ (2002) *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical Savanna*. New York: Columbia University Press.
- Rambaldi DM, Oliveira DAS (2003) *Fragmentação de Ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Ranta P, Blom T, Niemelä J, Joensuu E, Siitonen M (1998) The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodivers Conserv* 7, 385-403.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Reh W, Seitz A. (1990). The influence of land use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biol Conserv* 54: 239-249.
- SBH (2011). *Sociedade Brasileira de Herpetologia: A Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis*. See http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/checklist_brasil.asp.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plant. *Afr J Biotechnol* 5: 2540-2569.
- Shaffer HB, Fellers GM, Magee A, Voss SR (2000) The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite toad, *Bufo canorus* (Anura Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Mol Ecol* 9: 245-257.

- Silva DM, Cruz AD, Bastos RP, Reis RL, Telles MPC, Diniz-Filho JAF (2007). Population structure of *Eupemphix nattereri* (Amphibia, Anura, Leiuperidae) from Central Brazil. *Genet Mol Biol* 30: 1161-1168.
- Silva FR, Rossa-Feres DC (2007) Uso de fragmentos florestais por anuros (Amphibia) de área aberta na região noroeste de Estado de São Paulo. *Biota Neotrop* 7: 141-147.
- Silva FR, Rossa-Feres DC (2011) Influence of terrestrial habitat isolation on the diversity and temporal distribution of anurans in an agricultural landscape. *J Trop Ecol* 27: 327-331.
- Silva FR, Prado VHM, Rossa-Feres DC (2011) Value of small forest fragments to amphibians. *Science* 332: 1033.
- Spasic-Boskovic O, Krizmanic I, Vujosevic M (1999) Population composition and genetic variation of water frogs (Anura: Ranidae) from Yugoslavia. *Caryologia* 52: 9-20.
- Telles MPC, Bastos RP, Soares TN, Resende LV, Diniz-Filho JAF (2006) RAPD variation and population genetic structure of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in Central Brazil. *Genetica* 128: 323-332.
- Varvio SL, Chakraborty R, Nei M (1986) Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. *Heredity* 57: 189-198.
- Vences M, Thomas M, Meijden A, Chiari Y, Vieites DR (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool* 2: 5.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Table 1: Pairwise comparisons of *Physalaemus cuvieri* populations.

Pairwise comparisons	Distance (Km)	F_{ST}	p	r	Z	$Z_{10\,000}$	Genetic dissimilarity
Marmeleiro-PR x Nova Itapirema-SP	663.88	0.359	0.007	0.861	15.849	13.900	0.634
Marmeleiro-PR x Eng. Schmidt-SP	699.08	0.292	0.009	0.759	14.854	13.383	0.594
Marmeleiro-PR x Talhado-SP	717.33	0.288	0.007	0.687	14.679	13.228	0.587
Nova Itapirema-SP x Eng. Schmidt-SP	35.40	0.072	0.114	0.185	11.871	11.611	0.475
Nova Itapirema-SP x Talhado-SP	53.42	0.058	0.183	0.145	11.668	11.446	0.467
Eng. Schmidt-SP x Talhado-SP	21.06	-0.005	0.473	-0.011	11.208	11.220	0.448

Approximate distance (km), interpopulation genetic differentiation index (F_{ST}), significance level (p), correlation of two matrices (r), robustness of the relation original data (Z) and after 10,000 permutations ($Z_{10\,000}$), genetic dissimilarity using Jaccard Coefficient.

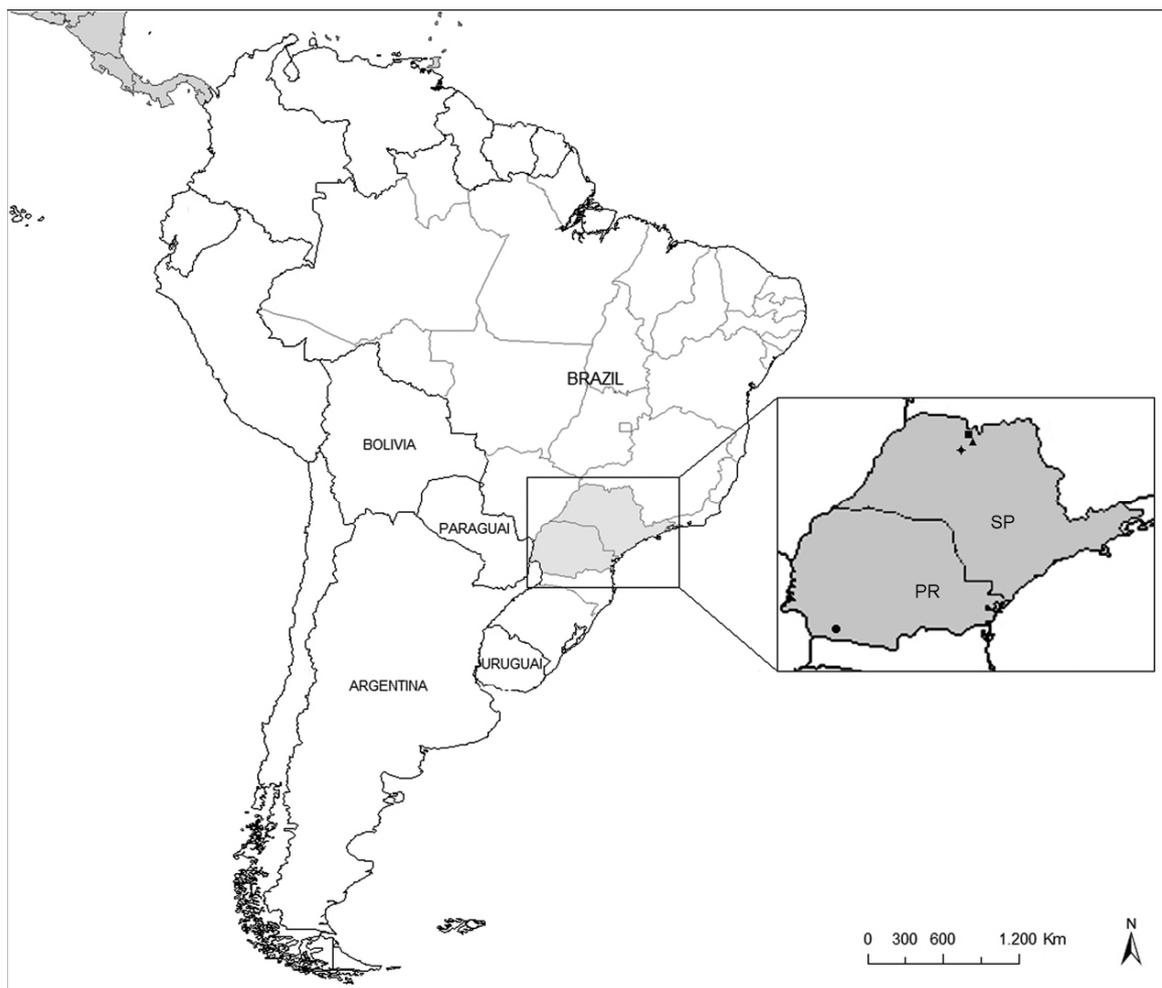


Figure 1: Map of sampling sites of *P. cuvieri* populations in Brazil: Marmeleiro-PR (●), Nova Itapirema-SP (◆), Eng. Schmidt-SP (▲) and Talhado-SP (■).

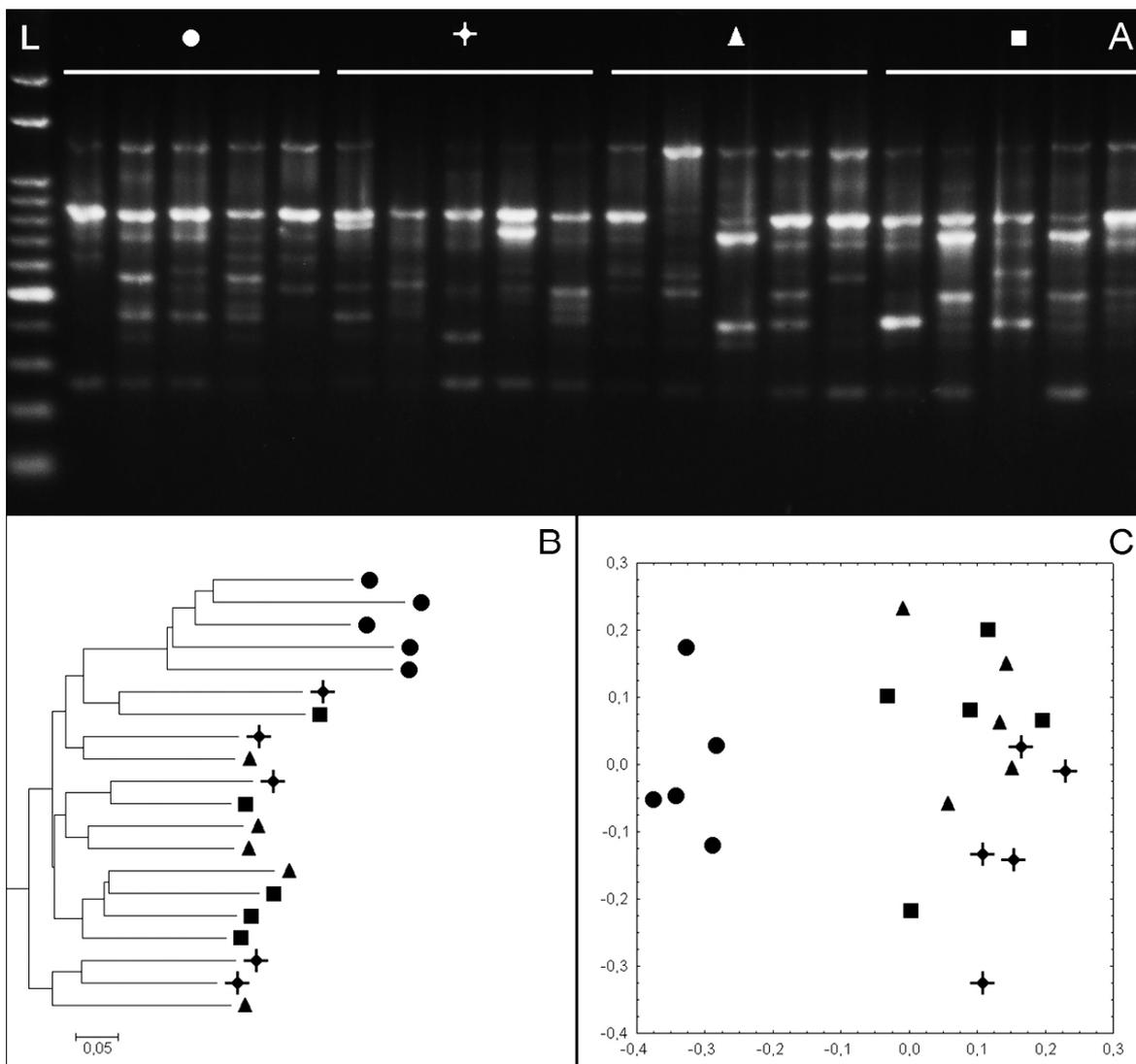


Figure 2: Analysis of *P. cuvieri* populations through ISSR marker: (A) agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from the amplification of DNA samples using the primer (GGAC)₃T; (B) Neighbor-joining dendrogram based on Jaccard similarity index with 10,000 bootstrapping resamplings. (C) Scatter plot at main coordinates based on Jaccard similarity index. (L) 100 bp ladder, (●) Marmeleiro-PR, (✦) Nova Itapirema-SP, (▲) Eng. Schmidt-SP and (■) Talhado-SP.

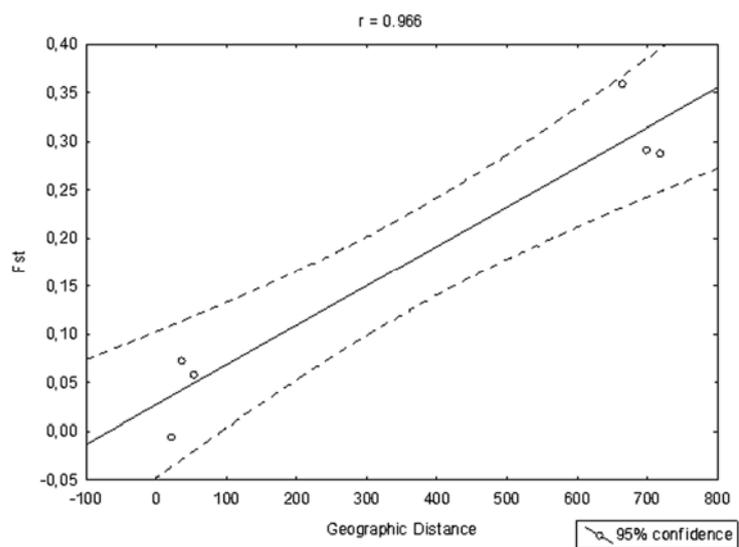


Figure 3: Linear regression between F_{ST} and geographic distance among *P. cuvieri* populations.

Ciclo reprodutivo em populações de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 de dois distintos biomas Brasileiros ameaçados: uma discussão integrando biologia estrutural e ecologia em um contexto espacial

Rafaela M. Moresco^{1,2*}, Pitágoras A. Piana², Vladimir P. Margarido², Classius de Oliveira¹

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Departamento de Biologia. Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth. CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Phone: +55 17 3221 2387

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário. CEP 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil. Phone: +55 45 3220-3235

*Autor para correspondência:

Rafaela Maria Moresco

E-mail: rafaelabiologia@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido no periódico *Freshwater Biology*:

(<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291365-2427>)

Título: Reproductive cycle in populations of *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 from two distinct threatened Brazilian biomes: a discussion integrating structural biology and ecology in a spatial context

RESUMO

A reprodução em anfíbios está sujeita a um controle hormonal influenciado fortemente por fatores ambientais, determinando assim o ciclo gametogênico ao longo de um ano, que pode ser contínuo, potencialmente contínuo ou descontínuo. Este estudo teve como objetivo caracterizar o ciclo reprodutivo de *P. cuvieri* em populações da Mata Atlântica e do Cerrado, relacionando as variações morfológicas gonadais com fatores climáticos através de uma Análise de Correspondência Canônica. O ciclo reprodutivo foi dividido em períodos reprodutivo, regenerativo e pré-reprodutivo, e nos dois biomas estudados foram capturados 5 machos em cada período. Os testículos foram retirados, fixados em Karnovsky, incluídos em historesina, cortados à $2\mu\text{m}$ e corados com Hematoxilina-eosina. Foram caracterizados 7 tipos celulares representando o epitélio germinativo. A variância total ao longo do ciclo reprodutivo foi de 23 %, com autovalores para os dois primeiros eixos de ordenação de 0,163 e 0,024, sendo responsáveis, respectivamente, por 68,7% e 10,2% da variância total acumulada na média ponderada dos tipos celulares com relação às 4 variáveis ambientais analisadas. O teste de permutação de Monte Carlo indicou que os tipos celulares e a precipitação foram significativamente correlacionados. O período regenerativo foi caracterizado pelo tipo celular espermatogônia I, que inicia a gametogênese com o aumento da precipitação, sucedendo-se então o período pré-reprodutivo caracterizado pelos tipos celulares espermátide I e II. O início do período reprodutivo, caracterizado pelo alto número de espermatozóides, é determinado pelo aumento da temperatura e da umidade relativa, assim como diminuição da velocidade do vento. Embora ao longo do ano o comportamento reprodutivo de vocalização, amplexo e a presença de desovas não tenham ocorrido nos mesmos meses nos diferentes biomas, a composição e a modificação dos tipos celulares de cada período em resposta às mudanças

climáticas coincidiram, confirmando que tanto o controle hormonal quanto os fatores ambientais influenciam o ciclo gametogênico.

Palavras chave: Anura, Análise de Correspondência Canônica, Espermatogênese, Variáveis Ambientais

INTRODUÇÃO

A estratégia reprodutiva pode ser descrita como o conjunto de atributos fisiológicos, morfológicos e comportamentais que levam ao número máximo de descendentes sob condições ambientais específicas (Duellman & Trueb, 1994). O ciclo reprodutivo em anfíbios está sujeito a um controle hormonal, que por sua vez, considerando o aporte genético, é influenciado por fatores ambientais que determinam o ciclo gametogênico apresentado ao longo de um ano. Segundo Lofts (1974), este ciclo pode ser classificado para anfíbios como: (1) contínuo, encontrado em anuros de regiões tropicas, onde a atividade gametogênica apresenta-se sem intervalos ao longo do ano; (2) potencialmente contínuo, embora o ciclo sofra uma interrupção parcial, as espermatogônias I estão sensíveis à estimulação, podendo retomar sua atividade a qualquer momento e (3) descontínuo, observado em anuros de regiões temperadas que apresentam um período reprodutivo muito curto, quando há grandes modificações nos órgãos do sistema reprodutor.

Os estudos com anfíbios na época reprodutiva facilitam a observação de determinadas características presentes exclusivamente neste período. Algumas espécies por terem uma distribuição mais ampla em diferentes biomas tornam-se mais interessantes para estudos comparativos. Uma destas espécies é *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826, conhecida popularmente como rã cachorro, devido à vocalização que possui. Ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia e possivelmente em planícies ao sul da Venezuela. No Brasil está presente nas regiões sul, sudeste e nordeste, distribuindo-se, portanto, em ambientes com características climáticas bem distintas, onde a quantidade e distribuição de chuvas e amplitudes térmicas diferem como na Caatinga, Cerrado e Matas (Nimer, 1989).

Grandes porções da biodiversidade mundial encontram-se no Brasil, formando os chamados biomas, que se referem a unidades biológicas compostas por fauna característica

à fitofisionomia, clima, altitude e solo de um determinado local (Walter, 1986). Devido ao alto nível de riqueza associado ao elevado endemismo, os biomas brasileiros acabam constituindo importantes centros de biodiversidade; no entanto, nos últimos anos, em decorrência do crescimento das grandes cidades e ocupação de amplas áreas para as práticas agropecuárias, estas unidades biológicas vêm sendo crescentemente reduzidas a pequenos fragmentos (Aleixo *et al.*, 2010). Este alto nível de devastação ambiental está presente em dois biomas brasileiros, a Mata Atlântica e o Cerrado, que representam ecorregiões prioritárias para a conservação em nível mundial, os chamados “Hotspots” de biodiversidade (Myers *et al.*, 2000).

A Mata Atlântica é a segunda floresta tropical mais ameaçada do Planeta, sendo que atualmente está reduzida a pouco mais de 7% de sua área original, embora ainda seja o bioma mais rico em biodiversidade do Brasil. Esta riqueza de espécies se dá pelas características que apresenta, sendo considerado um mosaico diversificado de ecossistemas (IBAMA, 2013). Possui estrutura e composição florística bastante diferenciada, que podem variar desde matas densas até regiões com paisagem de campos nativos (Maack, 2012). Tendo como elemento comum a exposição aos ventos úmidos vindos do Oceano Atlântico, este bioma acompanha as características climáticas das regiões onde ocorre apresentando um alto índice pluviométrico distribuído de forma homogênea ao longo do ano. Em média, estes valores variam entre 1.800 e 3.600mm/ano, podendo chegar à 4.000mm/ano. No Nordeste brasileiro as temperaturas médias anuais, presentes na Mata Atlântica, variam em torno de 24°C, porém nas regiões Sudeste e Sul as médias anuais são mais baixas e a temperatura pode ocasionalmente chegar a -6°C nos meses de inverno (IBAMA, 2013).

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 2006). O Cerrado típico é constituído por árvores relativamente baixas (até

vinte metros), esparsas, disseminadas em meio a arbustos, subarbustos e vegetação baixa constituída, em geral, por gramíneas (Eiten, 1972). As temperaturas médias anuais também estão entre 21 e 27°C podendo chegar a temperaturas acima de 40°C nos períodos mais quentes e 12°C nos meses de inverno. Caracteriza-se por duas estações bem definidas, uma seca com frequentes períodos de estiagem e outra chuvosa, sendo que a precipitação média anual fica em torno de 1500 mm (IBAMA, 2013).

Muitas espécies são utilizadas como fortes indicadores de preservação destas unidades biológicas, sendo os anfíbios um grupo altamente suscetível às alterações ambientais em função de suas características biológicas. Estes animais acabam tendo um papel fundamental em estudos de conservação no Brasil, uma vez que o país abriga a maior diversidade de anuros do mundo, com mais de 940 espécies descritas (Napoli & Caramaschi, 2000; SBH, 2013). Os habitats acabam funcionando como fatores limitantes à riqueza de espécies e determinantes para os modos reprodutivos, uma vez que espécies dependentes de água para a reprodução reúnem-se em habitats aquáticos disponíveis à ovipostura e ao desenvolvimento larval, formando-se agregações com alto potencial para interações intra e interespecíficas (Crump, 1974; Vasconcelos *et al.*, 2010). Diferenças temporais nas estações reprodutivas podem constituir fator importante no isolamento reprodutivo de espécies que utilizam um mesmo habitat (Crump, 1974; Toft, 1985; Bertoluci, 1998). Desta maneira, este estudo teve como objetivo caracterizar o ciclo reprodutivo de *P. cuvieri* em populações da Mata Atlântica e do Cerrado, relacionando as variações morfológicas gonadais com alterações climáticas características de cada local.

MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas dos espécimes de *P. cuvieri* foram realizadas em um fragmento de Mata Atlântica (M.A.) localizado no município de Marmeleiro, PR (26°15'17.7" S;

53°04'15.0''O), e em fragmentos de Cerrado (C.) na região de São José do Rio Preto, SP (20°47'07.05'' S 49°21'42,09''O), durante o ano de 2010. O ciclo reprodutivo foi subdividido em três períodos ao longo do ano conforme as diferentes atividades apresentadas pelos anuros: (1) período reprodutivo, caracterizado pela alta densidade de machos vocalizando em corpos d'água, além da presença de desovas em campo - verão; (2) período regenerativo, caracterizado pela ausência de atividade reprodutiva e forrageio da espécie - inverno; e (3) período pré-reprodutivo, caracterizado pela presença de poucos machos vocalizando em corpos d'água e ausência de desovas da espécie em campo - primavera-início de verão.

Durante as coletas foram capturados cinco machos para cada período em cada um dos biomas estudados, sendo que os espécimes do período de inverno foram obtidos através de animais que haviam sido coletados no verão nas duas regiões, durante o período reprodutivo e encaminhados a cativeiros nas respectivas regiões de estudo. Este protocolo foi utilizado, pois é muito difícil a coleta de animais em campo no período de inverno, uma vez que além do pequeno tamanho, não vocalizam e ficam escondidos em baixo de folhas ou galhos secos no chão. Estes animais foram colocados em caixas feitas com armação de ferro e envolvidas por tela de aço de 4mm entre nós adjacentes com dimensões de 75cm x 50cm x 50cm, o que possibilitou a entrada de presas que serviram para a alimentação dos animais aprisionados. Uma fêmea foi colocada na caixa e mantida isolada dos machos em um compartimento menor, de tamanho proporcional à área utilizada por cada macho dentro da caixa. As caixas ficaram expostas ao ambiente natural até o período de inverno, sendo que possuíam um recipiente com água e algumas folhas e pedras para caracterizar melhor o ambiente. Todos os recursos empregados buscaram diminuir os efeitos da retirada dos machos de seus habitats naturais.

Os animais dos outros dois períodos (pré-reprodutivo e reprodutivo), após serem coletados e encaminhados ao laboratório, foram anestesiados e levados à óbito por saturação em Benzocaína e abertos por laparotomia, seguindo o Guia para o Cuidado e o Uso dos Animais de Laboratório – Unesp (Protocolo 001/06 – CEEA). Os animais do período de inverno só foram sacrificados quando iniciou este período.

Para análise em microscopia de luz foram retirados os testículos, pesados e imediatamente imersos em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0.1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%) e encaminhados à rotina histológica (Ribeiro & Lima, 2000) para serem desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (*Leica-historesin embedding kit*). Foram feitas secções de 2 μ m e coradas com Hematoxilina-eosina. Para cada animal foram analisados 15 campos fotografados com objetiva de 40x usando microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado com câmera digital Olympus DP 71, utilizando-se o *software* de captura de imagem DP Controller 3.2.1.276. O *software* de análise de imagem Image Pro-Plus (*Media-Cybernetics Inc.*) foi utilizado para quantificar a área ocupada (μm^2) por diferentes tipos celulares, considerando uma área total (campo) de análise de 94.121,37 μm^2 . Os tipos celulares analisados foram: espermatogônia I, espermatogônia II, espermatócito I, espermatócito II, espermatíde I, espermatíde II e espermatozóide. Para estimar as diferenças existentes durante os três períodos do ciclo reprodutivo entre peso das gônadas além da composição celular característica utilizou-se ANOVA para amostras independentes no nível de significância de 0.05.

As análises em microscopia de luz buscaram caracterizar os morfotipos celulares germinativos dos testículos durante os três períodos que compõem o ciclo reprodutivo relacionando com as variáveis ambientais pluviosidade, temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento. Os dados meteorológicos foram obtidos através do Instituto

Nacional de Meteorologia (INMET). Estes dados foram plotados em uma planilha, e a partir desta foram construídas duas matrizes. Na primeira matriz as linhas representavam os espécimes e as colunas representavam as médias de área dos tipos celulares; na segunda matriz, as linhas representam o período do ciclo reprodutivo e as colunas representavam as médias das variáveis ambientais.

Para avaliar as relações existentes entre os tipos celulares presentes nos testículos e as variáveis ambientais que caracterizavam os três períodos foi realizada uma Análise de Correspondência Canônica (CCA), ao nível de significância de 5% pelo teste de Monte Carlo. A CCA tem sido usada principalmente em pesquisas ecológicas que analisam as relações espécies-ambientes (McCune & Grace, 2002). Uma vez que (1) dois conjuntos de dados são analisados simultaneamente, (2) o primeiro contém a ocorrência de diferentes tipos celulares e (3) o segundo descreve as condições ambientais, a maior vantagem da CCA sobre os outros métodos de análise multivariada é admitir um teste de significância das variáveis ambientais na determinação dos padrões ambientais, o teste de Monte Carlo, analisando os eixos associados com as variáveis usando os autovalores como teste estatístico. Considerando a hipótese de nulidade testada de que não há relações entre as matrizes, as linhas na matriz secundária são aleatoriamente re-assinaladas dentro da mesma, destruindo assim a relação entre as matrizes principal e secundária, mas mantendo inalterada estrutura de correlação das variáveis na segunda matriz.

RESULTADOS

No presente estudo determinamos três períodos que consistem no ciclo reprodutivo de *P. cuvieri* sendo que estes períodos caracterizaram-se pelas particularidades dos biomas analisados. Características respectivas de cada período que confirmam o comportamento reprodutivo como espécimes vocalizando, animais em amplexo e presença

de desovas foram as mesmas nos diferentes biomas, embora estas não tenham coincidido nos mesmos meses ao longo do ano entre os dois biomas (Tab. 1).

Os testículos apresentaram diferenças significativas no peso ($F_{2,27}=14.4897$, $p < 0.05$) quando comparados período reprodutivo na Mata Atlântica (direito $0,0045 \pm 0,00072$ e esquerdo $0,0035 \pm 0,00044$) e Cerrado (direito $0,0064 \pm 0,0009$ e esquerdo $0,0046$) com período regenerativo na Mata Atlântica (direito $0,0012 \pm 0,0004$ e esquerdo $0,0007 \pm 0,0002$) e Cerrado (direito $0,0016 \pm 0,0009$ e esquerdo $0,0006 \pm 0,00002$). Não houve diferença entre antímeros na composição dos morfotipos celulares que caracterizam todo o ciclo reprodutivo a partir da análise do epitélio germinativo, composto pelas seguintes células: espermatogônia I, espermatogônia II, espermatócito I, espermatócito II, espermatíde I, espermatíde II e espermatozóide. Estas células associadas com grandes células de Sertoli, que sustentam e nutrem o epitélio germinativo em desenvolvimento, estavam presentes em estruturas funcionais denominadas de lóculos seminíferos e a produção de espermatozoides seguiu um padrão da borda do lóculo em direção a luz do mesmo. Neste arranjo foi observada a existência de cistos espermatogênicos que representam um agrupamento de células no mesmo estágio de diferenciação ao longo de todos os períodos (Fig. 1).

As espermatogônias I foram observadas como células isoladas, grandes e volumosas apresentando cromatina granular e aspecto multilobular, sendo facilmente identificadas isoladas na base do epitélio germinativo. Por outro lado, as espermatogônias II foram observadas formando grupos celulares com núcleos mais intensamente e homoganeamente corados em relação às espermatogônias I; além disso, aparentam ter o volume citoplasmático e nuclear menor em relação às células anteriores. Os espermatócitos I são muitas vezes identificados pelos sinais de prófase na primeira divisão meiótica, apresentam grande volume celular e são menores que as espermatogônias I. Os

espermátocitos II são menores, representando metade do tamanho dos espermátocitos I, e apresentam núcleo homogêneo e arredondado. As espermátides I que apresentam-se como células diminutas mudam sua morfologia de esférica para alongada pelo processo de espermiogênese, passando a ser identificadas como espermátides II possuindo núcleo mais compactado. Desde a fase intermediária da espermiogênese é possível identificar um arranjo em feixes das espermátides, sustentadas pelas células de Sertoli. Os espermatozóides encontram-se no lúmen dos lóculos seminíferos e possuem alta compactação nuclear, além da presença de flagelo (Fig. 1).

Os resultados da Análise de Correspondência Canônica são apresentados nos diagramas de ordenação (*biplots*) para os morfotipos celulares (Fig. 2). O número de interações necessárias para se alcançar a solução estável para o primeiro eixo foi de 10, enquanto para o segundo eixo apenas seis. A variância total foi de 23 % com autovalores para os dois primeiros eixos de ordenação de 0.163 e 0.024, sendo responsáveis, respectivamente, por 68.7% e 10.2% da variância total acumulada na média ponderada dos 7 tipos celulares com relação às 4 variáveis ambientais analisadas. Além disso, o teste de permutação de Monte Carlo indicou que os tipos celulares e a precipitação foram significativamente correlacionados ($p < 0.05$ para o primeiro eixo) (Tab. 2). Os tipos celulares espermátide I e II e espermatozóide se destacaram no período de elevada precipitação, enquanto que na seca, o tipo celular espermátogônia I foi elevado. Os demais tipos celulares apresentaram baixos índices de correlação com o primeiro eixo de ordenação, o qual foi explicado pela precipitação, revelando que o conjunto das demais variáveis deve atuar em conjunto para determinar a disposição observada; além disso, outras variáveis não mensuradas poderiam atuar também.

O período reprodutivo foi caracterizado por alta produção de espermatozóides (M.A. = $8218.08\mu\text{m}^2 \pm 744.91$; C. = $8665.508\mu\text{m}^2 \pm 325.97$); o período regenerativo foi

caracterizado por baixa produção de espermatozóides (M.A. = $1599.156\mu\text{m}^2 \pm 459.24$; C. = $1304.83\mu\text{m}^2 \pm 283.03$) e alta produção de espermatogônias I (M.A. = $18413.23\mu\text{m}^2 \pm 826.36$; C. = $19022.2\mu\text{m}^2 \pm 1045.17$) e o período pré-reprodutivo foi caracterizado pela alta produção de espermátides I (M.A. = $6337.508\mu\text{m}^2 \pm 71.65$; C. = $6954.914\mu\text{m}^2 \pm 186.02$) e espermátides II (M.A. = $12156.49\mu\text{m}^2 \pm 1220.67$; C. = $10919.57\mu\text{m}^2 \pm 772.07$) (Tab. 3) (Fig. 3).

DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatado que a atividade gonadal em *P. cuvieri* é reduzida ao longo do ano quanto à produção de espermatozóides no período do inverno, aqui denominado período regenerativo. Em anuros tropicais, os espermatozóides estão presentes nos testículos ao longo de todo do ano, enquanto que em espécies de regiões subtropicais a produção de espermatozóides cessa durante os meses frios (Lofts, 1964). Desta maneira, as gônadas passam a ter tamanho e peso reduzidos neste período, sugerindo que o ciclo reprodutivo não deve ser contínuo (Martori *et al.*, 2005; Quiroga & Sanabria, 2012). Muitas vezes, apenas variações no tamanho da gônada podem não ajudar a determinar o tipo de ciclo reprodutivo, uma vez que a ausência de espermatozóides pode ser compensada pelo aumento nos tecidos intersticiais (Sasso-Cerri *et al.*, 2004). A organização nos testículos dos morfotipos celulares (espermatogônias I, espermatogônias II, espermátocitos I e espermátocitos II) em forma de cistos espermatogênicos observados no presente estudo é semelhante a de muitas espécies de anfíbios e representa uma característica primitiva compartilhada com peixes, que determina uma diferença temporal das diferentes fases da espermatogênese (Norriz & Lopez, 2011).

Em trabalho com *Lithobates catesbeianus* foi verificado que o processo de transformação de espermatogônias em espermatozóides levou cerca de 40 dias para

ocorrer, sendo que a fase de espermatogônias, na qual há proliferação através de mitose, demorou 18 dias para terminar, e a fase de espermiogênese apenas 8 dias (Segatelli, Batlouni & França, 2009). Em mamíferos é muito comum que haja uma semelhança no tempo dispensado para as diferentes fases da espermatogênese, provavelmente pelo rígido controle endócrino que tem forte papel em mediar estas divisões, fato que não ocorre em vertebrados de grupos basais que possuem gametogênese cística, onde ocorre maior número de um determinado tipo celular que outro, conforme o período do ciclo reprodutivo; além disso, o período gametogênico pode ser interrompido ou ativado, sendo modulado por fatores endócrinos e ambientais (Paniagua *et al.*, 1990, França & Godinho, 2003).

Pesquisas que abordam os aspectos reprodutivos em anuros devem considerar o resultado de processos evolutivos e o modo como as espécies interagem com o ambiente que ocupam. Desta maneira, muitos estudos descrevem a variação entre características reprodutivas e demográficas de maneira a sugerir hipóteses sobre as bases adaptativas e seletivas para os padrões apresentados. Fatores abióticos, como a temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar exercem importante influência sobre a atividade reprodutiva dos anfíbios anuros (Pombal Jr., Sazima & Haddad, 1994), sendo que o ciclo reprodutivo de muitas espécies está relacionado a fatores intrínsecos à área de estudo (Toledo, Zina & Haddad, 2003). A maioria das espécies de regiões caracterizadas por sazonalidade se reproduz no período quente e úmido, apresentando ciclo gametogênico do tipo descontínuo (Donnelly & Guyer, 1994), enquanto que em regiões onde não há sazonalidade, as espécies tendem a se reproduzir ao longo do ano e possuem ciclo gametogênico do tipo contínuo (Crump, 1974).

Com uma distribuição que contempla diversos ambientes com diferentes características climáticas, *P. cuvieri* reproduz-se em regiões com sazonalidade definida,

como é o caso da Mata Atlântica, e regiões sem sazonalidade ou pouco definida, como no Cerrado Brasileiro. Estudos realizados por Moresco *et al.* (*in press*) nas populações de *P. cuvieri* pertencentes a estes dois biomas revelaram índice de diferenciação genética (F_{ST}) > 0.288, o que mostra que estas duas populações estão altamente diferenciadas geneticamente. Desta maneira, a diversidade genética pode permitir uma alta plasticidade relacionada à sobrevivência e reprodução em ambientes tão variados, embora a estratégia reprodutiva seja a mesma. A variabilidade genética é uma importante característica das populações, em curto prazo para aptidão dos indivíduos, e em longo prazo para a sobrevivência da população, pois permite adaptação a mudanças nas condições ambientais que ocorrem. Em pequenas populações isoladas a variabilidade genética pode ser substancialmente reduzida através de deriva genética e endocruzamento, resultando na perda de alelos e declínio na heterose. Tais reduções podem resultar num declínio da aptidão e eventual extinção (Carvalho & Hauser, 1998).

Em estudos anteriores realizados com *P. cuvieri* foi verificado que esta espécie apresenta reprodução restrita ao período de estação chuvosa, utilizando-se de poças temporárias e permanentes para a deposição dos ovos (Barreto & Andrade, 1995). Em nosso estudo verificamos a freqüente utilização de pequenas poças de água formadas pela pisoteada do gado bovino no solo coberto por gramíneas nos locais de coleta. Desta maneira, a desova sempre é feita em corpos d'água com vegetação rasteira próxima, o que garante proteção aos ninhos de espuma contra a dessecação, predação e possível deslocamento caso haja grande intensidade de ventos, sendo esta estratégia um dos fatores que possibilita a existência desta e outras espécies de *Physalaemus* em ambientes tão heterogêneos (Heyer, 1969; Cei, 1980; Heyer *et al.*, 1990; Barreto & Andrade, 1995; Zina, 2006).

Arzabe (1991) analisou duas populações de *P. cuvieri* presentes na Caatinga durante um período de seca, onde a média anual de pluviosidade foi menor que a metade esperada. Uma das populações estava localizada em área extremamente árida e a densidade de machos vocalizando foi muito baixa; a segunda população estava em uma área coberta por vegetação mesófila e a densidade de machos foi muito maior. Porém, não houve a constatação de atividade reprodutiva nas duas áreas, ou seja, parece que o índice de pluviosidade é tão importante quanto à temperatura para que aconteça o período reprodutivo. Um fato interessante observado no presente estudo foi que após alguns dias de intensa precipitação o número de machos vocalizando diminuía consideravelmente conforme se afastava o último dia de precipitação, mesmo os corpos d'água estando ainda cheios, indicando que a oxigenação da água e seu pH podem também determinar a atividade reprodutiva.

Nossa pesquisa evidenciou que a variância total dos tipos celulares explicada foi de 23%, sendo o eixo 1 responsável por 68,7% desta variação e a precipitação o fator biótico determinante para este eixo. Certamente outras variáveis estariam relacionadas com a explicação completa do padrão observado das variações testiculares ao longo do ciclo reprodutivo da espécie. Ter Braak (1987) e Ter Braak & Prentice (1988) afirmam que perturbações não-explicadas pela CCA são vistas como naturais, não comprometendo a significância das correlações encontradas, sendo que a variância restante pode estar associada a variáveis ambientais não-registradas, como fotoperíodo, pH da água, evapotranspiração, entre outras. Através da CCA aplicada em nosso estudo foi possível indicar que o aumento da precipitação é o fator determinante para que as gônadas saiam do estado regenerativo para entrarem no estado pré-reprodutivo, ou seja, este fator estimula o sistema endócrino que por sua vez determina o início da espermatogênese. Os demais fatores ambientais analisados estão mais relacionados com o processo de espermiogênese,

como verificado no eixo 2 (10,2% da variância total acumulada), determinante para o início do período reprodutivo (Fig. 2). Estes dados corroboram nossas observações em campo de que em dias onde há aumento da velocidade do vento e/ou diminuição da temperatura e/ou da umidade relativa, os animais não vocalizam na sua grande maioria, mesmo já estando no período reprodutivo.

A variação da morfologia testicular observada no presente trabalho ao longo do ciclo reprodutivo coaduna com o padrão de comportamento reprodutivo descrito para *P. cuvieri* por Barreto & Andrade (1995), que embora esteja presente em região Neotropical, não apresenta ciclo reprodutivo contínuo como normalmente descrito para esta área. Ao que tudo indica, esta espécie apresenta um ciclo reprodutivo do tipo potencialmente contínuo, uma vez que há um período do ano em que os animais apresentam baixa atividade reprodutiva coincidente com o inverno. Este tipo de ciclo reprodutivo foi observado por Ferreira, Santos Rosa & Mehanna (2009) para *Leptodactylus podicipinus* em estudo realizado no Pantanal Sul-mato-grossense.

Em nosso estudo foi determinado um padrão de morfotipos celulares presentes nas gônadas que caracterizam o ciclo reprodutivo de *P. cuvieri*, sendo no período pré reprodutivo encontrado um grande número de espermátides em relação aos outros tipos celulares, indicando que já havia iniciado nos testículos as divisões celulares do tipo meiose; além disso, foi possível determinar que o processo de espermiogênese também estava acontecendo, comprovado pela presença de feixes de espermátides II. Este padrão registrado no período pré-reprodutivo foi relatado por Ferreira, Santos Rosa & Mehanna (2009) em estudos com *L. podicipinus* e *L. chaquensis*, sendo que para a primeira espécie o período caracterizado por feixes de espermátides refere-se ao mês de outubro e para a segunda espécie refere-se aos meses de agosto e dezembro. Em nossa pesquisa a população da Mata Atlântica permaneceu no período pré-reprodutivo durante os meses de agosto,

setembro e outubro, enquanto a população do Cerrado apresentou esta característica apenas no mês de outubro.

Nas regiões tropicais de clima sazonal, a atividade reprodutiva de anuros está intimamente relacionada ao período chuvoso (Duellman & Trueb, 1986), sendo que este padrão foi confirmado por outros autores (Hoogmoed & Gorzula, 1979; Aichinger, 1987; Santos & Oliveira, 2008; Santos, Franco-Belussi & Oliveira, 2011). Em nosso estudo o período reprodutivo foi caracterizado pela presença de todos os tipos celulares nos lóculos seminíferos, sendo que os espermatozóides ocupavam grande porção da luz destes lóculos durante os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro na Mata Atlântica, e durante os meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março no Cerrado. Desta forma, assim que as temperaturas e precipitação começaram a baixar houve interrupção do período reprodutivo e os animais passaram a não produzirem mais espermatozóides.

Durante o período regenerativo os lóculos seminíferos se mostraram bastante diminutos, preenchidos em sua maioria por espermatogônias, caracterizando muito provavelmente um período de reposição de células germinativas através de mitoses. Por muitos anos este período foi classificado como repouso gonadal, por acreditar-se que havia baixa atividade celular, uma vez que os animais não estavam se reproduzindo. Porém, recentemente em estudos com gônadas de peixes foi proposta a classificação como período regenerativo, ou seja, um estágio de intensa atividade celular para reposição de novas espermatogônias para o próximo período reprodutivo (Wildner *et al.*, 2013). Assim, embora os animais não estivessem se reproduzindo, seu estado metabólico manteve as atividades basais das gônadas.

Segundo Pinter, Storey & Utsch (1992), a temperatura se mostrou um fator determinante para animais que apresentam ciclo reprodutivo do tipo descontínuo. Uma vez que a temperatura estiver muito baixa e a precipitação for alta, isto não estimulará o início

do período de reprodução; da mesma forma, se a temperatura for alta e a precipitação não tiver sido suficiente, os animais não vocalizam, fatos estes observados em nosso estudo. Frente a condições adversas do ambiente, como redução drástica dos níveis de pluviosidade, temperaturas elevadas ou severamente baixas, muitos organismos são capazes de diminuir a taxa metabólica permanecendo em um estado hipometabólico (Guppy, 2004). Em anfíbios anuros este processo de redução metabólica está relacionado com a estivação, que é caracterizada por ajustes que incluem maior dependência da oxidação de reservas de lipídios, redução da respiração cutânea com menor perda da evaporação cutânea da água, e conseqüente acúmulo de água no corpo (Fuery *et al.*, 1998; Guppy & Withers, 1999). Fatores endógenos, como regulação endócrina, determinam a entrada do animal num estado de estivação, uma vez que mesmo exposto a luz ou oferta de alimento o animal entra em dormência espontaneamente (Pinter *et al.*, 1992).

Na maioria das espécies de anuros que estiveram a diminuição da taxa metabólica associada com o hábito de se enterrar é muito importante para diminuir os efeitos causados pelas altas temperaturas e seca (Wither & Thompson, 2000; Booth, 2006; Cartledge *et al.*, 2006). Este fenômeno não foi observado em nosso experimento, quando os animais permaneceram em caixas durante o inverno, sendo que, embora ficassem escondidos a maior parte do tempo em baixo de folhas ou espaços entre as pedras, respondiam aos estímulos externos, movimentando-se e até alimentando-se quando alguma presa estava disponível.

Desta maneira, podemos concluir que *P. cuvieri* não entra em estado de estivação, porém diminui bastante suas atividades no período regenerativo. Além disso, verificou-se que as gônadas diminuem a produção de espermatozoides durante o inverno, sendo este processo re-estabelecido quando ocorre um aumento na temperatura e principalmente na precipitação, fator ambiental este que se mostrou determinante para o re-início do período

reprodutivo. E, embora estas características tenham sido observadas nos dois biomas estudados, certamente a diversidade genética particular de cada população determina a sobrevivência e reprodução desta espécie em ambientes tão heterogêneos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização da captura de anfíbios (Licença número SISBIO 18573-1); às biólogas Estela Rodrigues Pinto e MSc. Verônica Thiemi Tsutae de Sousa pelo auxílio em coleta dos casais de *E. nattereri*; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), UNESP e UNIOESTE pelo suporte para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aichinger M. (1987) Annual activity patterns of anurans in a seasonal neotropical environment. *Oecologia*, **1987**: 583–592.
- Aleixo A., Albernaz A., Grelle C.E.V., Vale M.M. & Rangel T.F. (2010) Mudanças climáticas e a biodiversidade dos biomas brasileiros: passado, presente e futuro. *Natureza & Conservação*, **8**: 194–196.
- Arzabe C. (1991) *Reprodução e desenvolvimento larvário de anfíbios anuros em duas comunidades da caatinga*. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba.
- Barreto L. & Andrade G.V. (1995) Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, **16**: 67–76.
- Bertoluci J.A. (1998) Annual patterns of breeding activity in Atlantic Rainforest anurans. *Journal of Herpetology*, **32**: 607–611.

- Booth D.T. (2006) Effect of soil type on burrowing behavior and cocoon formation in the green-striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. *Canadian Journal of Zoology*, **84**: 832–838.
- Cartledge V.A., Withers P.C., Thompson G.G. & McMaster K.A. (2006) Water relations of the burrowing sandhill frog, *Arenophryne rotunda* (Myobatrachidae). *Journal of Comparative Physiology Part B*, **176**: 295–302.
- Carvalho G.R. & Hauser, L. (1998) Advances in the molecular analysis of fish population structure. *Italian Journal of Zoology*, **65**: 21–33.
- Cei J.M. (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.) Monograph*, **2**: 1–609.
- Crump M.L. (1974) Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Miscellaneous Publication Museum of Natural History*, **61**: 1–68.
- Donnelly M.A. & Guyer C. (1994) Patterns of reproduction and habitat use in assemblage of neotropical hylid frogs. *Oecologia*, **98**: 291–302.
- Duellman W.E. & Trueb L. (1994) *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- Eiten G. (1972) The Cerrado vegetational of Brazil. *The Botanical Review*, **38**: 201–341.
- Ferreira A., Santos Rosa A.B. & Mehanna M. (2009) Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). *Acta Scientiarum*, **31**: 447–452.
- França L.R. & Godinho C.L. (2003) Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, **68**: 1554–1561.
- Fuery C.J., Withers P.C., Hobbs A.A. & Guppy, M. (1998) The role of protein synthesis during metabolic depression in the Australian desert frog, *Neobatrachus centralis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **119**: 469–476.

- Gottsberger G., Silberbauer-Gottsberger I. (2006) *Life in the Cerrado; Origin, structure, dynamics and plant use: A South American tropical seasonal vegetation*. Reta, Ulm.
- Guppy M. (2004) The biochemistry of metabolic depression: a history of perceptions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **139**: 435–442.
- Guppy M. & Withers P. (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews*, **74**: 1–40.
- Heyer W.R. (1969) The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Evolution*, **23**:421–428.
- Heyer W.R., Rand A.S., Cruz C.A.G., Peixoto O.L. & Nelson C.E. (1990). Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*, **31**: 231–410.
- Hoogmoed M. & Gorzula S. (1979) Checklist of the savanna inhabiting frogs of the el Manteco region with notes on the is ecology and the description of a new species of tree frog (Hylidae, Anura). *Zoologische Mededeelingen*, **54**: 183–216.
- IBAMA. (2013) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Ecosistemas, Mata Atlântica. Acesso: http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm.
- Lofts B. (1974). Reproduction. In: *Physiology of the amphibians* (Eds Lofts B.), pp 107-208. Academic Press, New York.
- Lofts B. (1964) Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog *Rana esculenta*. *General and Comparative Endocrinology*, **4**: 550–621.
- Maack R. (2012) *Geografia Física do Estado do Paraná*. Editora UEPG, Ponta Grossa.
- Martori R., Aun L., Birri A., Rozzi-Giménez C. & Heredia, E. (2005) Reproducción comparada de tres especies de anuros sintónicos de una localidad del sudeste de Córdoba. *Cuadernos de Herpetología*, **19**: 43–60.

- McCune B. & Grace J.B. (2002) *Analysis of Ecological Communities*. MjM Software Design, Gleneden Beach.
- Moresco R.M., Maniglia T.C., Oliveira C. & Margarido V.P. The pioneering use of ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) in Neotropical anurans: preliminary assessment of genetic diversity in populations of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Leiuperidae). *Biological Research, in press*.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Fonseca G.A.B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**: 853–858.
- Napoli M.F. & Caramaschi U. (2000) Description and variation of a new Brazilian species of the *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). *Alytes*, **17**: 165–184.
- Nimer E. (1989) *Climatologia do Brasil*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro.
- Norris D.O. & Lopez K.H. (2011) *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Amphibians*. Elsevier, London.
- Paniagua R., Fraile B. & Sáez F.J. (1990) Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histology and Histopathology*, **5**: 365–378.
- Pinter A.W., Storey K.B. & Utsch G.R. (1992) Estivation and Hibernation. In: *Environmental Physiology of the Amphibians* (Eds Feder M.E. & Burggreen W.W.), pp. 250–274. Press for University of Chicago, Chicago.
- Pombal Jr. J.P., Sazima I. & Haddad C.F.B. (1994) Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*, **28**: 516–519.
- Quiroga L.B. & Sanabria E.A. (2012) Variation in reproductive parameters of *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura: Bufonidae) between the reproductive and post-reproductive periods. *Belgian Journal of Zoology*, **142**: 68–73.

- Ribeiro M.G. & Lima S.R. (2000) *Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia*. Segrac Editora, Belo Horizonte.
- Santos L.R.S., Franco-Belussi L. & Oliveira C. (2011) Germ Cell Dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoological Science*, **28**: 840–844.
- Santos L.R.S. & Oliveira C. (2008) Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, **39**: 1266–1270.
- Sasso-Cerri E., Faria F.P., Muller E.F. & Miraglia S.M. (2004) Testicular Morphological Changes During the Seasonal Reproductive Cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 301: 249–260.
- SBH. (2013) *Sociedade Brasileira de Herpetologia: A Lista Brasileira de Anfíbios e Répteis*. Acesso: http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/checklist_brasil.asp.
- Segatelli T.M., Batlouni S.R. & França L.R. (2009) Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, **72**: 894–901.
- Ter Braak C.J.F. (1987) The analysis of vegetation environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetation*, **69**: 69–77.
- Ter Braak C.J.F. & Prentice I.C. (1988) A theory of Gradient Analysis. *Advances in Ecological Research*, **18**: 271–317.
- Toft C.A. (1985) Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia*, **1985**: 1–21.
- Toledo L.F., Zina J. & Haddad C.F.B. (2003) Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de anfíbios anuros do município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. *Holos Environment*, **3**: 136–149.
- Vasconcelos T.S., Santos T.G., Haddad C.F.B. & Rossa-Feres D.C. (2010) Climatic variables and altitude as predictors of anuran species richness and number of reproductive modes in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, **26**: 423–432.

- Walter H. (1986) *Vegetação e Zonas Climáticas*. E.P.U. Ltda, São Paulo.
- Wildner D.D., Grier H. & Quagio-Grassiotto I. (2013) Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. *Theriogenology*, **79**: 709–724.
- Withers P.C. & Thompson G.G. (2000) Cocoon formation and metabolic depression by the aestivating hylid frogs *Cyclorana australis* and *Cyclorana cultripes* (Amphibia: Hylidae). *Journal of the Royal Society of Western Australia*, **83**: 39–40.
- Zina J. (2006) Communal nests in *Physalaemus pustulosus* (Amphibia: Leptodactylidae): experimental evidence for female oviposition preferences and protection against desiccation. *Amphibia-Reptilia*, **27**: 148–150.

Tabela 1: Caracterização dos períodos que compõem o ciclo reprodutivo de *Physalaemus cuvieri* nos biomas de Mata Atlântica e Cerrado.

	Mês do ano	Vocalização	Desovas	Prec. (mm)	Temp. (C°)	Umid. (%)	Vem. (m/s)
Mata Atlântica							
Reprodutivo	1, 2, 11, 12	Presente	Presente	4,74 ± 12,28	20,25 ± 2,55	79,78 ± 10,44	2,49 ± 1,56
Regenerativo	3, 4, 5, 6, 7	Ausente	Ausente	4,94 ± 14,24	14,61 ± 3,95	79,67 ± 10,57	3,32 ± 1,42
Pré-reprodutivo	8, 9, 10	Presente	Ausente	5,58 ± 15,46	15,52 ± 3,86	74,88 ± 13,46	3,58 ± 1,23
Cerrado							
Reprodutivo	1, 2, 3, 11, 12	Presente	Presente	4,24 ± 8,08	26,16 ± 2,09	69,65 ± 12,71	2,08 ± 0,49
Regenerativo	4, 5, 6, 7, 8,9	Ausente	Ausente	1,11 ± 4,85	22,86 ± 3,41	57,18 ± 14,77	2,07 ± 0,52
Pré-reprodutivo	10	Presente	Ausente	3,51 ± 8,15	25,18 ± 2,47	59,87 ± 15,25	2,09 ± 0,47

Meses do Ano: 1 = Janeiro, 2 = Fevereiro, 3 = Março, 4 = Abril, 5 = Maio, 6 = Junho, 7 = Julho, 8 = Agosto, 9 = Setembro, 10 = Outubro, 11 = Novembro, 12 = Dezembro; Prec. = Média e Desvio Padrão da Precipitação; Temp. = Média e Desvio Padrão da Temperatura; Umid. = Média e Desvio Padrão da Umidade Relativa do Ar; Vem. = Média e Desvio Padrão da Velocidade do Vento.

Tabela 2: Resultado do teste de Monte Carlo para Autovalores e Correlação espécie-ambiente.

Eixos	Dados reais	Dados randomizados			p
		Médio	Máximo	Mínimo	
Autovalores					
1	0,163	0,029	0,007	0,080	0,0101
2	0,024	0,003	0,000	0,008	
Correlação espécie-ambiente					
1	0,882	0,371	0,192	0,624	0,0101
2	0,984	0,289	0,105	0,579	

Baseado em dados aleatorizados 99 vezes.

Tabela 3: Área dos morfotipos celulares (μm^2 = Média e Desvio Padrão) nos períodos que compõem o ciclo reprodutivo de *Physalaemus cuvieri* nos biomas de Mata Atlântica e Cerrado.

	Epg I	Epg II	Epc I	Epc II	Epti I	Epti II	Epz
Mata Atlântica							
Reprodutivo	3192,10 ± 126,85	7740,75 ± 177,67	18777,52 ± 709	9710,74 ± 590,04	3816,17 ± 107,91	6188,20 ± 1211,71	8218,08 ± 744,91
Regenerativo	18413,23 ± 826,36	4182,624 ± 201,71	10059,11 ± 1137,13	6094,072 ± 1026,68	1766,408 ± 215,28	2478,442 ± 293,53	1599,156 ± 459,24
Pré-reprodutivo	3175,252 ± 98,59	7977,328 ± 108,81	20159,72 ± 941,48	10048,95 ± 416,19	6337,508 ± 71,65	12156,49 ± 1220,67	4436,268 ± 358,24
Cerrado							
Reprodutivo	3175,796 ± 177,3	7897,434 ± 207,58	19154,97 ± 1041	10375,53 ± 574,84	3516,57 ± 124,46	7063,04 ± 226,83	8665,508 ± 325,97
Regenerativo	19022,2 ± 1045,17	4460,04 ± 125,32	10411,66 ± 843,32	7081,35 ± 514,85	1983,4 ± 119,01	2800,63 ± 135,61	1304,83 ± 283,03
Pré-reprodutivo	3143,682 ± 232,16	7902,966 ± 100,67	20018,25 ± 852,49	9890,546 ± 517,04	6954,914 ± 186,02	10919,57 ± 772,07	4140,218 ± 400,85

Epg I = Média e Desvio Padrão de espermatogônia I; Epg II = Média e Desvio Padrão de espermatogônia II; Epc I = Média e Desvio Padrão de espermatócito I, Epc II = Média e Desvio Padrão de espermatócito II; Epti I = Média e Desvio Padrão de espermatíde I, Epti II = Média e Desvio Padrão de espermatíde II, Epz = Média e Desvio Padrão de espermatozóide.

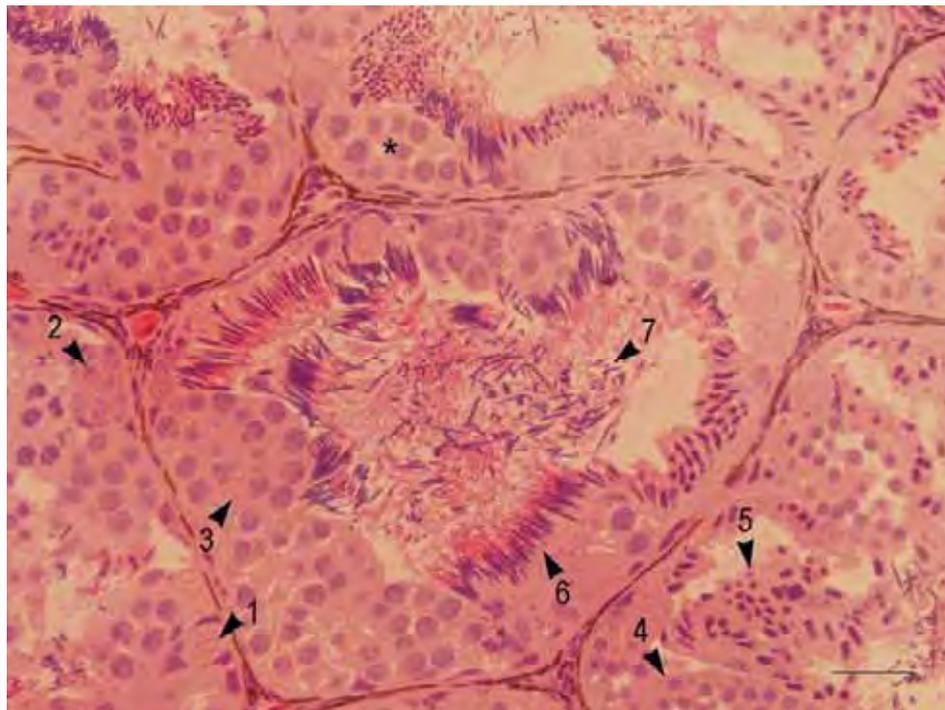


Figura 1: Secção histológica transversal de testículo de *P. cuvieri* evidenciando tipos celulares registrados no período reprodutivo: 1 = espermatogônia I, 2 = espermatogônias II, 3 = espermatócitos I, 4 = espermatócitos II; 5 = espermatídes I; 6 = espermatídes II, 7 = espermatozóides e * = Formação em cisto espermatogênico. Coloração H/E. Barra = 30 μ m. Indivíduo de Mata Atlântica.

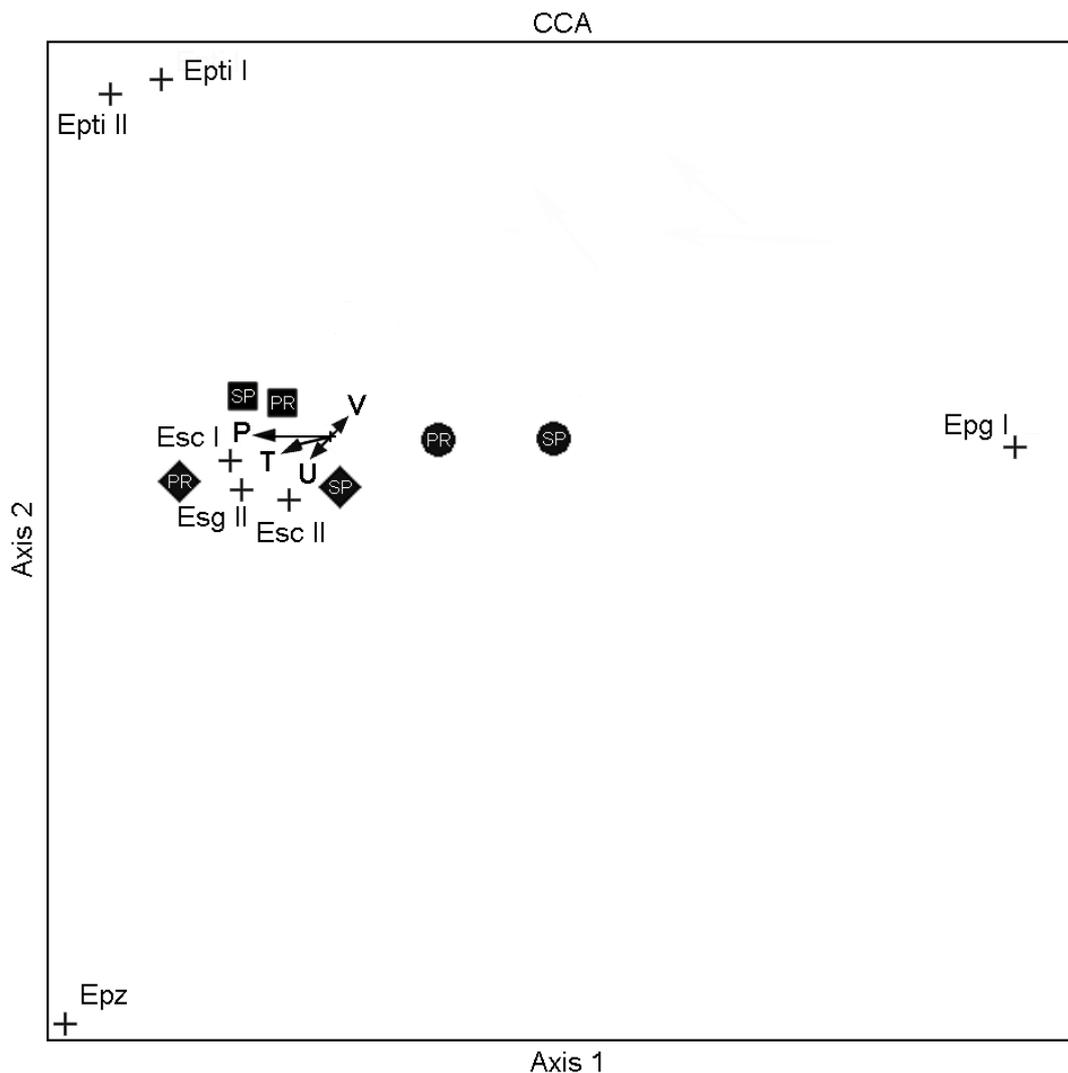


Figura 2: Diagrama de ordenação produzido pela Análise de Correspondência Canônica. (+) Tipos celulares: Epg I = espermatogônia I, Epg II = espermatogônia II, Esc I = espermatócito I, Esc II = espermatócito II; Epti I = espermátide I; Epti II = espermátide II e Epz = espermatozóide. Ciclo Reprodutivo: \blacklozenge \blacklozenge = Período Reprodutivo, \blacksquare \blacksquare = Período Pré-Reprodutivo, \bullet \bullet = Período Regenerativo. Variáveis ambientais representadas por vetores: P = Precipitação, T = Temperatura, U = Umidade Relativa e V = Velocidade do Vento.

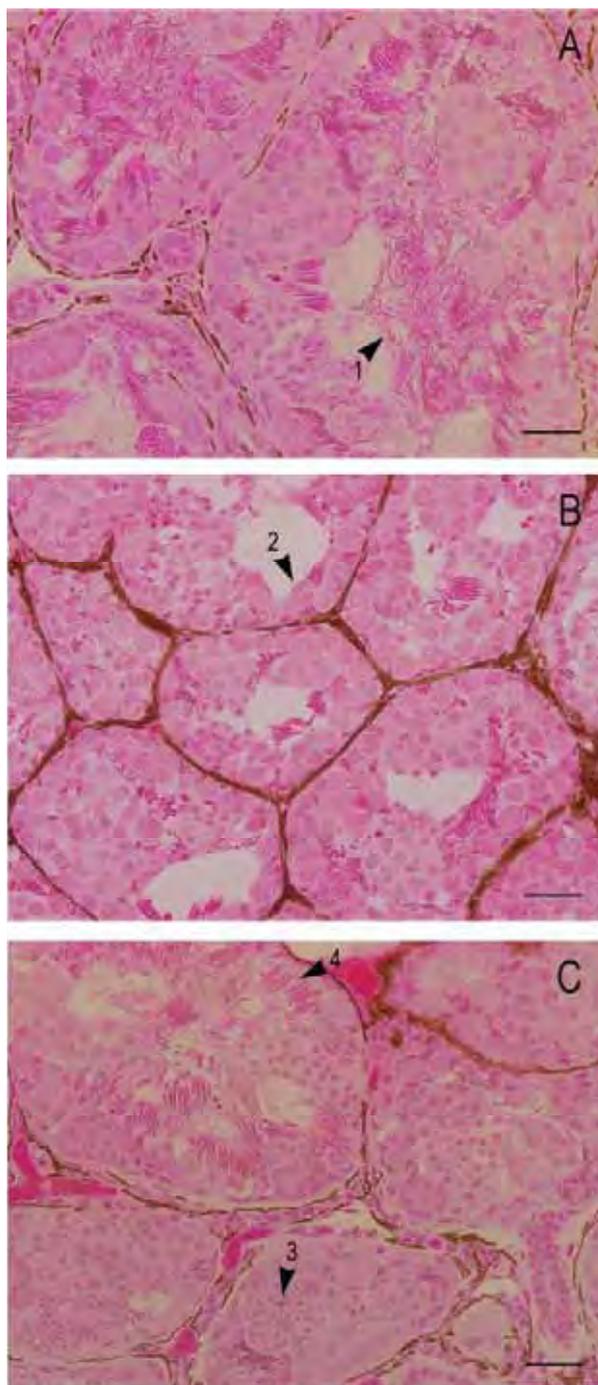


Figura 3: Secções histológicas transversais de testículos de *P. cuvieri*: (A) Período Reprodutivo, 1 = espermatozóides; (B) Período Regenerativo, 2 = espermatogônias I; (C) Período Pré-Reprodutivo, 3 = espermátide I e 4 = espermátide II. Coloração: H/E. Barra = 30 μ m. Indivíduos coletados no Cerrado.

Varição da área pigmentada por melanina em testículos de duas espécies de Leiuperidae: respostas na espermatogênese e espermiogênese

Rafaela M. Moresco^{1,2*}, Pitágoras A. Piana², Vladimir P. Margarido², Classius de Oliveira¹

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Departamento de Biologia. Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth. CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Phone: +55 17 3221 2387

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário. CEP 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil. Phone: +55 45 3220-3235

* Autor para correspondência:

Rafaela Maria Moresco

E-mail: rafaelabiologia@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido no periódico *Biological Journal of the Linnean Society*:

(<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291095-8312>)

Título: The variation of testicular melanocytes density throughout the reproductive cycle in two Leiuperidae species: the response in spermatogenesis and spermiogenesis

RESUMO

Muitos estudos indicam que a melanina extracutânea poderia atuar como antioxidante nos tecidos. Neste trabalho determinamos a relação existente entre a área testicular pigmentada de duas populações de *Physalaemus cuvieri*, e os períodos do ciclo reprodutivo (pré-reprodutivo, reprodutivo e regenerativo). Além disso, analisou-se em indivíduos de *Eupemphix nattereri* a relação entre a espermiogênese e a área testicular pigmentada. Foram coletados 15 indivíduos de *P. cuvieri* em cada população, sendo a relação pigmentação testicular e período reprodutivo avaliada através de ANOVA. Foram coletados 10 casais em amplexo e 5 machos solitários de *E. nattereri* para o grupo controle, separados em três grupos: 1 dia após a ejaculação, 1 semana após a ejaculação e grupo controle. A relação entre a presença de melanócitos e o processo de espermiogênese foi mensurada através da correlação entre áreas ocupadas por espermátides e espermatozóides com a área ocupada por melanócitos. Todos os animais tiveram seus testículos retirados, imersos em solução fixadora Karnovsky, incluídos em historesina para cortes de 2 μ m e coradas com Hematoxilina-eosina. Sobre o processo de espermatogênese foi verificado um aumento significativo da área pigmentada nos testículos de *P. cuvieri* durante o período regenerativo, enquanto não houve mudança da pigmentação relacionada com o processo de espermiogênese. Uma provável razão seria a produção custosa de melanina contra a ação do estresse oxidativo tornar-se viável apenas para a manutenção da integridade das células germinativas, armazenadas por um longo período nos lóculos seminíferos, durante o período regenerativo até o próximo período reprodutivo, este que é caracterizado pelo tempo reduzido em que as células permanecem nos lóculos seminíferos.

Palavras chave: Anura, Estresse Oxidativo, Melanina, Sistema Pigmentar Extracutâneo, Testículos.

INTRODUÇÃO

Cromatóforos são células contendo grânulos de pigmentos e estão presentes principalmente no sistema cutâneo dos animais. Estas células podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo pigmentar em melanócitos, que contém grânulos de melanina com coloração castanho escuro; iridóforos, que contém purinas e cristais de pteridina e apresentam cor iridescente; xantóforos, que contém pteridinas e carotenóides e apresentam cores do amarelo ao laranja; eritróforos, que contém pteridinas e carotenóides e apresentam cores do laranja ao vermelho (Klaus, 2006).

Devido à melanina ser o pigmento mais comum encontrado nos vertebrados, os melanócitos são as células pigmentares mais estudadas (Bossche *et al.*, 2006). Estas células apresentam uma morfologia irregular e grande volume citoplasmático, onde estão os pigmentos armazenados em grânulos denominados melanossomos, sendo que a própria célula sintetiza estes pigmentos (Zieri *et al.*, 2007). As células pigmentadas que apresentam atividades macrofágicas são denominadas “células pigmentadas tipo macrófago” (Micale & Perdichizzi, 1990), “melanomacróforos” ou “macróforos pigmentados” (Manera *et al.*, 2000); entretanto apresentam origem e função diferentes dos melanócitos, sendo presença da melanina a única semelhança que se pode destacar.

Os melanócitos podem ser classificados de acordo com sua localização em melanócitos clássicos, presentes na cútis, e que possuem origem embrionária a partir de melanoblastos oriundos da crista neural que migram através da via dorso-lateral para as diferentes regiões da pele; e melanócitos não-clássicos, presentes no sistema pigmentar extracutâneo oriundos de melanoblastos que apresentaram diferente destino embrionário que não a via dorso-lateral (Brito & Kos, 2008). A presença de melanócitos não-clássicos já foi relatada em órgãos como olhos, ouvido, coração, sistema nervoso central, intestino e gônadas (Steel & Barkway, 1989; Zareba *et al.*, 2006; Franco-Belussi *et al.*, 2009;

Hearing, 2009; Levin *et al.*, 2009; Moresco & Oliveira, 2009; Tu *et al.*, 2009; Murillo-Cuesta *et al.*, 2010, Provete *et al.*, 2012).

No sistema pigmentar extracutâneo os melanócitos localizam-se no próprio tecido conjuntivo do órgão ou de tecidos associados ao mesmo, como túnicas adventícias ou membranas serosas (Franco-Belussi *et al.*, 2011). Em muitos locais as células pigmentadas apresentam aspecto dendrítico com muitos prolongamentos citoplasmáticos repletos de pigmentos. Quando há deslocamento dos pigmentos para o centro da célula, esta se apresenta com aspecto puntiforme e centro mais escuro (Wang *et al.*, 1997; Rogers & Gelfand, 1998; Rodionov *et al.*, 1998; Oliveira & Zieri, 2005). Estas características morfológicas são semelhantes às apresentadas pelos melanócitos da cútis, porém não existem estudos que evidenciem semelhanças funcionais ou se este sistema está condicionado aos mesmos mecanismos que desencadeiam as mudanças de cor morfológica da cútis (Meyer zum Gottesberge, 1988).

As células pigmentares na pele animal apresentam funções distintas, tais como regulação do calor, proteção contra raios prejudiciais e excreção de determinados produtos metabólicos finais. Entretanto, a coloração para proteção e comunicação parece ser a função mais importante dos cromatóforos na pele de teleósteos, e sabe-se que estas células podem sofrer alterações em resposta a estímulos externos ou internos (Sugimoto *et al.*, 2005).

Há anos que alguns pesquisadores têm observado que o sistema pigmentar pode sofrer alterações devido a estímulos associados principalmente a mudanças na intensidade luminosa, cor do ambiente ou alteração no contexto social, isto é, presença de um predador ou alterações na taxa de machos e fêmeas da população. A mudança de cor morfológica é aquela que ocorre de forma gradativa e seu resultado permanece por mais tempo, e a mudança de cor fisiológica é aquela que altera rapidamente a coloração do animal devido à

migração dos pigmentos dentro dos cromatóforos (Bagnara e Hadley 1973; Sugimoto, 2002).

Diversos estudos já mostraram a presença de melanócitos em testículos de vertebrados como peixes (Louiz *et al.*, 2009), anfíbios (Zieri *et al.*, 2007; Franco-Belussi *et al.* 2009, Provete *et al.* 2012), répteis (Guillette *et al.*, 1983), aves (Serventy & Marshall, 1956; Hore, 1994; Galván *et al.*, 2011) e mamíferos (Scott & Fritz, 1979; Poole & Lawton, 2009). Muitos destes estudos têm buscado uma resposta fisiológica para a presença de pigmentação extracutânea que parece estar relacionada com a proteção do tecido associado aos melanócitos, atuando como antioxidante e contra agentes tóxicos (Levin *et al.*, 2009; Randhawa *et al.*, 2009; Franco-Belussi & Oliveira, 2011); entretanto, ainda não são muito bem compreendidas as relações com os fatores que alterariam sua ocorrência. Por outro aspecto, este sistema pode ser uma característica taxonômica conservada, sendo sugerida a sua utilização como caráter em estudos de filogenia (Christiansen *et al.*, 1996; Zuasti *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Grant, 2004; Grant *et al.*, 2006; Franco-Belussi *et al.*, 2009; Provete *et al.*, 2012).

Em anfíbios, assim como em outros grupos animais, muitos dos eventos que acontecem durante suas vidas acarretando mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas são controlados por variáveis abióticas (temperatura, fotoperíodo, umidade relativa) e/ou variáveis bióticas (competição intra e inter-específica, predação), as quais podem interagir de maneiras complexas e influenciar, por exemplo, o crescimento e o desenvolvimento do girino (Duellman & Trueb, 1994) e até mesmo sua morfologia e coloração (McCollum & Leimberger, 1997).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a relação existente entre a pigmentação testicular ao longo do ciclo reprodutivo em *Physalaemus cuvieri* relacionando a área de pigmentos testiculares com os períodos pré-reprodutivo, reprodutivo,

regenerativo do ciclo reprodutivo. Além disso, analisamos em indivíduos de *Eupemphix nattereri*, que haviam ejaculado, a relação entre as células envolvidas no processo de espermiogênese e a área contendo pigmentação testicular.

MATERIAL E MÉTODOS

-Physalaemus cuvieri

Para o estudo sobre a pigmentação testicular anual em *P. cuvieri* foram coletados 15 indivíduos durante o ano de 2010 em dois biomas brasileiros: fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Marmeleiro, PR (26°15'17.7" S; 53°04'15.0"O) e fragmentos de Cerrado na região de São José do Rio Preto, SP (20°47'07.05" S 49°21'42.09"O).

As coletas foram realizadas da seguinte forma em cada bioma: (1) 5 indivíduos no período pré-reprodutivo, caracterizado por poucos machos vocalizando em corpos d'água, ausência de ninhos de espuma característicos da espécie em campo, período de primavera-início de verão; (2) 5 indivíduos no período reprodutivo, caracterizado por muitos machos vocalizando em corpos d'água, presença de ninhos de espuma, período de verão; (3) 5 indivíduos no período regenerativo, caracterizado por machos sem atividade reprodutiva e alimentar, período de inverno e outono. Para conseguir o material biológico de animais no período regenerativo, após a coleta dos indivíduos em campo ao final do período reprodutivo, estes foram mantidos vivos em caixas feitas com armação de ferro e envolvidas por tela com dimensões de 75cm x 50cm x 50cm, onde permaneceram até o inverno. Ainda, foi colocada uma fêmea na caixa que ficou isolada dos machos em um compartimento menor, de tamanho proporcional à área utilizada por cada macho. As caixas ficaram expostas ao ambiente natural, e como eram envolvidas por telas, houve a entrada de presas que serviram para a alimentação dos animais aprisionados. Além disso, foi

colocado um recipiente com água dentro da caixa e algumas folhas e pedras para caracterizar melhor o ambiente. Estes recursos buscaram diminuir os efeitos da retirada dos machos de seus habitats naturais.

- *Eupemphix nattereri*

Para verificar se existem mudanças na pigmentação testicular após a cópula optou-se por utilizar a espécie *E. nattereri*, que no período reprodutivo é facilmente encontrada em amplexo na margem de corpos d'água; além disso, apresenta pigmentação testicular e faz parte da família Leiuperidae assim como *P. cuvieri*. Foram coletados, no mês dezembro de 2010, 10 machos e 10 fêmeas em amplexo e 5 machos para o grupo controle que vocalizavam solitários na região de São José do Rio Preto, SP. Os animais em amplexo foram individualizados e mantidos em caixas contendo recipiente com água durante uma noite, para que as oviposições, ejaculações e consequente fertilizações ocorressem. As desovas foram mantidas em laboratório até constatarmos a presença de girinos que comprovassem a fertilização. Desta maneira, os cinco primeiros animais que cruzaram foram sacrificados após 24 horas da ejaculação. Os outros cinco animais que cruzaram foram sacrificados após uma semana da ejaculação. Os cinco animais do grupo controle foram sacrificados assim que chegaram ao laboratório.

- Análise histológica

Todos os animais analisados foram anestesiados e levados a óbito por saturação em Benzocaína e abertos por laparotomia, seguindo o Guia para o Cuidado e o Uso dos Animais de Laboratório – Unesp (Protocolo 001/06 – CEEA).

Para análise em microscopia de luz foram retirados os testículos, pesados e imediatamente imersos em solução fixadora Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0.1M,

tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%), e encaminhados à rotina histológica (Ribeiro & Lima, 2000) para serem desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (*Leica-historesin embedding kit*). Foram feitas secções de 2 μ m (Micrótomo Leica RM2255) e coradas com Hematoxilina-eosina. Para cada animal foram analisados 15 campos fotografados com objetiva de 40x usando microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado com câmera digital Olympus DP 71 em conjunto com o software DP Controller 3.2.1.276. O software de análise de imagem Image Pro-Plus (Media-Cybernetics Inc.) foi utilizado para quantificar a área ocupada (μm^2) por pigmentos de melanina considerando uma área total de análise de 94.121,37 μm^2 relacionando com o período do ciclo reprodutivo.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Statistica 7.0 (2004). Os valores obtidos referentes à área ocupada por melanócitos testiculares (μm^2) nos três períodos observados foram logaritimizadas e analisadas através de uma ANOVA para amostras independentes no nível de significância de 0,05. Também analisamos através de ANOVA o produto entre área ocupada por melanócitos testiculares e o peso da gônada. Para a comparação complementar entre grupos foi utilizado o teste de Tukey, sendo que todas as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade de variância pelo teste de Levene's. Para verificar se havia relação entre a presença de melanócitos e os tipos celulares relacionados com o processo de espermiogênese foram comparados as áreas ocupadas por espermátides e espermatozóides (μm^2) com a área ocupada por melanócitos (μm^2), numa área total de análise de 94121.37 μm^2 nos dois grupos após a ejaculação e grupo controle, correlacionando estes dados.

RESULTADOS

Foi verificado que nas duas populações de *P. cuvieri* houve a presença de pigmentação testicular em todos os indivíduos pertencentes aos três períodos observados (pré-reprodutivo, reprodutivo e regenerativo). As gônadas se apresentaram como órgãos ovóides com pigmentação intensa de melanina (Fig. 1A). Foi possível observar unidades morfológicas denominadas de lóculos seminíferos que abrigam o epitélio germinativo cístico, sendo que no arcabouço de tecido conjuntivo entre estes lóculos estavam distribuídos os pigmentos de melanina (Fig. 1B).

- Melanócitos testiculares ao longo do ciclo reprodutivo: *Physalaemus cuvieri*

Período pré-reprodutivo

Os animais apresentaram gônadas com peso médio de $0.0051 \pm 0.0022\text{g}$. As gônadas caracterizaram-se por apresentar área locular média de $31097.85 \pm 1394.01\mu\text{m}^2$, sendo preenchida principalmente por células do tipo espermatíde I e espermatíde II além dos outros tipos celulares característicos, evidenciando o período pré-espermiogênico; desta forma, na luz de muitos lóculos não foi observada a presença de espermatozóides formados, embora eles estivessem presentes em alguns lóculos (Fig. 1B). A área ocupada por pigmentos de melanina representou em média $1603.12 \pm 216.62\mu\text{m}^2$.

Período reprodutivo

Neste período caracterizado por intensa atividade de vocalização dos animais em campo foi verificado que as gônadas apresentaram peso médio de $0.0046 \pm 0.0017\text{g}$. A área locular média foi de $29758.01 \pm 920.17\mu\text{m}^2$, sendo que a presença de espermatozóides na luz dos lóculos caracterizou esta fase de maturidade gonadal, que possui também os outros tipos celulares comumente encontrados (Fig. 1C). A área ocupada por pigmentos de melanina representou em média $947.36 \pm 153.15\mu\text{m}^2$.

Período regenerativo

Este período foi caracterizado por ausência das atividades de vocalização dos animais em campo, porém com intensa atividade de divisão mitótica nos testículos; foi verificado que as gônadas apresentaram peso médio de $0.001 \pm 0.0006\text{g}$ evidenciando uma diminuição do volume testicular. A área locular média foi de $16194.97 \pm 2188.24\mu\text{m}^2$, apresentando em seu interior principalmente espermatogônias I e espermatogônias II, além de espermatócitos I (Fig. 1D), sendo rara a presença de espermátides II e espermatozóides. A área ocupada por pigmentos de melanina representou em média $13197.45 \pm 2359.13\mu\text{m}^2$.

Houve alteração na área ocupada por melanócitos testiculares ao longo do ciclo reprodutivo. Esta diferença foi significativa tanto quando avaliamos a área ocupada pelos melanócitos, ou relacionamos a área ocupada por melanócitos com o peso testicular. Conforme evidenciado pelo teste de ANOVA, houve uma diferença significativa na presença de pigmentação quando comparados os três períodos (Fig. 2). Através do Teste de Tukey ao nível de 5% para comparação entre períodos, pode-se confirmar que houve diferença significativa entre os três períodos, sendo que a diferença da pigmentação testicular foi maior quando comparado o período regenerativo com os outros dois períodos.

- Melanócitos testiculares após ejaculação: *Eupemphix nattereri*

Pode-se afirmar que não aconteceram alterações significativas na pigmentação testicular quando comparados os três grupos analisados de *E. nattereri*, pós-ejaculação. O grupo controle caracterizou-se pela elevada quantidade de espermatozóides presentes em seus lóculos seminíferos (14376.64 ± 922.64); o grupo analisado um dia após a ejaculação apresentava lóculos seminíferos com poucos espermatozóides (1885.27 ± 394.89) e muitas espermátides (12669.52 ± 1550); o grupo analisado uma semana após a ejaculação

apresentou as mesmas características do grupo controle, ou seja, alta densidade de espermatozoides (13188.62 ± 1233.5); porém não houve correlação entre a área ocupada por espermátides e a área ocupada por pigmentos ($r=0.044$, $p=0.88$ e $N=15$). Da mesma maneira não houve correlação entre a área ocupada por espermatozoides e a área ocupada por pigmentos ($r=-0.05$, $p=0.86$ e $N=15$), de maneira que a pigmentação testicular apresentou-se inalterada ao longo deste período após a ejaculação dos animais (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Pesquisas que abordam a funcionalidade do sistema pigmentar extracutâneo apontam que a melanina atua em diversos órgãos de vertebrados para impedir o estresse oxidativo (Solano *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005; Zadlo *et al.*, 2006; Zareba *et al.*, 2006; Laurell *et al.*, 2007; Hearing, 2009; Levin *et al.*, 2009; Randhawa *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2009; Murillo-Cuesta *et al.*, 2010, Galván, 2011). Este estresse é definido como um acúmulo de espécies reativas de oxigênio, ou seja, radicais livres que resultam na indução de danos celulares (Sies, 1986; Sies, 1993; Halliwell, 1994).

Nosso estudo verificou que a intensa pigmentação testicular está presente num período onde as populações caracterizam-se por baixa atividade metabólica e ausência de comportamento reprodutivo, fato observado também em outras pesquisas que analisaram gônadas de aves e relacionaram o aumento da pigmentação com o período durante o qual os animais não se reproduzem (Anthony & Buss, 1974; Lake, 1981; Agrawal & Bansal, 1983; Hore *et al.*, 1994). Anteriormente denominado de repouso gonadal, este período de baixa atividade foi recentemente classificado em gônadas de peixes como período regenerativo, ou seja, um estágio de intensa atividade celular (Wildner *et al.*, 2013). Esta nova classificação parece mais adequada que a anterior uma vez que traduz este período representado pela proliferação de espermatogônias para o próximo ciclo reprodutivo. Desta

maneira, a existência de uma área maior de pigmentos de melanina durante o período regenerativo é justificável, visto que as células germinativas ficarão armazenadas por um longo período nos lóculos seminíferos até a próxima ejaculação, podendo ficar exposto ao estresse oxidativo do tecido por vários meses. Por outro lado, o fato de termos observado uma área maior contendo pigmentação durante o período pré-reprodutivo em relação ao período reprodutivo pode ser justificado pelo fato destes pigmentos ainda não terem sido eliminados em sua maioria, fato observado no período seguinte.

Os radicais livres são produzidos pelo citoplasma celular, mitocôndrias ou membrana plasmática de células, em processos naturais e constantes que ocorrem nos tecidos durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, pelo grupo heme de proteínas, ou ainda, pela exposição a fatores exógenos como radiação gama e ultravioleta (Halliwell & Gutteridge, 2007). Estes radicais podem motivar danos a lipídios, carboidratos, proteínas, além de outros componentes celulares bem como ao DNA, onde causam modificações de bases e outros danos como quebras no DNA e ligação cruzada proteína-DNA (Godar *et al.*, 1993; Cadet *et al.*, 1997; Slupphaug *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2003). Desta forma, as células e tecidos possuem uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas substâncias tóxicas geradas pelo metabolismo aeróbio e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas através da dieta, sendo um destes mecanismos a produção de melanina, uma vez que a enzima L-tirosinase precisa ser oxidada para formar DOPA a partir de tirosina e dar continuidade da via metabólica da melanina.

Gaván *et al.* (2011), observando a pigmentação testicular em aves, propuseram que caso a melanina tivesse uma função de proteger células germinativas do estresse oxidativo, esta característica de apresentar pigmentos nos testículos teria sido selecionada ao longo da evolução. Considerando-se que a produção de melanina é metabolicamente

custosa, este recurso de proteção permaneceu apenas nas espécies na qual a taxa de mutação no DNA mitocondrial fosse alta o bastante para compensar o custo do reparo. Em outros casos, a característica pode ter permanecido apenas por inércia filogenética, o que explicaria os padrões encontrados em espécies pertencentes a mesmo gênero ou família em anfíbios (Franco-Belussi *et al.*, 2009; Franco-Belussi *et al.*, 2012; Provette *et al.*, 2012). Esta situação é possível, uma vez que os genes relacionados com o processo de produção de melanina são nucleares e não apresentam nenhuma relação ou regulação sobre os genes mitocondriais (Bensch *et al.*, 2006).

Segundo Cortopassi & Arnheim (1990), o DNA mitocondrial acumula mutações com o passar do tempo em consequência das características particulares que apresenta como: localização próxima da cadeia respiratória, que é uma fonte de radicais livres nesta organela, ausência de histonas, ausência de íntrons e sistema de reparo pobre, sendo que muitas mutações são deletérias e afetam diretamente o complexo enzimático da cadeia respiratória, bem como a produção de RNA transportador e RNA ribossômico que são essenciais para a expressão do DNA mitocondrial (Clayton, 1982). Em locais onde as divisões celulares ocorrem com alta frequência, o acúmulo destas mutações não reparadas poderiam ser passadas adiante para inúmeras novas gerações celulares que teria sua funcionalidade mitocondrial comprometida (Wallace, 1992).

Em nosso estudo analisamos ainda a relação entre a atividade dos melanócitos testiculares e o processo de espermiogênese. Nesta fase as células passarão por um processo de alterações morfológicas e bioquímicas para tornarem-se espermatozoides funcionais (Phillips, 1974; Rastogi *et al.*, 1988). Após o início da espermiogênese, as espermátides e posteriores espermatozoides não passarão muitos dias armazenados nos lóculos seminíferos, uma vez que estarão sob ação de fatores externos e internos que estimulam o período reprodutivo, sendo que, quando não utilizados, são rapidamente

absorvidos pelo organismo (Gilbert, 2010). Desta maneira, considerando a possibilidade da melanina ser produzida para proteger células que permanecerão longo tempo em contato com espécies reativas de oxigênio presentes nos tecidos, energeticamente não compensaria a produção de melanina para estas células que permanecerão pouco tempo nos lóculos seminíferos.

Em trabalho realizado por Franco-Belussi & Oliveira (2011) com *E. nattereri*, foi verificado que houve um aumento da pigmentação na superfície testicular sob condições de endotoxemia induzida experimentalmente por lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*. Este aumento foi observado nos grupos analisados 2 horas, 6 horas e 12 horas após a aplicação via peritoneal, sendo que houve um decréscimo progressivo nos grupos após 24 horas e 48 horas da aplicação. O LPS é um fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Segundo Bianchi & Antunes (1999) o estresse oxidativo aumenta devido a processos inflamatórios, desta maneira podemos inferir que o mecanismo de ativação dos melanócitos testiculares pode ter sido ativado para a proteção do tecido, corroborando nossos resultados. Por outro lado, Luger & Brzoska (2007) indicam a atividade antiinflamatória do α MSH (α -Hormônio Estimulante de Melanócito), um tipo de melanocortina que apresenta efeito direto sobre células do sistema imune, modulando a atividade inflamatória de proliferação celular e migração. Desta forma, nos estudos de Franco-Belussi & Oliveira (2011) a resposta de aumento da pigmentação nos testículos pode ser ainda em decorrência do aumento da produção de α MSH como resposta a exposição do LPS, representando assim um efeito secundário o aumento da pigmentação.

É conhecido que mecanismos neuronais e hormonais são responsáveis pelo movimento de pigmentos em cromatóforos de peixes e em alguma espécie de répteis, embora cromatóforos de outros animais vertebrados ectotérmicos estejam somente sob o

controle hormonal (Erickson, 1998). O hormônio que regula a produção de melanina nos melanócitos é o MSH (Hormônio Estimulante de Melanócito), sendo produzido na hipófise e transportado até os cromatóforos através da circulação (Castrucci *et al.*, 1984; Hadley, *et al.*, 1985; Filadelfi & Castrucci, 1994). Este hormônio causa a dispersão dos grânulos de pigmento, promovendo alteração da cor do tegumento em vertebrados ectotérmicos (Bagnara & Matsumoto, 2006). Também na hipófise é secretado o MCH (Hormônio Concentrador de Melanina) que tem efeito oposto, ou seja, agrega os grânulos de melanina em peixes, aves e mamíferos, sendo que em anfíbios e répteis tem efeito contrário dispersando os pigmentos, porém, com efeito, relativamente curto em comparação ao MSH (Ide *et al.*, 1985).

Pode-se concluir que houve um aumento significativo da área contendo pigmentos nos testículos durante o período regenerativo, caracterizado pelo aumento das espermatogônias I e II, sendo que estas células são armazenadas até o próximo período reprodutivo nos lóculos seminíferos, permanecendo expostas por um longo tempo a ação do estresse oxidativo comum dos tecidos. Assim, a produção custosa de melanina torna-se viável para a manutenção da integridade das células germinativas. Porém, com o início do período pré-reprodutivo ocorre uma diminuição na produção de melanina culminando em menor área de pigmentação testicular observada no período reprodutivo, sendo este fato justificado pelo curto período que células como espermátides e espermatozoides permanecem nos lóculos seminíferos, cuja intensa produção de melanina ao longo de todo o ano tornar-se-ia biologicamente custosa, refletindo a pequena proporção encontrada nos tecidos durante o período reprodutivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização da captura de anfíbios (Licença número SISBIO 18573-1); às biólogas Estela Rodrigues Pinto e MSc. Verônica Thiemi Tsutae de Sousa pelo auxílio em coleta dos casais de *E. nattereri*; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), UNESP e UNIOESTE pelo suporte para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Agrawal SC, Bansal G. 1983.** Instance of melanosis in the gonads of male Indian Robin, *Saxicoloides fulicata* (Lin). *Poultry Science* **62**: 385–388.
- Anthony RG, Buss IO. 1974.** Relationship of gonadal recrudescence and testicular melanogenesis in California Quail. *Condor* **76**: 452–457.
- Bagnara JT, Hadley ME. 1973.** Chromatophores and color change, the comparative physiology of animal pigmentation. *The Quarterly Review of Biology* **49**: 159–160.
- Bagnara JT, Matsumoto J. 2006.** Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne JP, eds. *The Pigmentary System*. Blackwell Publishing, 1229.
- Bensch S, Irwin DE, Irwin JH, Kvist L, Akesson S. 2006.** Conflicting patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in *Phylloscopus warblers*. *Molecular Ecology* **15**: 161–171.
- Bianchi MLP, Antunes LMG. 1999.** Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição* **12**: 123–30.

- Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. 2006.** The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* **7**: 769–778.
- Brito FC, Kos L. 2008.** Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell Melanoma Research* **21**: 464–470.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JP. 1997.** Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **131**: 1–87.
- Castrucci AML, Haddley ME, Hrubby VJ. 1984.** Melanotropin Bioassays: In vitro and in vivo comparisons. *General and Comparative Endocrinology* **55**: 104–111.
- Christiansen JL, Grzybowski JM, Kodama RM. 1996.** Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, **9**: 185–190.
- Clayton P.A. 1982.** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 693–705
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. 2003.** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, **17**: 1195–1214.
- Cortopassi GA, Arnheim N. 1990.** Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Research* **18**: 6927–6933.
- Duellman WE, Trueb L. 1994.** *Biology of amphibians*. New York: McGraw-Hill.
- Erickson CA. 1998.** From the Crest to the Periphery: Control of Pigment Cell Migration and Lineage Segregation. *Pigment Cell Research* **6**: 336–347.
- Filadelfi AMC, Castrucci AMD. 1994.** Melatonin desensitizing effects on the in-vitro responses to MCH, Alpha-MSH, Isoproterenol and melatonin in pigment-cells of a fish (*S. marmoratus*), a toad (*B. ictericus*), a frog (*R. pipiens*), and a lizard (*A. carolinensis*), exposed to varying photoperiodic regimens. *Comparative biochemistry and Physiology A-Physiology*, **109**: 1027–1037.

- Franco-Belussi L, Zieri R, Santos LRS, Moresco RM, Oliveira C. 2009.** Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. *The Anatomical Record* **292**: 178–182.
- Franco-Belussi L, Oliveira C. 2011.** Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). *Zoology* **114**: 298–305.
- Franco-Belussi L, Santos LRS, Zieri R, Oliveira C. 2012.** Visceral Pigmentation in Three Species of the Genus *Scinax* (Anura: Hylidae): Distinct Morphological Pattern. *The Anatomical Record* **295**: 298–306.
- Galván I, Moller AP, Erritzoe J. 2011.** Testicular melanization has evolved in birds with high mtDNA mutation rates. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 988–998.
- Gilbert SF. 2010.** Developmental Biology. Massachusetts: Sinauer Associates.
- Godar DE, Thomas DP, Miller SA, Lee W. 1993.** Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage and hemolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **57**: 12018–11026.
- Grant T. 2004.** On the identities of *Colostethus inguinalis* (Cope, 1868) and *C. panamensis* (Dunn, 1933), with comments on *C. latinasus* (Cope, 1863) (Anura: Dendrobatidae). *American Museum Novitates* **3444**: 1–24.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliarod R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC. 2006.** Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **299**:1–261.
- Guillette Jr LJ, Weigel J, Flater G. 1983.** Unilateral testicular pigmentation in the Mexican lizard *Sceloporus variabilis*. *Copeia* **1983**: 155–161.

- Hadley ME, Mieyr JH, Martin BE, Castrucci AML. 1985.** [Nle4, D-Phe7]-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate chromatophores. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, **81**: 1–6.
- Halliwell B. 1994.** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* **52**: 253–265.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2007.** Free Radicals in Biology and Medicine. Nova York: Oxford University Press.
- Hearing VJ. 2009.** The expanding role and presence of neuromelanins in the human brain – why gray matter is gray. *Pigment Cell Melanoma Research* **22**: 10–11.
- Hore BB, Mehrotra PN, Hore A. 1994.** Testicular melanin pigments and the gonadal cycle in a tropical wild passerine bird, *Dicrurus adsimillus* (Passeriformes, Dicruridae). *Functional and developmental morphology* **4**: 21–24.
- Ide H, Kawazoe I, Kawauchi H. 1985.** Fish melanin-concentrating hormone disperses melanin in amphibian melanophores. *General and Comparative Endocrinology* **58**: 486–90.
- Johnson JC, Schwiesow T, Ekwall AK, Christiansen JL. 1999.** Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. *Pigment Cell Research* **12**: 376–382.
- Klaus SN. 2006.** A history of the science of pigmentation. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne JP, eds. *The Pigmentary System*. Blackwell Publishing.
- Lake PE. 1981.** Male genital organs. In: King AS, McLelland J, eds. *Form and Function in Birds*. London: Academic Press, 1–61.

- Laurell G, Ekborn A, Viberg A, Canlon B. 2007.** Effects of a single high dose of cisplatin on the melanocytes of the stria vascularis in the guinea pig. *Audiology & Neurotology* **12**: 170–178.
- Levin MD, Lu MM, Petrenko NB, Hawkins BJ, Gupta TH, Lang D, Buckley PT, Jochems J, Liu F, Spurney CF, Yuan LJ, Jacobson JT, Brown CB, Huang L, Beermann F, Margulies KB, Madesh M, Eberwine JH, Epstein JA, Patel VV. 2009.** Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers. *Journal of Clinical Investigation* **119**: 3420–3436.
- Liu Y, Hong L, Wakamatsu K, Ito S, Adhyaru BB, Cheng CY, Bowers CR, Simon JD. 2005.** Comparison of the structural and chemical properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium, iris and choroid of newborn and mature bovine eyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **81**: 510–516.
- Louiz I, Ben-Attia M, Ben-Hassine OK. 2009.** Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): evidence of reproduction disturbance. *Fisheries Research* **100**: 266–273.
- Luger TA, Brzoska T. 2007.** α -MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Annals of the Rheumatic Diseases* **66**: 52–55.
- Manera M, Serra R, Isani G, Capené E. 2000.** Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. *Journal of Fish Biology* **57**: 457–465.
- McCollum SA, Leimberger JD. 1997.** Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* **109**: 615–621.
- Meyer zum Gottesberge AM. 1988.** Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. *Pigment Cell Research* **1**: 238–249.
- Micale V, Perdichizzi F. 1990.** A quantitative and histochemical study on melano-

- macrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. *Journal of Fish Biology* **37**: 191–197.
- Moresco RM, Oliveira C. 2009.** A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. *South American Journal of Herpetology* **4**: 1–8.
- Murillo-Cuesta S, Contreras J, Zurita E, Cediell R, Cantero M, Varela-Nieto I, Montoliu L. 2010.** Melanin precursors prevent premature age-related and noise-induced hearing loss in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Research* **23**: 72–83.
- Oliveira C, Zieri R. 2005.** Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoologia* **22**: 454–460.
- Phillips DM. 1974.** Spermiogenesis. New York: Academic Press.
- Poole A, Lawton C. 2009.** The translocation and post release settlement of red squirrels *Sciurus vulgaris* to a previously uninhabited woodland. *Biodiversity and Conservation* **18**: 3205–3218.
- Provete DB, Franco-Belussi L, Santos LRS, Zieri R, Moresco RM, Martins IA, Almeida SC, Oliveira C. 2012.** Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. *Zoologica Scripta* **41**: 547–556
- Randhawa M, Huff T, Valencia JC, Younossi Z, Chandhoke V, Hearing VJ, Baranova A. 2009.** Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue. *FASEB Journal* **23**: 835–843.
- Rastogi RK, Bagnara JT, Iela L, Krasovich MA. 1988.** Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology* **197**:277–302.

- Ribeiro MG, Lima SR. 2000.** Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia. Belo Horizonte: Segrac Editora.
- Rodionov VI, Hope AJ, Svitkina TM, Borisy GG. 1998.** Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Current Biology* **8**: 165–168.
- Rogers SL, Gelfand VI. 1998.** Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Current Biology* **8**: 161–164.
- Scott JN, Fritz HI. 1979.** Nonpigmented tunica vaginalis testis in the opossum. *The Ohio Journal of Science* **79**: 79–80.
- Serventy DL, Marshall AJ. 1956.** Factors influencing testis coloration in birds. *Emu* **56**: 219–222.
- Sies H. 1986.** Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International* **25**: 1058–1071.
- Sies H.** Strategies of antioxidant defence. *European Journal of Biochemistry* **215**: 213–219, 1993.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. 2003.** The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research* **531**: 231–251.
- Solano F, Hearing VJ, García-Borrón JC. 2000.** Neurotoxicity due to o-quinones: neuromelanin formation and possible mechanisms for o-quinone detoxification. *Neurotoxicity Research* **1**: 153–169.
- Steel KP, Barkway C. 1989.** Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development* **107**: 453–463.
- Sugimoto M. 2002.** Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology. *Microscopy Research Technique* **58**: 496–503.

- Sugimoto M, Yuki M, Miyakoshi T, Maruko K. 2005.** The influence of long-term chromatic adaptation on pigment cells and striped pigment patterns in the skin of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Zoology* **303**: 430–440.
- Tu YG, Sun YZ, Tian YG, Xie MY, Chen J. 2009.** Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chemistry* **114**: 1345–1350.
- Wallace DC. 1992.** Diseases of the mitochondrial DNA. *The Annual Review of Biochemistry* **61**: 1175–1212.
- Wang SM, Chen JS, Fong TH, Hsu SY, Lim SS. 1997.** Characterization of novel filament system in goldfish xanthophores. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **36**: 216–227.
- Wildner, D.D., Grier, H., Quagio-Grassiotto, I. 2013.** Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. *Theriogenology* **79**: 709–724.
- Zadlo A, Rozanowska MB, Burke JM, Sarna TJ. 2006.** Photobleaching of retinal pigment epithelium melanosomes reduces their ability to inhibit iron-induced peroxidation of lipids. *Pigment Cell Research* **20**: 52–60.
- Zareba M, Szewczyk G, Sarna T, Hong L, Simon JD, Henry MM, Burke JM. 2006.** Effects of photodegradation on the physical and antioxidant properties of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **82**: 1024–1029.
- Zieri R, Taboga SR, Oliveira C. 2007.** Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): histological, stereological and ultrastructural aspects. *The Anatomical Record* **290**: 795–800.
- Zuasti A, Jiménez-Cervantes C, Garcia-Berrón JC, Ferrer C. 1998.** The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology* **61**: 305–316.

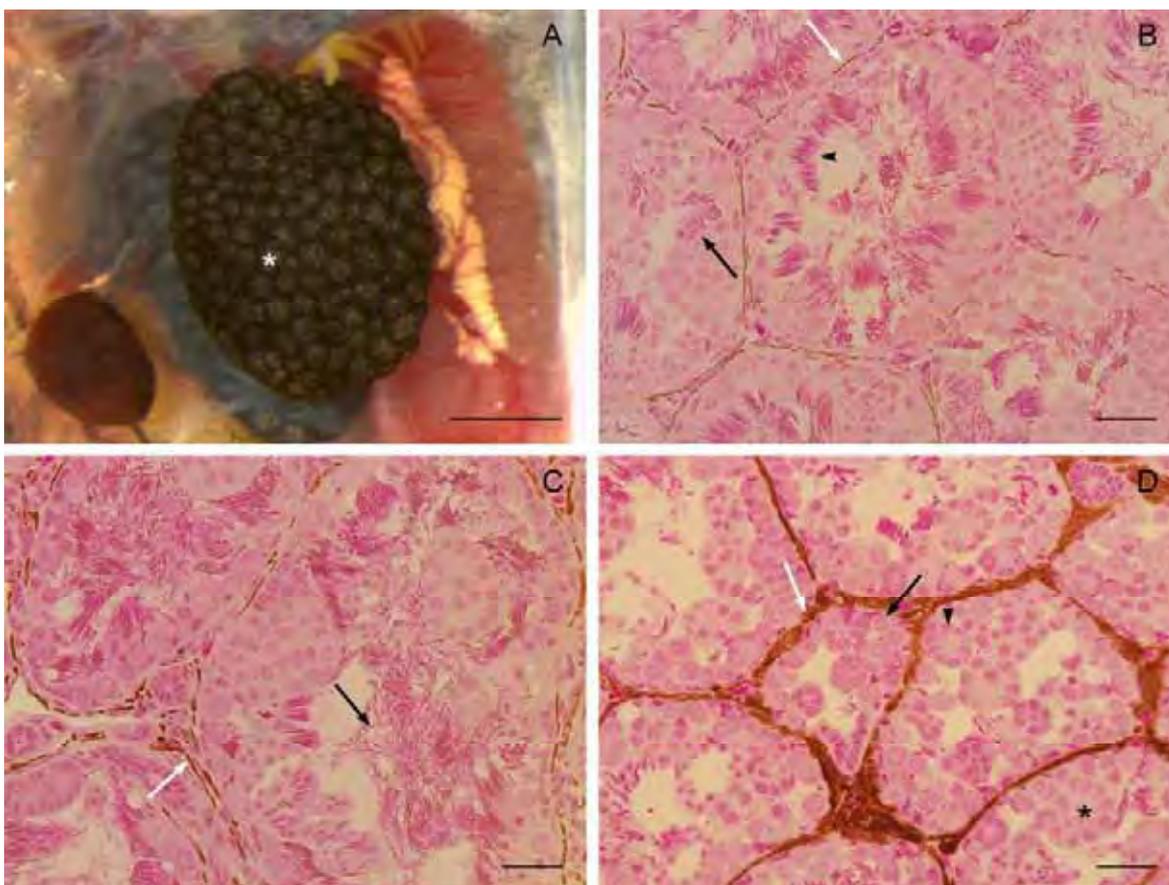


Figura 1: Secção histológica transversal de testículo de *P. cuvieri* evidenciando pigmentação (seta branca) ao longo do ciclo reprodutivo de *Physalaemus cuvieri*: (A) anatomia testicular, lóculos seminíferos escurecidos pela presença de melanócitos (*); (B) Período pré-reprodutivo, caracterizado pela grande quantidade de espermatíde I (seta preta) e espermatíde II (cabeça de seta) presentes no interior dos lóculos; (C) Período reprodutivo, caracterizado por intensa presença de espermatozóides no lúmen locular (seta preta); (D) Período regenerativo, caracterizado pelo alto número de espermatogônias I (seta preta) que evidenciam muitas divisões mitóticas além de espermatogônias II (cabeça de seta) e espermatócitos I indicando início da primeira divisão meiótica (*). Indivíduos de Mata Atlântica.

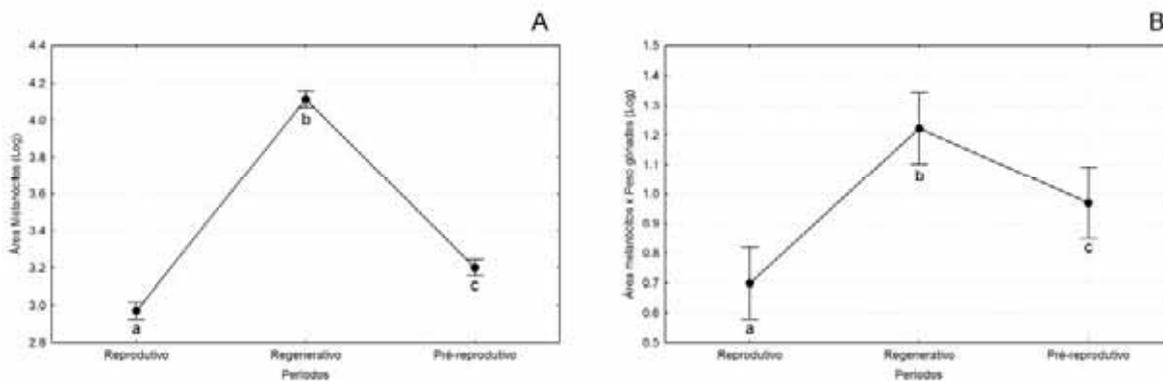


Figura 2: Teste de ANOVA: variação da pigmentação testicular ao longo do ciclo reprodutivo de *Physalaemus cuvieri*. (A) Logaritmo da Média da área ocupada por melanócitos testiculares em um total de $1239.58\mu\text{m}^2$ (com desvio padrão) (ANOVA: $F_{2,27}=762.77$ e $p < 0.05$; Tukey: $p < 0.05$; letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes). (B) Logaritmo do produto entre Média da área ocupada por melanócitos testiculares em um total de $94121.37\mu\text{m}^2$ e peso da gônada (com desvio padrão) (ANOVA: $F_{2,27}=19734$ e $p < 0.05$; Tukey: $p < 0.05$; letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes).

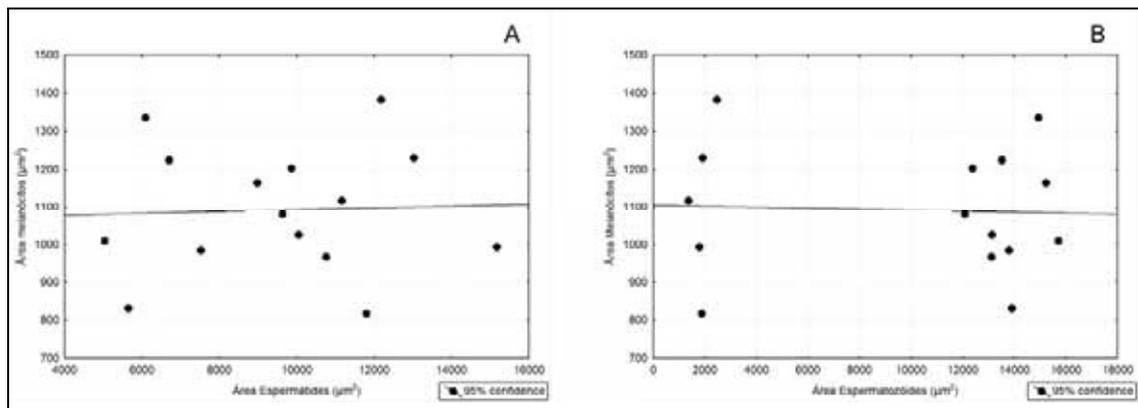


Figura 3: Correlação linear: variação da pigmentação testicular após a ejaculação de *Eupemphix nattereri*. (A) Ausência de correlação entre área ocupada por espermátides e área ocupada por melanócitos ($r=0.044$, $p > 0.05$). (B) Ausência de correlação entre área ocupada por espermátides e área ocupada por melanócitos ($r=-0.05$, $p > 0.05$).

Alta frequência incomum de hermafroditismo em anuros Neotropicais: um caso relatado na rã cachorro *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826

Rafaela M. Moresco^{1,2*}, Vladimir P. Margarido², Classius de Oliveira¹

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Departamento de Biologia. Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth. CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Phone: +55 17 3221 2387

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário. CEP 85819-110, Cascavel, Paraná, Brazil. Phone: +55 45 3220-3235

* Autor para correspondência:

Rafaela Maria Moresco

E-mail: rafaelabiologia@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido no periódico *Toxicology Letters*:

(<http://www.journals.elsevier.com/toxicology-letters/>)

Título: Unusual high frequency of hermaphroditism in Neotropical anurans: a reported case in the barker frog *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826

RESUMO

Representando um reflexo da atividade antrópica, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando nos últimos anos, trazendo severos prejuízos ao meio ambiente. O presente trabalho relata a ocorrência de malformação em gônadas de espécimes de *Physalaemus cuvieri* de uma população de Mata Atlântica no Sul do Brasil. Foram coletados 20 espécimes machos que tiveram seus testículos retirados, imersos em solução fixadora Karnovsky, incluídos em historesina para cortes de 2 μ m e coradas com Hematoxilina-eosina. Quatro espécimes apresentaram característica de gônada intersexual com a presença de espermatozóides e ovócitos. Através do marcador genético ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), a relação parental entre esses indivíduos foi testada comparando-se com espécimes provenientes de uma mesma desova. Para testar uma possível contaminação da água, foram coletados 2 litros no corpo d'água para verificação de compostos organoclorados, organofosforados e carbamatos. O marcador ISSR verificou padrão de bandas bastante distinto entre os espécimes hermafroditas, revelando não se tratarem de irmãos completos. Na análise de água foi constatada a presença do agrotóxico Dieldrin numa concentração de 0.05 μ g/L, representando um valor acima da referência recomendada. Este agrotóxico, além de atuar como desregulador endócrino, e apesar de sua comercialização proibida, possui efeitos residuais bastante persistentes, podendo ser o responsável pela alta frequência de *P. cuvieri* portando gônadas intersexuais, e em longo prazo um risco para esta população por ter sua capacidade efetiva para reprodução prejudicada.

Palavras chave: Agrotóxico, Anura, Desregulador Endócrino, Toxicologia, Intersexo

INTRODUÇÃO

Como reflexo da atividade antrópica relacionada com o desenvolvimento da indústria e agricultura em detrimento do ambiente, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando em grande escala nos últimos anos (Pacheco e Santos, 2002, Myers et al., 2003, Stehr et al., 2004 e Simonato et al., 2008). Estes compostos, representados por antibióticos, pesticidas e outros, são descritos como substâncias estranhas para um organismo, e uma vez que não possuem via metabólica para degradação, revelam-se estáveis sob condições aeróbias e anaeróbias, tornando-se persistentes no ambiente (Leisinger, 1983 e Semple et al., 2001). Estudos mostram que o estradiol presente em rios de grandes cidades, advindos de dejetos humanos, acarreta diminuição da fertilidade de peixes e/ou causando feminização (Colborn, 1993 e Sumpter, 2005). Tal fato tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam estes ecossistemas (Cajaraville et al., 2000).

Muitos dos compostos xenobióticos influenciam o funcionamento normal do sistema endócrino de animais, afetando a saúde, crescimento, reprodução e desenvolvimento dos mesmos, e são denominados desreguladores endócrinos (Bila e Dezotti, 2007). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) define essas substâncias como agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, responsáveis pela manutenção de diversas atividades (EPA, 1997). Inclui-se uma variedade de substâncias como desreguladores endócrinos, e dentre elas hormônios sintetizados por vertebrados (estrógenos, andrógenos e progesterona), fitoestrogênios, hormônios sintéticos, pesticidas e componentes de detergentes (Cargouët et al., 2007).

Os resíduos de fertilizantes e agrotóxicos representam os principais contaminantes de origem agrícola, sendo que através da água da chuva e da irrigação ou percolação no solo podem atingir os corpos d'água diretamente ou indiretamente, chegando aos lençóis freáticos (Arias et al., 2007). A contaminação indireta pode ocorrer ainda no solo através da volatilização dos compostos ou formação de poeira do solo contaminado, que são responsáveis pela contaminação de regiões distantes das áreas onde foram originalmente usados (Cooper, 1993). A poluição ambiental resultante do uso de pesticidas é muito difícil de ser avaliada, pois o resultado muitas vezes indica contaminação baixa e contínua, que nem sempre é captada pelos métodos de avaliação, que registram apenas o instante exato de coleta das mostras, sendo que estas poderiam estar diluídas se houve um aumento na precipitação local (Arias, 2007).

No Brasil só são realizados monitoramentos de corpos d'água através de análises bacteriológicas e das características físicas, químicas, que não contemplam xenobióticos. O uso de métodos adequados capazes de avaliar a presença de alguns pesticidas como organofosforados, organoclorados e carbamatos em água são realizados por técnicas custosas, que além de exigirem mão-de-obra especializada com os métodos de espectrofotometria de massa, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta performance, tornando inviável sua aplicação em larga escala devido o alto custo (Lacorte e Barcelo, 1995). Esta situação relacionada com o uso de pesticidas no Brasil é bastante preocupante, uma vez que representamos a quinta maior produção agrícola do mundo ocupando quase 10% do território nacional para o uso exclusivo da agricultura (ANA, 2013 e ICONE, 2013).

Espécies que utilizam o ambiente aquático podem ser utilizadas como um indicativo da qualidade no ambiente, pois estão constantemente expostas a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no mesmo, oriundas de diversas fontes de emissão

(Rashed, 2001). Desta forma, os anfíbios representam ótimos indicadores da qualidade ambiental uma vez que são altamente suscetíveis às alterações ambientais, em função principalmente da permeabilidade de sua pele e por ocuparem uma grande variedade de ambientes aquáticos e terrestres (Napoli e Caramaschi, 2000). As técnicas que utilizam bioindicadores para avaliação de impactos advindos de agrotóxicos podem ser divididas em duas linhas principais, sendo a primeira responsável pelo monitoramento de alterações em populações, comunidades e ecossistemas, e a segunda responsável pela avaliação de alterações individuais na taxa de crescimento, comportamento, malformações, reprodução e alterações bioquímicas e fisiológicas em nível celular (Rosenberg, 1993, Tavera-Mendoza et al, 2002, Carr et al., 2003 e Rohr e Palmer, 2005).

Anormalidades físicas têm sido descritas em anuros, mas as causas ainda não são totalmente claras (Ankley et al., 1998, Burkhart et al., 2000 e Taylor et al., 2005), sendo que a exposição a pesticidas pode ser um dos fatores (Cooke, 1981, Ouellet et al. 1997, Britson e Thelkeld, 1998, Hayes, 2002a, Taylor et al., 2005 e Krishnamurthy et al., 2008). Estas anormalidades podem refletir no desenvolvimento das gônadas, tanto em nível macroscópico quanto em nível histológico (Tavera-Mendoza et al., 2002, Hayes et al., 2003, Murphy et al., 2006., McCoy et al., 2008 e Spolyarich, 2011). Baseado nestes aspectos, o presente trabalho aborda a ocorrência de malformação em gônadas de espécimes de *Physalaemus cuvieri* de uma população de Mata Atlântica no Sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em estudo prévio para determinação do ciclo reprodutivo em uma população de *P. cuvieri* do Bioma de Mata Atlântica, foram coletados 20 indivíduos machos em um corpo d'água permanente, presente na borda de um pequeno fragmento localizado no interior de uma fazenda no município de Marmeleiro, PR (26°15'17.7" S; 53°04'15.0"O).

Destes, quatro apresentaram malformação nos testículos, na forma de feminização. Estes indivíduos expressavam comportamento reprodutivo de machos em campo, uma vez que foram capturados vocalizando. Todos os animais foram anestesiados e levados a óbito por saturação em Benzocaína e abertos por laparotomia, seguindo o Guia para o Cuidado e o Uso dos Animais de Laboratório – Unesp (Protocolo 001/06 – CEEA).

Para análise em microscopia de luz foram retirados os testículos e imediatamente imersos em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0.1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%), e encaminhados à rotina histológica (Ribeiro e Lima, 2000) para serem desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (*Leica-historesin embedding kit*). Foram feitas secções de 2µm (Micrótomo Leica RM2255) e coradas com Hematoxilina-eosina. Os cortes foram fotografados com objetiva de 20x e 40x utilizando microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado com câmera digital Olympus DP 71 em conjunto com o software DP Controller 3.2.1.276.

A presença de ovócitos nas gônadas poderia ser explicada (1) por todos os indivíduos serem irmãos completos, oriundos de uma mesma desova e apresentarem uma malformação hereditária, ou (2) pela água presente no local de coleta estar contaminada por algum agrotóxico com efeito desregulador endócrino. A verificação da hipótese de ocorrência natural de hermafroditismo decorrente de uma desova contendo malformação foi feita através de análise com marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) para determinar o grau de diferenciação genética entre os indivíduos de acordo com o padrão de bandas compartilhadas. Estes indivíduos foram comparados com irmãos completos de uma única desova coletada em campo e que ainda não haviam eclodido. Esta desova foi encaminhada ao laboratório e quatro animais foram mantidos em aquários com água, terra e aeração até passarem pelo processo de metamorfose. Fragmentos de fígado retirados de todos os espécimes foram armazenados em etanol 100% para posterior

extração de DNA, realizada com *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) seguindo instruções do fabricante.

Para a amplificação dos fragmentos ISSR, foi selecionado o *primer* (GGAC)₃C, que em estudos prévios para esta espécie apresentou alto grau de polimorfismo (Moresco et al., *in press*). As condições de amplificação do DNA via PCR foram as recomendadas por Fernandes-Matioli et al. (2000), com modificações. Amostras de 7µL da mistura de reação de PCR, após amplificação, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,4%.

Para testar a hipótese de possível contaminante da água, foram coletados 2 litros no corpo d'água e encaminhados para o Laboratório A3Q de Qualidade Ambiental (Cascavel-Paraná), onde a amostra foi analisada segunda metodologia recomendada pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) para verificação de compostos organoclorados, organofosforados e carbamatos.

RESULTADOS

Os testículos apresentaram as células do epitélio germinativo no interior de unidades denominadas lóculos seminíferos (Fig. 1A). Alguns lóculos apresentavam células germinativas masculinas e femininas enquanto outros apresentavam apenas células femininas, sendo que a maioria dos lóculos apresentava no seu interior apenas células masculinas, constituindo o padrão anatômico típico do sexo masculino (Fig. 1B, C, D). A característica de testículo intersexual foi observada tanto no testículo direito quanto no esquerdo.

Foram registrados todos os morfotipos celulares característicos dos testículos, sendo possível observar inclusive a presença de espermatozoides, além de ductulos eferentes intratesticulares, indicando a provável funcionalidade do órgão como uma

gônada masculina. Por outro lado, ovócitos possuíam intensa acidofilia no citoplasma, mas não apresentavam sinais de vitelogênese uma vez que não foram observadas inclusões vitelínicas na região periférica do citoplasma, sendo evidenciado apenas um grande número de nucléolos no núcleo.

Quando analisados através do marcador ISSR os animais originados de uma mesma desova apresentavam uma similaridade genética maior entre eles do que os animais coletados adultos que possuíam ovócitos. Esta similaridade é comprovada pelo fato que os indivíduos da mesma desova compartilharam um padrão quase similar de bandas em relação aos indivíduos que possuíam ovócitos, que apresentaram padrão de bandas distinto entre eles, indicando que não eram irmãos completos (Fig. 2).

A análise físico-química da água determinou a presença do agrotóxico organoclorado Dieldrin, em concentração de 0,05 µg/L, sendo o valor de referência máximo aceitável de 0,03 µg/L (Tab. 1).

DISCUSSÃO

O hermafroditismo é um evento muito raro em vertebrados, já que estes apresentam sistema sexual bastante definido e pouco plástico na maioria dos grupos (Gilbert, 2010). No presente trabalho foi constatada a presença de ovócitos em testículos de *P. cuvieri*. A porcentagem de animais que apresentaram esta malformação foi alta (20%), o que nos leva a acreditar que estes animais receberam algum estímulo externo para que tal evento ocorresse. Além disso, na análise utilizando marcador ISSR foi verificado que muito provavelmente os animais que apresentavam esta malformação não tiveram sua origem a partir da mesma desova, pois a variabilidade entre eles era maior que entre irmãos completos, de acordo com o número de bandas compartilhadas dentro desses dois grupos. É esperado encontrar um índice de 0 a 2% de ocorrência natural de alguma anormalidade

no desenvolvimento de anfíbios presentes em áreas não perturbadas por uso de agrotóxicos (Ouellet et al., 1997, Read, 1997, Meteyer et al., 2000 e Eaton et al., 2004). Por outro lado, conforme relatado por Spolyarich (2011), populações de anfíbios que vivem em áreas agrícolas ou proximidades apresentam um índice de malformações mais elevado, variando de 4 a 8%.

Em estudos com *Lithobates pipiens* (citada como *Rana pipiens*) foi verificada a ocorrência de deformidades gonadais como resultado da exposição ao agrotóxico Atrazina, muito utilizado nos Estados Unidos, tendo o retardo no desenvolvimento das gônadas e feminização ocorridos de 10 a 92% (Hayes et al., 2002a, 2002b). Já em estudo realizado por Spolyarich et al. (2011) com três espécies de anfíbios, *Limnodynastes tasmaniensis*, *Limnodynastes fletcheri* e *Litoria raniformis*, presentes em áreas cultivadas de arroz, foi relatado apenas dois casos de intersexo em gônadas masculinas representando 1.4% dos indivíduos coletados, e os autores concluíram pouco apoio para as hipóteses de feminização masculina em ambientes agrícolas. Smith et al. (2005) relataram um índice de intersexo similar (2%) em populações de *Xenopus laevis* coletadas em áreas de cultivo de milho contaminadas com Atrazina, concluindo em seu trabalho que este agrotóxico não aumentou o índice de malformação de gônadas de anfíbios.

O agrotóxico Dieldrin é classificado como um poluente orgânico persistente (POP), sendo um organoclorado. Nas últimas décadas, numerosos POPs foram produzidos e utilizados amplamente em todo o mundo. São caracterizados como substâncias químicas muito resistentes à degradação por processos bioquímicos, sendo extremamente estáveis e de longa vida (ATSDR, 2002). Além de serem persistentes, também são tóxicos e bioacumulativos nos tecidos de animais. O Dieldrin apresenta degradação lenta na água com tendência a se acumular no sedimento. É altamente lipossolúvel e persistente, possuindo uma grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação (Aldeida et al.,

2007). Baseado nestas características, a Convenção de Estocolmo, realizada em 2001, foi o primeiro tratado global que buscou a eliminação de 12 substâncias tóxicas persistentes, entre elas o Dieldrin, por estarem associados à incidência de câncer e a disfunções dos sistemas reprodutor, endócrino e imunológico (Aldeida et al., 2007).

Estudos sugerem que o Dieldrin poderia atuar como desregulador endócrino impedindo a ligação do 5 α -diidrotestosterona e 17 β -estradiol com os receptores androgênicos e estrogênicos, respectivamente. Além disso, foi relatado que o Dieldrin altera a produção de testosterona e a ultra-estrutura das células de *Leydig* de ratos, podendo refletir na fertilidade dos animais (Ronco, 1998). Segundo Guillette e Gunderson (2001), os desreguladores endócrinos podem atuar como agonistas ou antagonistas de receptores hormonais, além de alterarem a produção de hormônios na sua fonte e interferirem na liberação de hormônios estimuladores ou inibidores do hipotálamo ou hipófise. Além disso, através de reação enzimática, eles podem biotransformar hormônios e alterar a concentração ou o funcionamento das proteínas ligantes plasmáticas, e desta forma alterariam as concentrações séricas dos hormônios livres.

Em nosso estudo foi constatado que a presença de Dieldrin, mesmo em concentração baixa ($0.05\mu\text{m/L}$), porém acima do nível máximo aceitável. Concentrações baixas de xenobióticos trazem conseqüências em níveis celulares que, quando projetadas em longo prazo, podem prejudicar fortemente uma população ou ecossistema (Rosenberg, 1993). Além disso, como os corpos d'água podem diminuir o nível de água ao longo do ano em decorrência de meses mais secos, as concentrações do pesticida poderiam ser maior em outros meses. Em nosso estudo a coleta de água foi realizada duas semanas após intensa precipitação, o que poderia justificar a concentração relativamente baixa do agrotóxico.

Uma vez que muito dos efeitos esperados são internos e podem passar despercebidos pelos pesquisadores, ao contrário de mortalidade e malformações externas, populações poderiam diminuir e até extinguir sem qualquer reconhecimento dos verdadeiros motivos (Wake, 1991, Beebee e Griffiths, 2005, Du Preez, 2005 e Mann et al., 2009). Níveis extremamente baixos de exposição podem causar anomalias endócrinas ou reprodutivas, principalmente quando a exposição ocorrer durante um período crítico do desenvolvimento e, muitas vezes, doses baixas podem exercer maior efeito sobre uma população do que doses mais elevadas, uma vez que a exposição intensa leva o animal a morte na maioria das vezes (Gilbert, 2010). De acordo com Hayes et al. (2002a), os efeitos de feminização ou desordem celular sobre as gônadas masculinas de espécimes de *Xenopus laevis* expostos à Atrazina foi atingido com níveis de 0.1 ppb, 30,000,000 vezes menor do que a dose necessária para produzir efeitos reprodutivos em ratos (Wetzel, 1994).

Poucos estudos relatam os efeitos de baixas concentrações de agrotóxicos em campo sobre a fauna local, sobretudo com anfíbios (Reeder et al., 1998 e Hayes et al., 2002a, 2002c). Desta forma, muitas vezes baixos níveis de agrotóxicos causam danos graves relacionados com o desenvolvimento e crescimento animal, de forma que o nível máximo aceitável deveria ser menor e os efeitos destes componentes na fauna acabam sendo subestimados (Hayes et al., 2002b, 2006). Além disso, níveis baixos de componentes combinados também poderiam ter um grave efeito sobre o desenvolvimento de anfíbios. Conforme visto em estudo desenvolvido por Hayers et al. (2006) com larvas de *Lithobates pipiens* (citada como *Rana pipiens*) expostas a Atrazina individualmente, ou combinada com outros nove agrotóxicos, houve um atraso de crescimento e desenvolvimento das larvas, sendo que as anomalias mais severas foram observadas através da combinação de Atrazina com outros pesticidas (por exemplo, S-metacloro).

Quando tratamos de determinar os efeitos de algum agrotóxico sobre populações de anfíbios é importante termos uma clara compreensão sobre as variações populacionais, pois devemos considerar que muitas espécies de anfíbios terminam a maturação sexual após a fase larval. Desta forma, muitos estudos demonstram que um dos efeitos mais bem documentados de desmasculinização e feminilização de larvas do sexo masculino expostas ao agrotóxico Atrazina pode variar entre populações. Na maioria das vezes, os efeitos da Atrazina sobre as gônadas não foram detectados porque os indivíduos podem não ter completado a diferenciação sexual das gônadas antes da metamorfose (Hayes, 2006). A variação na susceptibilidade pode explicar alguns dos resultados na literatura que relatam normalidade gonadal de indivíduos expostos ao agrotóxico (Coady et al., 2004, Hecker et al., 2004, Coady et al., 2005, Du Preez et al., 2005, Hayes, 2005, Hecker et al., 2005, Jooste et al., 2005a, 2005b).

Desta maneira, o presente trabalho mostrou que embora um agrotóxico possa ter sua comercialização proibida, devemos manter a atenção para os possíveis efeitos residuais, que no caso do Dieldrin são bastante persistentes e podem ter sido determinantes para o surgimento de gônadas intersexuais em 20% dos indivíduos de *P. cuvieri* coletados no fragmento de Mata Atlântica. Embora apresentassem comportamentos reprodutivos característicos de macho como a vocalização, poderiam representar, em longo prazo, um risco para esta população, uma vez que possivelmente a quantidade de espermatozoides produzidos seja reduzida e sua capacidade efetiva para reprodução prejudicada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização da captura de anfíbios (Licença número SISBIO 18573-1); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), UNESP e UNIOESTE pelo suporte para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Almeida, F.V., Centeno, A.J., Bisinoti, M.C., Jardim, W.F., 2007. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Quim. Nova* 30, 1976 - 1985.
- ANA., 2013. Agência Nacional de Águas: Portal da qualidade das Águas. Acesso: <http://pnqa.ana.gov.br/default.aspx>.
- ATSDR., 2002. Agency for Toxy Substances and Disease Registry. Acesso: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>
- Ankley, G.T., Tietge, J.E., DeFoe, D.L., Jensen, K.M., Holcombe, G.W., 1998. Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2530 - 2542.
- Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciênc. Saúd. Col.* 12, 61 - 72.
- Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A., 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology. *Biol. Conserv.* 125, 271 - 285.
- Bila, D.M., Dezzotti, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quím. Nova* 30, 651-666.
- Britson, C.A., Thelkeld, S.T., 1998. Abundance, metamorphosis, development and behavioural abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three

- agricultural and Methyl Mercury in outdoor mesocosms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 154 - 161.
- Burkhart, J.G., Ankley, G., Bell, H., Carpenter, H., Fort, D., Gardiner, D., Hale, R., Helgen, J.C., Jepson, P., Johnson, D., Lannoo, M., Lee, D., Lary, J., Levey, R., Magner, J., Meteyer, C., Shelby, M.D., Lucier, G., 2000. Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. *Environ. Health Perspect.* 108, 83 - 90.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, J.M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295 - 311.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Levi, Y., 2007. Evaluation of the estrogenic potential of river and treated water in the Paris area (France) using in vivo and in vitro assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 149 - 156.
- Carr, J., Gentles, A., Smith, E., Goleman, W., Urquidi, L., Thuett, K., Kendall, R.J., Giesy, J.P., Gross, T.S., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G. 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 396 - 405
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378 - 384.
- Coady, K., Murphy, M., Villeneuve, D., Hecker, M., Jones, P., Carr, J., Solomon, K., Smith, E., Van Der Kraak, G., Kendall, R., Giesy, J., 2004. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, and gonadal development in the green frog (*Rana clamitans*). *J. Toxicol. Environ. Health* 67, 941 - 957.
- Coady, K.K., Murphy, J., Villeneuve, D.L., Hecker, M.J., Carr, J., Solomon, K., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy, J.P., 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and

- plasma sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 62: 160 - 173.
- Cooke, A.S., 1981. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environ. Pollut.* 25, 123 - 133.
- Cooper, C.M., 1993. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems – a review. *J. Environ. Qual.*; 22: 402 - 408.
- Du Preez, L.H., Solomon, K.R., Carr, J.A., Giesy, J.P., Gross, T.S., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Weldon, C., 2005. Population structure of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in maize-growing areas with atrazine application versus non-maize growing areas in South Africa. *Afr. J. Herpet.* 54, 61 - 68.
- Eaton, B.R., Eaves, S., Stevens, C., Puchniak, A., Paszkowski, C.A. 2004. Deformity levels in wild populations of the wood frog (*Rana sylvatica*) in three ecoregions of Western Canada. *J. Herpet.* 38, 283 - 287.
- EPA., 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington.
- Fernandes-Matioli, F.M.C., Matioli, S.R., Almeida-Toledo, L.F., 2000. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genet. Mol. Biol.* 23, 803 - 807.
- Gilbert, S.F. 2010. *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Guillette Jr, L.J., Gunderson, M.P. 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* 122, 857 - 864.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. 2002a. Feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419, 895 - 896.

- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk A., 2002b. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5476 - 5480.
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2002c. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111, 568 - 575.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111, 568 - 575.
- Hayes, T.B., 2005. Welcome to the revolution: integrative biology and assessing the impact of endocrine disruptors on environmental and public health. *J. Integr. Comp. Biol.* 45, 321 - 329.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M. 2006. Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact? *Environ. Health Perspect.* 114, 40 - 50.
- ICONE. 2013. Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais. Aceso: <http://www.iconebrasil.org.br/pt/>.
- Jooste, A., Du Preez, L., Carr, J., Giesy, J.P., Gross, T., Kendall, R., Smith, E.E., Van der Kraak, G.L., Solomon, K.R., 2005a. Response to comment on “Gonadal development of larval male *Xenopus laevis* exposed to atrazine in outdoor microcosms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7759 - 7760.
- Jooste, A.M., Du Preez, L.H., Carr, J., Giesy, J.P., Gross, C., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van der Kraak, G.L., Solomon, K.R. 2005b. Gonadal development of larval male

- Xenopus laevis* exposed to atrazine in outdoor microcosms. Environ. Sci. Technol. 39, 5255 - 5261.
- Krishnamurthy, S.V., Meenakumari, D., Gurushankara, H.P., Vasudev, V., 2008. Nitrate induced morphological anomalies in the tadpoles of *Nyctibatrachus major* and *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae). Turk. J. Zool. 32, 239 - 244.
- Lacorte, S., Barcelo, D., 1995. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river water by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography- mass spectrometry. J. Chromatogr. 712, 103 - 112.
- Leisinger, T., 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. Experientia 39: 1183-1191.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. Environ. Pollut. 157, 2903 – 2927.
- McCoy, K.A., Bortnick, L.J., Campbell, C.M., Hamlin, H.J., Guillette, L.J., StMary, C. M., 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. Environ. Health Perspect. 116, 1526 - 1532.
- Meteyer, C.U., Loeffler, I.K., Fallon, J.F., Converse, K.A., Green, E., Helgen, J.C., Kersten S, Levey, R., Eaton-Poole, L., Burkhart, J.G., 2000. Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. Teratology 62, 151 - 171.
- Moresco, R.M., Maniglia, T.C., Oliveira, C., Margarido, V.P. The pioneering use of ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) in Neotropical anurans: preliminary assessment of genetic diversity in populations of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Leiuperidae). Biol. Res., *in press*.

- Myers, M.S., Johnson, L.L., Collier, T.K., 2003. Establishing the causal relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and hepatic neoplasms and neoplasia-related liver lesions in English sole (*Pleuronectes vetulus*). Hum. Ecol. Risk Assess. 9, 67 - 94.
- Murphy, M.B., Hecker, M., Coady, K.K., Tompsett, A.R., Jones, P.D., Du Preez, L.H., Everson, G.J., Solomon, K.R., Carr, J.A., Smith, E.E., Kendall, R.J., Van Der Kraak, G., Giesy, J.P., 2006. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. Aquat. Toxicol. 76, 230 - 245.
- Napoli, M.F., Caramaschi, U., 2000. Description and variation of a new Brazilian species of the *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). Alytes 17, 165 - 184.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Lair, S., 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. J. Wildl. Dis. 33, 95 - 104.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 53, 331 - 347.
- Rashed, M.N., 2001. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. Environ. Int. 27, 27 - 33.
- Read, J., 1997. Comparative abnormality rates of the trilling frog at olympic dam. Herpetofauna 27, 23 - 27.
- Reeder, A., Foley, G., Nichols, D., Hansen, L., Wikoff, B., Faeh, S., Eisold, J., Wheeler, M.B., Warner, R., Murphy, J.E., Beasley, V.R., 1998. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexuality in cricket frogs (*Acris crepitans*) Environ. Health Perspect. 106, 261 - 266.

- Ribeiro, M.G., Lima, S.R., 2000. Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia, Segrac Editora, Belo Horizonte.
- Rohr, J., Palmer, B., 2005. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1253 - 1258.
- Ronco, A.M., Marcus, D., Villena, F., Suwalsky, M., 1998. In vitro effect of dieldrin on Leydig cell morphology and steroidogenic function. *In Vitro Mol. Toxicol.* 11, 299 - 307.
- Rosenberg, D.M., Resh, V.H., 1993. *Freshwater Biomonitoring and benthic macroinvertebrates*, Chapman & Hall, New York.
- Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollut.* 112, 269 - 283.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112 - 120.
- Spolyarich, N., Hyne, R.V., Wilson, S.P., Palmer, C.G., Byrne, M., 2011. Morphological abnormalities in frogs from a rice-growing region in NSW, Australia, with investigations into pesticide exposure. *Environ. Monit. Assess.* 173, 397 - 407.
- Smith, E.E., Du Preez, L.H., Gentles, A., Solomon, K.R., Tandler, B., Carr, J.A., et al. (2005). Assessment of laryngeal muscle and testicular cell types in *Xenopus laevis* (Anura Pipidae) inhabiting maize and nonmaize growing areas of South Africa. *Afr. J. Herpetol.* 54, 69 - 76.

- Stehr, C.M., Myers, M.S., Johnson, L.L., Spencer, S., Stein, J.E., 2004. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. *Mar. Environ. Res.* 57, 55 - 74.
- Sumpter, J.P. 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: na overview. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33, 9 - 16.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 527 - 531.
- Taylor, B., Skelly, D., Demarchis, L.K., Slade, M.D., Galusha, D., Rabinowitz, P.M., 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environ. Health Perspect.* 113, 1497 - 1501.
- Wake, D.B., 1991. Declining Amphibian Populations. *Science* 253, 860.
- Wetzel, L.T., Luempert, L.G. 3rd, Breckenridge, C.B., Tisdell, M.O., Stevens, J.T., Thakur, A.K., Extrom, P.J., Eldridge, J.C., 1994. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 43, 169 - 82.

Tabela 1: Resultado do Relatório de Ensaio Físico-Químico para análise de água coletada em corpo permanente no Município de Marmeleiro, PR.

Agrotóxico	Resultado	Referência*
Aldrin	< 0,03 µg/L	0,03 µg/L
Dieldrin	0,05 µg/L	0,03 µg/L
Clordano	< 0,05 µg/L	0,2 µg/L
DDT	< 0,05 µg/L	1 µg/L
Endossulfan	< 0,05 µg/L	20 µg/L
Endrin	< 0,03 µg/L	0,6 µg/L
Heptacloro+Heptacloro epóxido	< 0,03 µg/L	Sem valor de referência
Hexaclorobenzeno	< 0,05 µg/L	Sem valor de referência
Lindano	< 0,05 µg/L	2 µg/L
Metoxicloro	< 0,05 µg/L	Sem valor de referência
Pentaclorofenol	< 0,05 µg/L	9 µg/L
Malation	< 0,05 µg/L	Sem valor de referência
Paration	< 0,05 µg/L	9 µg/L
Molinato	< 0,05 µg/L	10 µg/L

* Valores de referência conforme Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011.

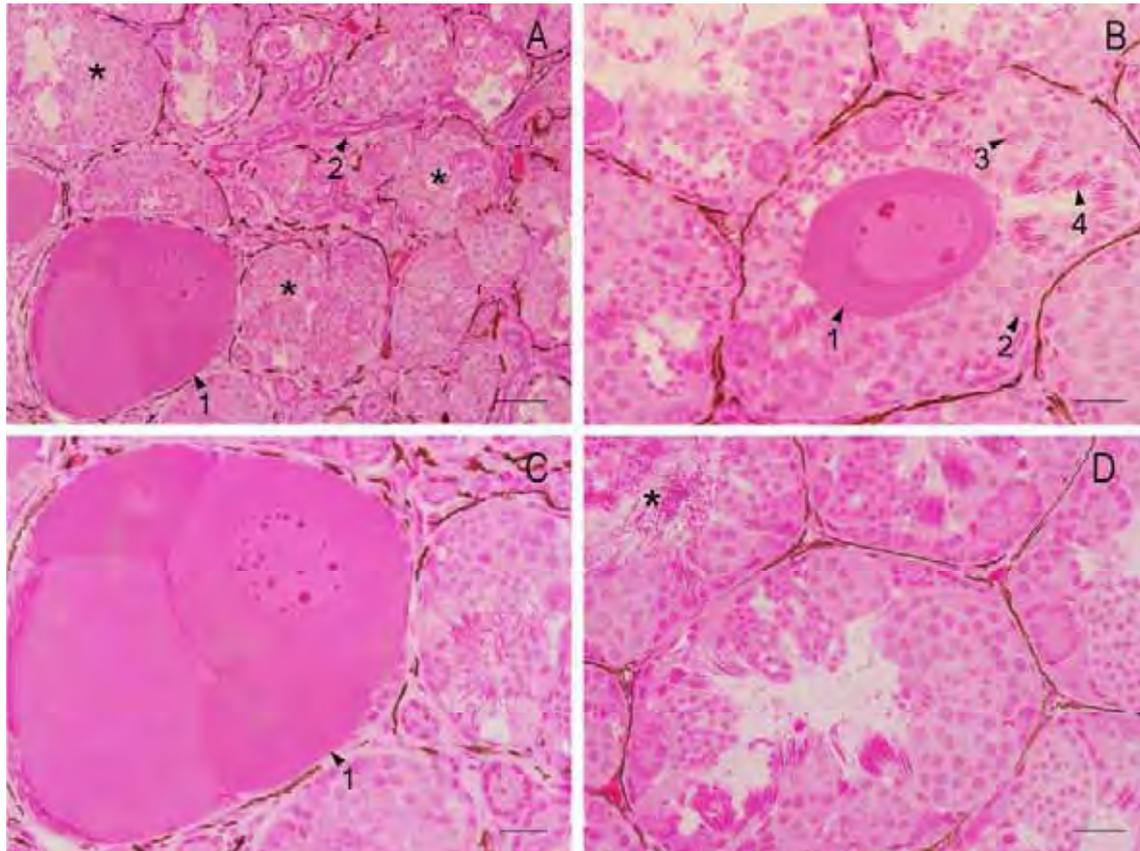


Figura 1: Secções histológicas transversais de testículos de *P. cuvieri* evidenciando epitélio seminífero e ovócitos (testículo intersexual). (A) Células germinativas masculinas e femininas no mesmo corte, com (*) lóculos seminíferos contendo vários morfotipos de células do epitélio germinativo masculino, (1) lóculo seminífero contendo ovócitos, e (2) corte longitudinal de um ducto eferente intra-testicular; (B) Lóculo seminífero contendo simultaneamente células germinativas masculinas e femininas: (1) Ovócito, (2) Espermatogônia I, (3) Espermatócito I, (4) Espermátide; (C) Lóculo seminífero contendo apenas células femininas: (1) Ovócitos; (D) Lóculos seminíferos com epitélio típico do sexo masculino e destaque para intensa presença de (*) espermatozóides no lúmen. Coloração H/E. Barra (A) = 60 μ m, Barra (B, C, D) = 30 μ m.

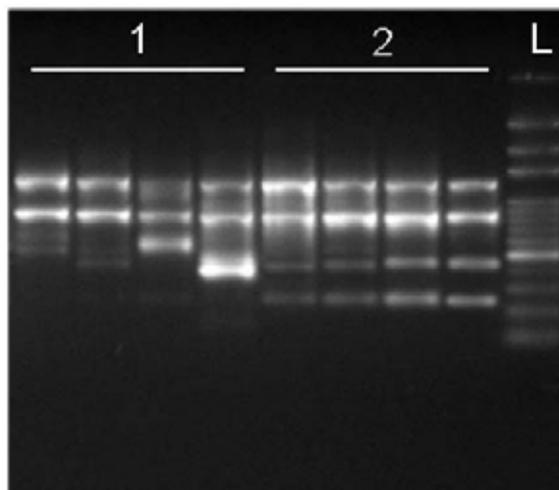


Figura 2: Análise através do marcador ISSR para dois grupos de *P. cuvieri* (1) animais que apresentavam ovócitos nos testículos e (2) animais de uma mesma desova. Perfis eletroforéticos em gel de agarose amplificados com o *primer* (GGAC)₃C.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com relação ao ciclo reprodutivo de *P. cuvieri* podemos concluir que os animais não entram em estado de estivação durante o inverno, porém diminuem bastante suas atividades neste período regenerativo em que as gônadas diminuem a produção de espermatozóides. Este processo é re-estabelecido quando ocorre um aumento na temperatura e principalmente na precipitação, que foi o fator ambiental determinante para o re-início do período reprodutivo, conforme nos indicou a CCA.

- Embora o ciclo reprodutivo tenham sido caracterizado como potencialmente contínuo nos dois biomas estudados, a diversidade genética particular de cada população determina a sobrevivência e reprodução desta espécie em ambientes tão heterogêneos. Como indicado através do marcador ISSR em que o nível de diferenciação genética interpopulacional é alto entre a população de Marmeleiro-PR e as demais populações de SP ($F_{ST} > 0,2876$), sugere-se que a população de Mata Atlântica apresenta uma composição genética bastante diferenciada das demais.

- Com relação aos melanócitos existentes nos testículos de *P. cuvieri*, houve um aumento significativo desta pigmentação durante o período regenerativo, caracterizado pelo aumento das espermatogônias. Este aumento poderia estar relacionado com a proteção das células germinativas contra ação do estresse oxidativo, uma vez que estas células permanecem por alguns meses no interior dos lóculos seminíferos até o próximo período reprodutivo re-começar. Assim, a produção custosa de melanina torna-se viável apenas para a manutenção da integridade das células germinativas durante o período regenerativo, porém durante o período reprodutivo, em que as células germinativas permanecem pouco tempo nos lóculos, a produção de melanina não parece ser energeticamente favorável, e desta maneira diminui a pigmentação em relação ao período regenerativo.

- Na população da Mata Atlântica foram verificados indivíduos com a presença de ovócitos no interior dos testículos, representando 20% dos indivíduos de *P. cuvieri* coletados. Foi constatada a presença do agrotóxico organoclorado Dieldrin contaminando o corpo d'água onde os animais foram coletados. Embora estes animais apresentassem comportamentos reprodutivos característicos de macho, como vocalização, possivelmente poderiam representar, em longo prazo, um risco para a manutenção e sobrevivência desta população.