



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - UFCG
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE - CES
UNIDADE ACADÊMICA DE BIOLOGIA E QUÍMICA - UABQ
CURSO DE LICENCIATURA EM BIOLOGIA

ALEXANDRE PEREIRA DANTAS

ESPERMATOGÊNESE DE *Pithecopus nordestinus* CARAMASCHI, 2006
(ANURA, PHYLLOMEDUSIDAE) EM UM REMANESCENTE DE MATA
ATLÂNTICA, PERNAMBUCO, NORDESTE DO BRASIL

CUITÉ – PB

2018

ALEXANDRE PEREIRA DANTAS

**ESPERMATOGÊNESE DE *Pithecopus nordestinus* CARAMASCHI, 2006
(ANURA, PHYLLOMEDUSIDAE) EM UM REMANESCENTE DE MATA
ATLÂNTICA, PERNAMBUCO, NORDESTE DO BRASIL**

Monografia apresentada à Banca Examinadora, como exigência parcial à conclusão do Curso de Licenciatura em Biologia, da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial à obtenção de título de licenciado.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Frazão Chaves
Co orientador: Prof. Dr. Geraldo Jorge Barbosa de Moura - UFRPE

CUITÉ – PB

2018

D192m Dantas, Alexandre Pereira.
Espermatogênese de *Pithecopus nordestinus caramaschi*, 2006
(Anura, phyllomedusidae) em um remanescente de mata atlântica,
Pernambuco, Nordeste do Brasil / Alexandre Pereira Dantas. – Cuité,
2018.
40 f. : il. color.

Monografia (Licenciatura em Biologia) – Universidade Federal de
Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2018.
"Orientação: Prof. Dr. Marcio Frazão Chaves, Prof. Dr. Geraldo
Jorge Barbosa de Moura".
Referências.

1. Genética. 2. Espermatogênese. 3. Anuros. 4. Ciclos Reprodutivos.
I. Chaves, Marcio Frazão. II. Moura, Geraldo Jorge Barbosa de III.
Título.

CDU 575(043)

ALEXANDRE PEREIRA DANTAS

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTICULOS DE *Pithecopus nordestinus* CARAMASCHI, 2006 (ANURA, PHYLLOMEDUSIDAE) EM UM REMANESCENTE DE MATA ATLÂNTICA, NORDESTE DO BRASIL

Monografia apresentada à Banca Examinadora, como exigência parcial à conclusão do Curso de Licenciatura em Biologia, da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial à obtenção de título de licenciado.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador

Profº Drº Marcio Frazão Chaves

Profº Drº Gláucia Veríssimo Faheina Martins – UFCG/CES



Examinador externo

Profº Mscº Stephenson Hallison Formiga Abrantes – UFCG/CSTR

CUITÉ - PB

2018

“Dedico este trabalho as pessoas que sempre esteve ao meu lado em momento difíceis e que me apoiaram sempre, em especial aos meus pais, irmãos e namorada”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus pais Toinho e Socorro por me estimular e me sustentar por todos esses anos, aos meus irmãos Alex e Athilson.

A minha namorada Anailde por me aguentar nos dias de estresse e entender as minhas ausências pros campos e dias no laboratório.

Aos meus amigos do Biologia Off: Gleison Soares, Fábio Barros, Franklin Antony, Maxsuel Silva, Matheus Yuri, Renan Dutra pelos anos de companheirismo e muita resenha.

Ao meu orientador Prof^o Márcio Frazão por todos os ensinamentos, cooperação e oportunidades.

Ao meu Co orientador Prof^o Geraldo Jorge Moura - UFPRE pela oportunidade de estágio no LEHP onde fiz grandes amizades e pude crescer profissionalmente.

Aos meus amigos da UFRPE/LEHP Ubiratã Souza, Rogerio, Alcina, Ricardo Nagô, Felipe e Ítalo (LePlanc) e em especial ao meu grande amigo Alan Pedro por me acolher em todas as idas a Recife e por se esforçar e proporcionar que este trabalho tenha sido realizado.

Ao meu amigo Lucas Libélula por me hospedar em sua casa, e pelos puxões de orelha.

A banca examinadora Stephenson Abrantes e Glaucia Martins pela disponibilidade e por todas as contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos meus amigos da Física pelas hospedagens em Recife nos dias que mais precisei.

"Alcançar o que se deseja dá trabalho, mas não pare de lutar porque está cansado; pare apenas quando tiver triunfado!"

(Autor desconhecido)

RESUMO

O controle dos ciclos reprodutivos requer que os organismos sejam capazes de detectar as mudanças no ambiente e ajustar os parâmetros fisiológicos de acordo com as condições necessárias. Sendo mediado pela interação entre os ritmos endógenos do animal e a influência de fatores ambientais, sendo assim, em áreas abertas às condições físicas do ambiente como a temperatura e a precipitação são os principais fatores influenciadores dos padrões reprodutivos dos anuros. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os aspectos histológicos e morfométricos dos testículos de *Pithecopus nordestinus* (CARAMASHI, 2006) bem como avaliar a influência da precipitação e temperatura nos parâmetros testados. As coletas foram realizadas na Estação Ecológica do Tapacurá - EET, é um remanescente de mata atlântica semidecidual estacional. Foram coletados 23 machos de *Pithecopus nordestinus* distribuídos entre os meses de Fevereiro a Novembro de 2018. Os valores mensais mostram que só houve relações significativas entre a pluviometria e a densidade de espermatídies primário (Esp I) ($r=0.04$; $p=0,02$), enquanto as Espermatídies secundário (Esp II) e Espermatozoides (Z) não apresentaram nenhuma relação significativa. Já a variação mensal da temperatura da EET não apresentou relações significativas com a densidade de espermatídies primário (Esp I), espermatídies secundário (Esp II) e espermatozoides (Z). Os resultados deste trabalho corroboram com o de CHAVES et al (2016), no qual ressalta que a espermatogênese em anuros de forma geral é cística, com organização celular sempre em um mesmo estágio de diferenciação. Os indivíduos coletados neste trabalho apresentaram os testículos como estruturas pares, ovais e compactos, variando sua cor com amarelado, esbranquiçado. Este trabalho cumpriu com os objetivos propostos, no qual os valores mensais das densidades de espermatídies primária, espermatídies secundária e espermatozoides apresentaram variações significativas ao longo dos meses de coleta demonstrando também, dependência com a variação do regime de chuvas da região.

Palavras-Chave: Espermatogênese; Anuros: Ciclos reprodutivos.

ABSTRACT

The control of reproductive cycles requires that bodies be able to detect changes in the environment and adjust the parameters according to the requirements. Being mediated by the interaction between the endogenous rhythms of the animal and the influence of environmental factors, therefore, in open areas physical environment conditions such as temperature and precipitation are the main factors influencing the standards anuran reproductive. Therefore, the objective of this work was to characterize the histological and morphometric aspects of testicles of *Pithecopus nordestinus* (CARAMASHI, 2006) as well as to assess the influence of precipitation and temperature on the parameters tested. The collections were made in the ecological station of Tapacurá-TSE, is a remnant of mata atlantica seasonal semideciduous forests. 23 males were collected from *Pithecopus nordestinus* distributed between the months of February through November 2018. The monthly figures show that only significant relationships between rainfall and the density of spermatids primary (Esp I) ($r = 0.04$; $p = 0.02$), while the secondary Spermatids (Esp II) and Sperm (Z) did not show any relationship significant. Already the monthly variation of the temperature of the TSE showed no significant relations with the density of spermatids primary (Esp I), spermatids (Esp II) and sperm (Z). The results of this study support with the KEYS et al. (2016), which emphasizes that the spermatogenesis in Anurans in General is with cell organization always cystic on a same stage of differentiation. Individuals collected in this work presented the testicles as pairs, oval structures and compact, varying your color with yellowish, whitish. This work has complied with the objectives proposed, in which the monthly values of the density of primary, secondary and spermatids sperm showed significant variations over the months demonstrating collection too, dependence with the variation of rainfall in the region.

Key words: spermatogenesis; Anurans; reproductive cycles.

LISTA DE SIGLAS

EET: Estação Ecológica do Tapacurá

Te: Testículos

Esp I: Espermátides primaria

Esp II: Espermátides secundaria

Z: Espermatozoides

Med: Mediastino

Epd: Epidídimo

Ta: Túnica albugínea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Pithecopus nordestinus</i> (Caramaschi, 2006).....	19
Figura 2: Estação Ecológica do Tapacurá e seus três fragmentos de mata.....	20
Figura 3: Te – Testículos.....	21
Figura 4: Cortes histológicos corados em Hematoxilina e Eosina do testículo de <i>Pithecopus nordestinus</i> coletados entre Fevereiro – Novembro na EET.....	27

LISTA DE QUADROS

- Tabela 1:** Quantidade de exemplares dos machos de *Pithecopus nordestinus* coletados mensalmente na Estação Ecológica do Tapacurá – EET.....**25**
- Tabela 2:** Relações entre a densidade das espermatídes primaria (Esp I), espermatídes secundaria (Esp II) e espermatozoides (Z) de machos de *Pithecopus nordestinus* em relação a pluviosidade e a temperatura na Estação Ecológica do Tapacurá – EET.....**29**
- Tabela 3:** Valores mensais (média e erro padrão) densidade das espermatídes primarias (Esp I), espermatídes secundarias (Esp II) e espermatozoides (Z) (mm^2) dos testículos da espécie de *Pithecopus nordestinus* coletados na EET – PE, no período de Fevereiro – Outubro de 2018.....**30**
- Gráfico 1:** Média mensal da pluviosidade da Estação Ecológica do Tapacurá – EET.....**28**
- Gráfico 2:** Média mensal de temperatura por expedição.....**28**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1.Geral.....	16
3.2.Específicos.....	16
4. REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1.Ordem anura.	17
4.2.Anuros de mata atlântica.....	17
4.3.As gônadas em anuros	18
4.4.Caracterização histológica	18
4.5.Espécie de estudo	18
4.6.Área de estudo	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1.Atividade de campo	21
5.2.No laboratório	21
5.3.Preparação das lâminas.....	22
5.4.Análise estereológica das células	23
5.5.Analise dos dados	23
5.6.Dados climáticos	24
6. RESULTADOS	28
7. DISCUSSÃO	31
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
9. REFERENCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores chave que determinaram o sucesso da dispersão dos vertebrados foi a capacidade de adaptar seus órgãos e ciclos reprodutivos ao ambiente em que vivem (HADDAD & PRADO, 2005). Segundo CALLARD et al. 1978, o controle dos ciclos reprodutivos requer que os organismos sejam capazes de detectar as mudanças no ambiente e ajustar os parâmetros fisiológicos de acordo com as condições necessárias.

O controle dos ciclos reprodutivos em anuros é mediado pela interação entre os ritmos endógenos do animal e a influência de fatores ambientais (SASSO-CERRI et al. 2004). Sendo assim, em áreas abertas às condições físicas do ambiente como a temperatura e a precipitação são os principais fatores influenciadores dos padrões reprodutivos dos anuros (CARDOSO E MARTINS, 1987).

Os ciclos reprodutivos dos anuros foram explorados e classificados por Lofts, (1974), de acordo com a soma dos padrões comportamentais as características histológicas das gônadas em: contínuos, potencialmente contínuos e descontínuos.

O ciclo descontínuo é típico das zonas de clima temperado, sendo caracterizado por um discreto período de reprodução com mudanças pronunciadas no tamanho das gônadas, produção de gametas e estruturas sexuais acessórias. Já os ciclos contínuos e potencialmente contínuos, são típicos de regiões tropicais, e caracterizam-se pela constante produção de gametas. No entanto, no ciclo potencialmente contínuo, há uma interrupção parcial na gametogênese durante certos períodos. (SANTOS; OLIVEIRA, 2007)

A mata atlântica ocupa uma área de 1.110.182 Km², corresponde 13,04% do território nacional e é constituída principalmente por mata ao longo da costa litorânea que vai do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul (TONHASCA-JÚNIOR 2005). É caracterizado por ter um índice pluviométrico elevado, como resultado dos ventos oceânicos que carregam a umidade, que são atraídos para as regiões continentais e chegam às cadeias montanhosas costeiras, onde ocorrem chuvas (AB'SABER 1977, STEINMETZ 2004).

Hoje, restam apenas 12,4% da floresta que existia originalmente e, desses remanescentes, 80% estão em áreas privadas. 72% da população brasileira, sete das nove maiores bacias hidrográficas do país e três dos maiores centros urbanos do continente sul americano estão na Mata Atlântica (AB'SABER 1977).

Logo, o conhecimento sobre a aspectos reprodutivos de anuros para áreas de mata atlântica apresenta um carácter de alta importância por eles possuírem uma alta especificidade microambiental e uma pequena capacidade de adequar-se a interferência humana, o que os tornam extremamente sensíveis as mudanças ambientais visando métodos para a conservação das áreas e espécies que habitam nela (SHLAEPFER; GAVIN, 2001; VITT; CALDWELL, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Os estudos que objetivam descrever a biologia reprodutiva dos anuros, retratam apenas aspectos comportamentais desses animais em seus ambientes. Trabalhos realizados por WOODWARD (1986); RYAN (1985); MARTINS et al (1998) retratam vários aspectos de seleção sexual em anuros abordando características morfológicas e comportamentais, como o comprimento rostro-cloacal (CRC), vocalização e o número de noites de participação no coro e no sucesso reprodutivo dos machos.

O trabalho realizado por CALDAS et al (2016), que objetivou descrever a biologia reprodutiva de *Phyllomedusa nordestina* em áreas de caatinga e floresta atlântica, abordando apenas aspectos comportamentais.

Segundo SASSO-CERRI et al., (2004), as condições físicas do ambiente que mais interferem na biologia reprodutiva dos anuros são a temperatura do ar e a umidade relativa estritamente relacionada ao índice pluviométrico determinando vários aspectos de vida destes animais. Durante a época de estiagem, as espécies de anuros apresentam mecanismos fisiológicos (controle hormonal) e comportamentais (vocalização, comportamento de estiva) às altas temperaturas e escassez de água nos corpos aquáticos (ABE, 1995).

Os anuros são excelentes modelos no desenvolvimento e teste de teorias ecológicas e ou tem servido como organismos modelo importante em toda a história da ciência. Visto isso, torna-se de extrema importância o conhecimento sobre a biologia reprodutiva de anuros, não só pelo fato da sua abundância, mas também por estas populações possuírem uma alta especificidade microambiental e pequena capacidade de adequar-se a interferência humana torna-se extremamente vulneráveis as mudanças ambientais (SHLAEPFER, 2001).

Trabalhos que objetivam caracterizar histologicamente as gônadas em anuros ainda são escassos e recentes. O trabalho realizado por Chaves et al (2016) que objetivou caracterizar as gônadas de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) em uma área de caatinga é um dos poucos trabalhos sobre biologia reprodutiva em anuros.

Visto isso, levando-se em consideração a importância deste grupo na manutenção e equilíbrio dos ambientes e considerando a escassez de informações referentes ao conhecimento dos padrões reprodutivos e suas relações com o ambiente de Mata atlântica, estudos que visam avaliar os aspectos reprodutivos de

espécies de anuros destas áreas são de extrema importância, pois não só serão levantadas informações importante sobre a espécie de estudo, como também promover a criação de modelos biológicos que poderá gerar alternativas para um melhor manejo e exploração desta região. Além disso, contribuem com informações relevantes para a tomada de decisões que visem tanto a conservação e o manejo adequado das comunidades de anuros e em áreas de mata atlântica onde estas espécies ocorrem (SCHLAEPFER; GAVIN 2001; VITT; CALDWELL, 2001; CHAVES et al. 2016).

Este trabalho visa suprir uma deficiência básica da espécie *Pithecopus nordestinus* para o estado de Pernambuco, possibilitando o conhecimento da espermatogênese e descrevendo a histologia dos testículos, e também estimular a continuidade dos trabalhos de biologia reprodutiva, para que possam ser realizados trabalhos futuros para outras espécies.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar a espermatogenese da *Pithecopus nordestinus*, bem como avaliar a influência da precipitação e temperatura na espermatogenese *Pithecopus nordestinus*, em dois fragmentos de mata atlântica do nordeste do Brasil.

3.2. Específicos

- Quantificar espermátides e espermatozoides;
- Correlacionar as alterações climáticas com os achados.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Ordem anura

A ordem anura é constituída pelos sapos, pererecas e rãs correspondendo como o grupo de anfíbios com a maior representatividade (FROST, 2016). São animais caracterizados por serem desprovidos de cauda na fase adulta.

Atualmente são conhecidas 7.000 espécies de anuros (FROST, 2016) no mundo, distribuídas principalmente nos trópicos e regiões temperadas. Ocorrem também em algumas ilhas oceânicas, especialmente aquelas ao sul do Oceano Pacífico e nos desertos, dos mais brandos aos mais extremos (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Para o Brasil são conhecidas 1.039 espécies de anuros distribuídas em 20 famílias e 90 gêneros (SHB, 2016), o que torna o país o mais diverso do mundo para o grupo. Para o estado de Pernambuco são conhecidas 70 espécies de anuros distribuídas em 11 famílias (MOURA, 2011).

Na composição da biodiversidade, os anuros formam grupos especialmente sensíveis as alterações ambientais devido ao seu comportamento biológico, atributos fisiológicos e caracterização ecológicas, como por exemplo, ciclo de vida bifásica e respiração cutânea (BLAUSTEIN et al., 1995). Esses animais necessitam de uma relativa estabilidade ambiental por serem dependentes de dois habitats diferentes simultaneamente: o aquático e o terrestre. Impactos gerados em qualquer desses ambientes inviabiliza sua população.

4.2. Anuros de mata atlântica

. A reprodução de anfíbios em ambientes áridos está diretamente associada ao período de chuvas, pois fora desse período, não existem condições favoráveis para o desenvolvimento de larvas (DAYTON & FITZGERALD, 2005).

Já em regiões tropicais úmidas como a Mata Atlântica, chuvas regulares permitem que corpos de água permaneçam por um longo tempo, o que permite que os espécimes comecem a atividade reprodutiva e significa que as larvas não são ameaçadas por mudanças súbitas na disponibilidade de água (DUELLMAN 1978, HÖDL 1990, STEBBINS E COHEN 1995).

A reprodução é um evento crítico para anfíbios, porque eles geralmente não possuem mecanismos para conservar a água dentro de seus corpos (BENTLEY 1966, ARZABE 1999). Assim, uma alta umidade influencia positivamente a abundância de

anfíbios, prevenindo o nível de depressão fisiológica de suas pelagens independentes no ambiente em que se encontram (ARZABE 1999, PRADO & POMBAL 2005, RODRIGUES ET AL. 2012).

4.3. As gônadas em anuros

O aparelho reprodutor em anuros é constituído pelos testículos e ovários, onde são conectados por meio de ductos genitais próprios constituindo a via gametogenica, representada pelos ductos eferentes e ducto de Wolff nos machos e pelos ovidutos ou ducto de Müller nas fêmeas. Após a diferenciação e o desenvolvimento sexual do indivíduo, frequentemente também são descritas estruturas vestigiais que permanecem como não funcionais.

DUELLMAN e TRUEB (1994) descrevem os testículos de anuros como pares, arredondados, compactos, de cor geralmente amarelada, esbranquiçada ou branco-leitosa. Apresentando variações anatômicas na forma e peso conforme o período reprodutivo, além de outras alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução (LOFTS, 1974).

4.4. Caracterização histológica

Estudos realizados por (OLIVEIRA ET AL, 2002; OLIVEIRA ET AL, 2003^a; 2003B; FERREIRA ET AL., 2008; FERREIRA ET AL 2009; SANTOS ET AL 2012; LEIVAS ET AL., 2012; VILLAGRA ET AL, 2012; CHAVES et al, 2016) onde o objetivo foi descrever histologicamente os testículos dos anuros, evidenciam que a espermatogênese de é forma cística, na qual as células germinativas ocorrem em grupos organizados e definidos. Ou seja, cada cisto possui células no mesmo estágio de diferenciação e, no túbulo seminífero, podemos encontrar vários cistos em estágios diferentes ou em estágios semelhantes, dependendo do tipo de ciclo reprodutivo de cada espécie.

4.5. Espécie de estudo

Pithecopus nordestinus (Figura 1) é uma espécie pertencente à família Phyllomedusidae. Possui uma faixa branca estreita no lábio superior, barras verticais pretas sobre fundo vermelho-alaranjado nas faces ocultas dos flancos e membros locomotores e faixa verde larga em todo o comprimento da face superior da coxa (CARAMASCHI, 2006).



Figura 1. *Pithecopus nordestinus* (Caramaschi, 2006). Fonte: Arquivo pessoal.

A espécie é conhecida popularmente como “rã-macaco”. De médio porte, apresentando dimorfismo sexual, medindo 32,1-42,1mm de comprimento rostro cloacal (CRC) nos machos, e entre 38,6-43,7 mm nas fêmeas, ou seja, as fêmeas são maiores que os machos, provavelmente pelo investimento energético diferenciado na reprodução, devido à produção dos ovos, o amadurecimento reprodutivo e o crescimento (MOURA et al., 2011)

No que se trata de conservação, de acordo com a The Red List of Threatened Species (IUCN 2016), esta espécie é classificada como DD (dados deficientes) e LC (Menos Preocupante) na lista brasileira de animais em extinção espécies pelo Ministério de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (Portaria MMA 444/14) e em a lista estadual de espécies ameaçadas da Secretaria Estadual de Meio Ambiente de Pernambuco (SEMA Resolução 01-08 / 01/2015).

Ocorre no nordeste do Brasil, nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (CARAMASCHI, 2006). Possui hábito noturno e arborícola, deposita seus ovos em folhas de vegetação sobre corpos d’água lânticos (DA-SILVA-VIEIRA et al., 2007;).

Portanto, suas características biológicas o tornam espécie-chave para testar a hipótese de que chuva e temperatura são os reguladores mais importantes do na espermatogênese em anuros.

4.6. Área de estudo

A estação Ecológica do Tapacurá (EET) (Figura 2) ($08^{\circ} 04' S$ e $35^{\circ} 12' W$), situada a 50 km da cidade do Recife, no município de São Lourenço da Mata – PE. É uma unidade de conservação pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. É um remanescente de Mata Atlântica semidecidual estacional com 400 ha constituído por três fragmentos: Mata do Toró, Mata do Camocim e Mata do Alto da Buchada (MOURA et al., 2011).

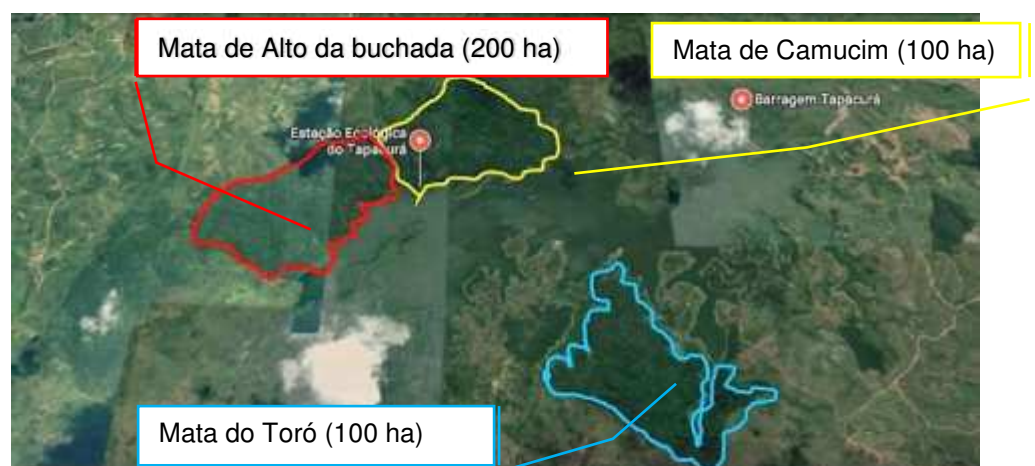
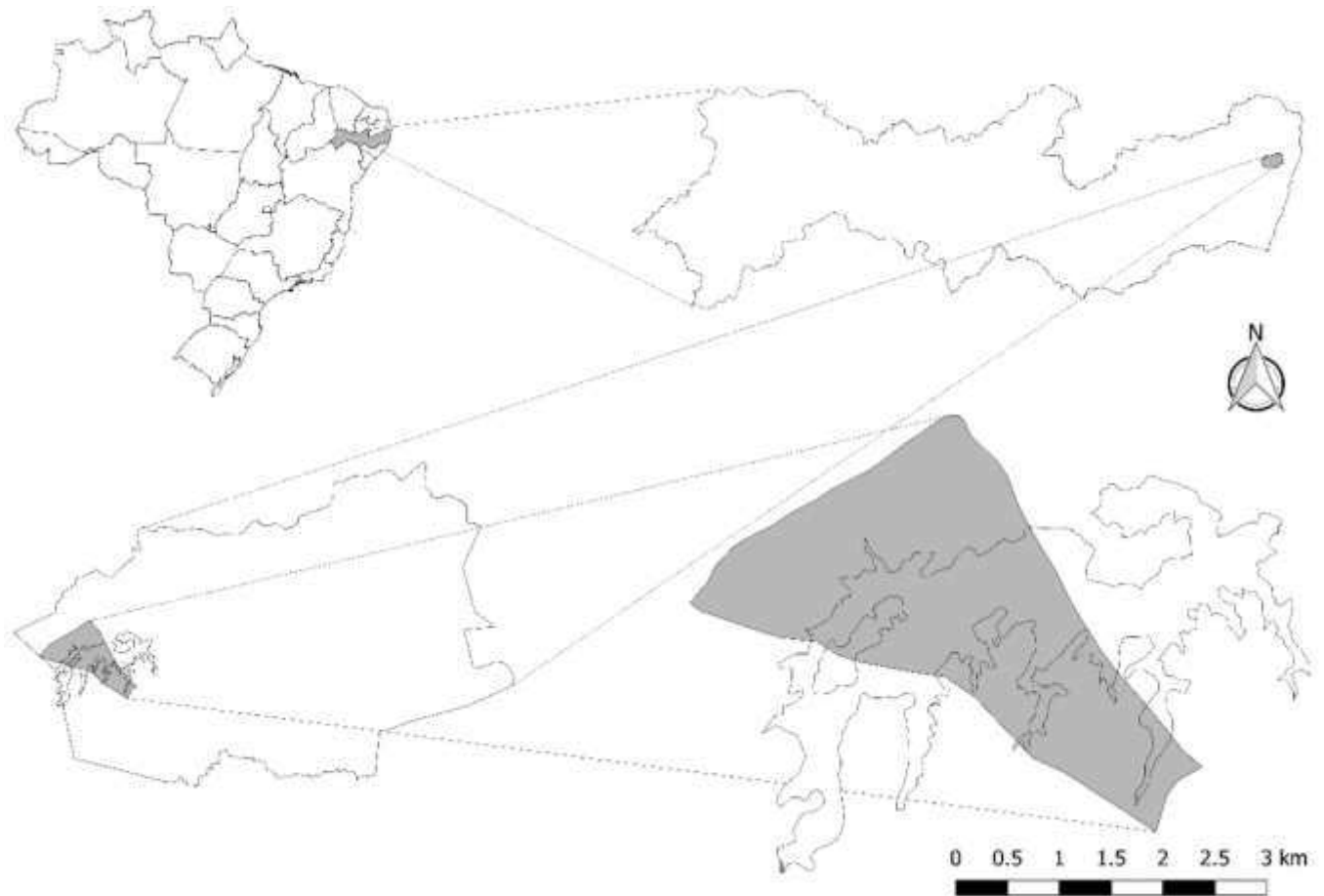


Figura 2. Mapa representando a Estação Ecológica do Tapacurá e seus três fragmentos de mata.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Atividade de campo

Foram realizadas excursões noturnas mensais entre fevereiro a outubro de 2018 nos fragmentos de mata do Camocim e Alto da Buchada. Os anuros foram coletados manualmente e para aumentar nossas chances de capturar espécimes em diferentes estágios da espermatogênese, foi objetivado capturar mensalmente 3 machos de *Pithecopus nordestinus*, adultos e reprodutivamente ativos.

5.2. No laboratório

Os espécimes capturados foram eutanasiados com uma hiperdosagem de lidocaína a 5%, medidos o Comprimento Rostro Cloacal (CRC) com paquímetro digital e pesados com balança de precisão 0,0g, retiradas as gônadas (Figura 3), fixadas com solução de formaldeído 10% e mantidos em álcool 70% na Coleção do Laboratório de Estudos Herpetológicos e Paleoherpetológicos da UFRPE (LEHP).

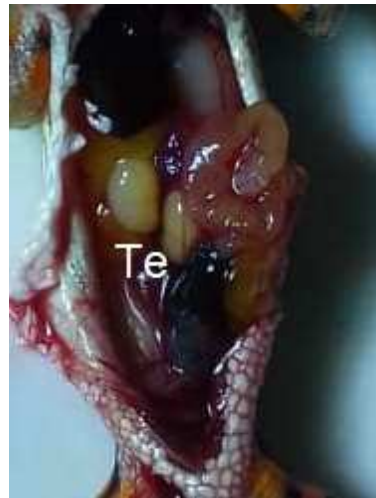


Figura 3. Te – Testículos. Fonte: Arquivo pessoal

5.3. Preparação das lâminas

Os testículos foram levados para o Laboratório de Biologia de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, campus Cuité - PB, onde foram fixados em solução de formaldeído 10% por 24 horas, sendo então passados por um protocolo segundo (HOPWOOD1990):

- Desidratados em série de banhos crescente de álcool (70% - 30 min, 80% - 30 min , 90% - 30 min, 95% - 30 min, 100% - 30 min e 100% - 30 min).
- Diafinização (dois banhos de 30 min de Xilol);
- Inclusão (parafina 50% + Xilol – 1 hora);
- Parafina pura – 24 horas;
- Emblocados;
- Posteriormente seccionados no microtomo a 5,0 µm.

As lâminas passaram pelo protocolo de coloração segundo (ROBINSON E GRAY 1990):

- Xilol II - 6min;
- Álcool 100% - 1 min;
- Álcool 90% - 1 min;
- Álcool 70% - 1 min;
- Água destilada - 1 min;
- Hematoxilina - 30 seg;
- Água de torneira - 10 min;
- Eosina - 20 seg;
- Álcool 70%- 1 min;
- Álcool 90% - 1 min;
- Álcool 100% I - 1 min;
- Álcool 100% II - 1 min;
- Xilol II - 6 min

Os tipos celulares foram identificados de acordo com trabalhos descritos por HERMOSILLA et al (1983); OLIVEIRA et al (2003^a; 2003b) e CHAVES et al (2016).

5.4. Análise estereológica das células

A análise qualitativa foi procedida em microscópio convencional, trinocular e de bancada, acoplado a um sistema digital de aquisição de imagens com objetiva de 4x e 40x, no qual foi adquirido 15 campos focais diferentes de cada lâmina por espécime.

A análise estereológica das células irá seguir os preceitos de MANDARIM-DE-LACERDA 1991 e WEIBEL 1979. Onde foi calculado a densidade de volume (Vv) das espermatídes I, espermatídes II e espermatozoides. Por apresentarem excelentes modelos celulares e por bioindicar o estágio de maturação sexual dos indivíduos, uma vez que as espermatogônias e os espermatócito, por serem estágios celulares iniciais, não trazem informações necessárias sobre o período reprodutivo próximo ao momento da coleta.

O cálculo da amostra foi realizado com utilização da fórmula de HALLY (1964) e devidamente corrigida para o resultado que represente os preceitos estereológicos (MANDARIM-DE-LACERDA 1991).

Para quantificar a densidade de perfis (QA, espermatídes primárias, secundária e espermatozoides) foram contados campos em uma Área Teste (AT) com 0,044 mm² para cada animal. O resultado final (mm²) será adquirido após a utilização da média para cada perfil e aplicação da fórmula (MANDARIM-DE-LACERDA 1991):

$$QA = \Sigma \text{perfis} / AT.$$

5.5. Análise dos dados

Os valores da densidade das células da linhagem reprodutiva, área dos lóculos seminíferos e oogônios foram analisados entre os meses pelo teste Kruskal-Wallis.

A dependência entre as variáveis climáticas (pluviosidade e temperatura), a densidade da população das células da linhagem reprodutiva e a área dos lóculos seminíferos e oogônios foram verificadas por meio do teste de Regressão Linear Simples. Foi considerado $p < 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

5.6. Dados climáticos

Os dados mensais pluviométricos (mm) foram adquiridos por meio do banco de dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima – APAC.

Já os dados de temperatura (°C) e humidade relativa do ar (%), foram adquiridos por meio de Termo Higrômetro nas áreas que os animais foram coletados em cada expedição mensal em dois fragmentos semi decidual protegido da Mata Atlântica no Alto da Buchada e Camucim, no município de São Lourenço da Mata, no estado de Pernambuco, Brasil (08°03'S, 35°10'W, 200 acima do nível do mar). O clima é As', quente e úmido, de acordo com a classificação de Köppen. O período de chuva é entre os meses de março e agosto, e o período seco de setembro a fevereiro, com uma média anual de 1411,8 mm de precipitação.

6. RESULTADOS

Foram coletados 23 machos de *Pithecopus nordestinus* (tabela 1) distribuídos entre os meses de Fevereiro a Outubro de 2018.

Tabela 1: Quantidade de exemplares dos machos de *Pithecopus nordestinus* coletados mensalmente na Estação Ecológica do Tapacurá – PE (EET).

Meses	Machos
Fevereiro	3
Março	3
Abril	3
Mai	3
Junho	3
Julho	1
Agosto	3
Setembro	3
Outubro	2
Total	24

Como mostra a tabela 1, durante o mês de Novembro não foi encontrado nenhum exemplar de *P. Nordestinus* durante a saída de campo.

Em relação a caracterização histológica dos testículos de *Pithecopus nordestinus*, todos os tipos celulares foram identificados com facilidade, com cada lóculo apresentando vários cistos de células espermatozóides (Figura 4 a). Cada cisto se apresentou como um agrupamento de células germinativas em um mesmo estado de diferenciação. Delimitando os lóculos se observam a túnica albugínea (Figura 4 A, Ta) ao centro da estrutura testicular a região do mediastino (Figura 4 D, Med), ambas estruturas sendo formada por tecido conjuntivo. Pode-se observar ainda o epidídimo (Figura 4 D, Epd).

As espermatogônias primária (Figura 4 C, Sg1) foram registradas com facilidade, pois são células localizadas na periferia locular, margeando a túnica albugínea e apresentando cromatina granular.

As espermatogônias secundária (Figura 4 c, Sg2) apresentam-se como células com coloração mais intensa que os demais cistos, situadas imediatamente após as espermatogônias primárias no sentido lúmen do lóculo seminífero, ambas as células do tamanho similar.

Os espermatócitos primário (Figura 4 B, Sp1) são células grandes, embora menores que as espermatogônias primária possuindo uma cromatina mais frouxa.

Os espermatócitos secundário são levemente menores que as células anteriores com núcleo bem mais denso e com uma grande área citoplasmática eosinófila ao redor.

As espermatídes primária (Figura 4 B, Esp I) são células arredondadas, menores que os espermatófitos (Sp), com núcleo ligeiramente compactado e com formato ligeiramente fusiforme.

As espermatídes secundária (Figura 4 C, Esp II) são células cujo núcleo sofre alongamento concomitantemente a uma progressiva compactação nuclear, se desfazendo a organização cística para se arranjar em feixes sustentados pelas células de Sertoli, embora ainda seja considerada como um cisto germinativo.

Os espermatozoides (Figura 4 B, Z) apresentaram como caracterização por compactação nuclear e redução citoplasmática muitas vezes livres e de forma desordenada no centro dos lóculos.

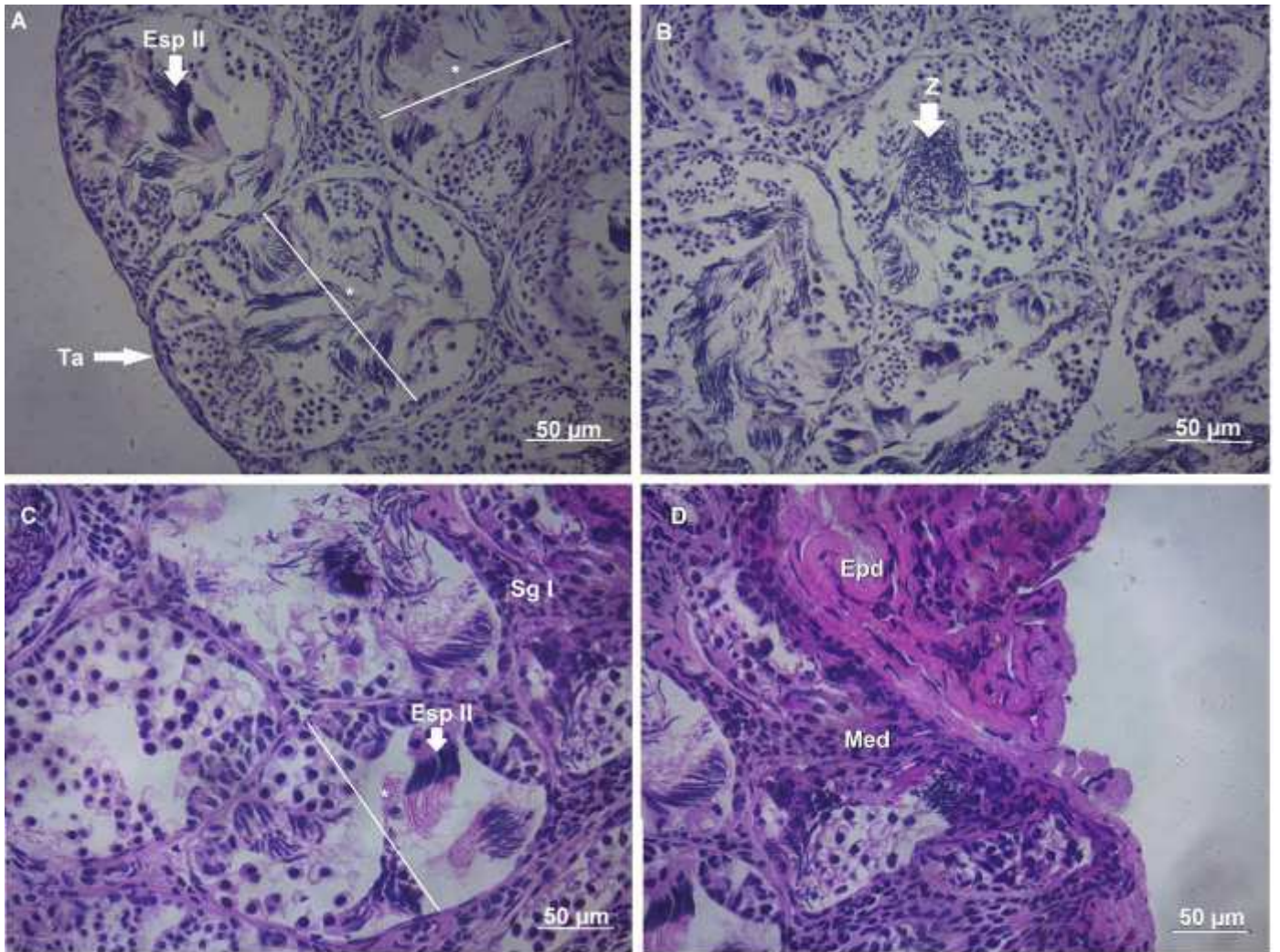


Figura 4. Cortes histológicas corados em Hematoxilina e Eosina do testículo de *Pithecopus nordestinus* coletados entre Fevereiro – Outubro de 2018 na EET - PE. Corte A: Ta – túnica albugínea; Corte B: 40x, Esp I – espermatíde primaria, Z- espermatozoide; Corte C: 40x, Sp 2 – espermatíde secundaria; Corte D: 40x, Med – mediastino, Epd – epidídimo; * Área locular.

Nossas coletas se deram principalmente no início de cada mês, portanto, para correlacionar a densidade de perfis com a pluviosidade, iremos utilizar os dados pluviométricos do mês anterior. Ex: Os espécimes coletados no mês de fevereiro, iremos utilizar os dados pluviométricos do mês de janeiro.

O gráfico 1, mostra a média mensal da pluviosidade durante os meses de Janeiro a Outubro na Estação Ecológica do Tapacurá - EET.

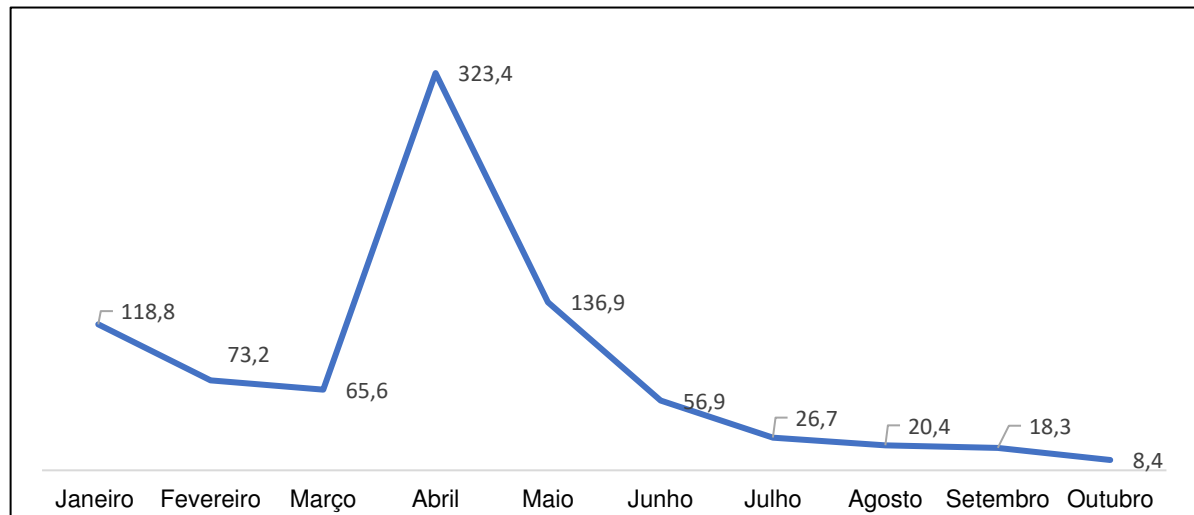


Gráfico 1: Média mensal da pluviosidade da Estação Ecológica do Tapacurá – EET.

O gráfico 2, mostra a média de temperatura por expedição nas áreas em que os animais foram encontrados.

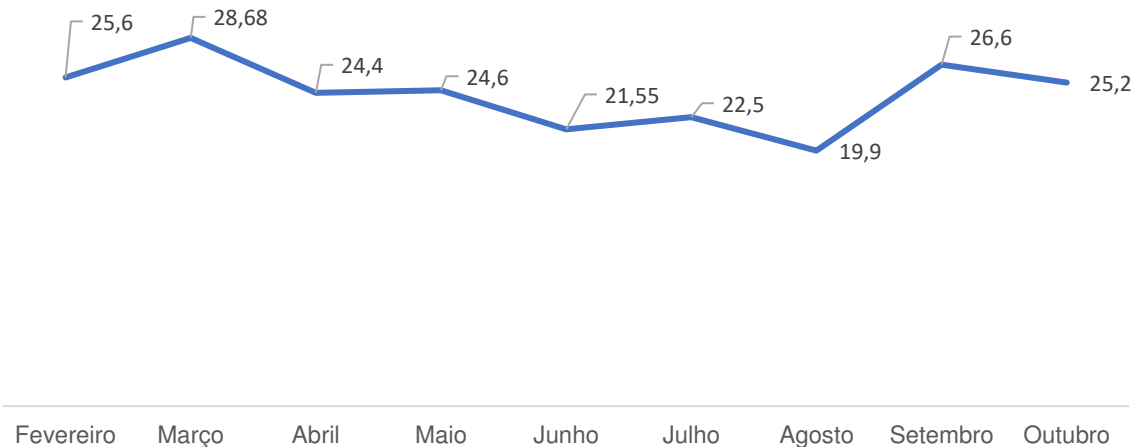


Gráfico 2: Média mensal de temperatura por expedição.

A tabela 2 mostra que só houve relações significativas mensais entre a pluviometria e a densidade de espermátides secundário (Esp II) ($-r=0.48$; $p=0,01$), enquanto as Espermátides secundário (Esp II) e Espermatozoides (Z) não apresentaram nenhuma relação significativa. Já a variação mensal da temperatura da ETT não apresentou relações significativas com a densidade de espermátides primário (Esp I), espermátides secundário (Esp II) e espermatozoides (Z) não influenciando nas densidades das células germinativas.

Tabela 2: Relações entre a densidade dos espermátócitos primário (Esp I), espermátócitos secundário (Esp II) e espermatozoides (Z) de machos de *Pithecopus nordestinus* em relação a pluviometria e a temperatura na Estação Ecológica do Tapacurá – PE (EET), no período de Fevereiro-Outubro de 2018.

* valores estatisticamente significativos.

	Temperatura		Pluviometria	
	r	p	R	P
Esp I	-0.2620	0.2161	0.2764	0.1909
Esp II	0.1516	0.4794	-0.4891*	0.0152*
Z	-0.1073	0.6177	-0.2154	0.3098

Os valores mensais das densidades das espermátides primaria (Esp I), espermátides secundaria (Esp II) e espermatozoides (Z) apresentaram variações significativas ($p < 0,05$, KRUSKAL-WALLIS). Como mostra a tabela 3, as densidades de espermátides primaria (Esp I) foi significativamente maior para o mês de março - abril e setembro - outubro, e significativamente menores para os meses de maio - julho. Já para as espermátides secundarias (Esp II), as densidades foram maiores para os meses de março - abril, agosto - setembro - outubro, e menores para os meses de maio - julho. Para as densidades de espermatozoides (Z), os valores significativos maiores foram entre junho e outubro.

Tabela 3: Valores mensais (média e erro padrão) densidade das espermátides primarias (Esp I), espermátides secundarias (Esp II) e espermatozoides (Z) (mm^2) dos testículos da espécie de *Pithecopus nordestinus* coletados na EET - PE, no período de Fevereiro - Outubro de 2018.

	Esp I (mm^2)	Esp II (mm^2)	Z (mm^2)
Fev	662,62, \pm 120,75	1,21, \pm 79,63	359,00, \pm 170,11
Mar	227,02, \pm 649,49	828,52, \pm 649,49	5,17, \pm 20,45
Abr	574,49, \pm 1,10	6,65, \pm 631,85	2,31, \pm 1,22
Mai	445,79, \pm 4,02	6,56, \pm 1,49	2,84, \pm 8,9
Jun	454,96, \pm 114	643, \pm 209	428,70, \pm 41,47
Jul	663,62, \pm 0	443, \pm 0	96,46, \pm 0
Ago	251,93, \pm 68	411, \pm 162	389,81, \pm 40,00
Set	403,36, \pm 95,58	663, \pm 148	291,16, \pm 95,58
Out	84,35, \pm 286	928, \pm 286	435,48, \pm 84,08*

7. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho corroboram com o de CHAVES et al (2016), no qual ressalta que a espermatogênese em anuros de forma geral é cística, com organização celular sempre em um mesmo estágio de diferenciação. No entanto, essa organização dos cistos pode variar entre diferentes famílias e de acordo com o ambiente onde esses animais ocorrem (FERREIRA et al 2009).

Os indivíduos coletados neste trabalho apresentaram os testículos (Figura 3, Te) como estruturas pares, ovais e compactos, variando sua cor com amarelado, esbranquiçado. Apresentando ainda variações anatômicas na forma e peso conforme o período reprodutivo, além de outras alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução, corroborando assim com os autores (DUELLMAN e TRUEB, 1994; LOFTS, 1974).

Em relação a caracterização histológica, os testículos de *Pithecopus nordestinus* apresentaram característica celular variado, com tamanho do lóculo seminífero em diferentes formas, apresentando o padrão das células germinativas desorganizadas.

No que se trata das variações histológicas dos testículos analisados, os valores de correlação das densidades de Espermatídes primária (Esp I), Espermatídes secundárias (Esp II) e Espermatozoides (Z) com a Temperatura e Pluviosidade apresentado na Tabela 2, houve apenas uma relação significativa negativa para Espermatídes secundário (Esp II) com a Pluviosidade. Já para as Espermatídes secundária (Sp II) e espermatozoides não houve influência significativa para pluviosidade.

Não houve relação significativa em relação dos com a variável temperatura. Apesar da mata atlântica apresentar chuvas frequentes, a temperatura mantém uma média mensal constante, visto isso, não há uma súbita mudança climática.

Nos valores mensais de densidade de espermatídes primaria (Esp I), espermatídes secundaria (Esp II) e espermatozoides (Z), foi possível notar variações significativas, no qual entre os meses de fevereiro a setembro, os valores de Esp I foram bastante elevados. Já para a Esp II, no mês de fevereiro mostrou-se baixo, março elevado, abril e maio baixo, junho a outubro alto. Para a densidade de espermatozoide, fevereiro mostrou uma densidade elevada, março a maio baixo, junho alto, julho baixo, de agosto a outubro alto. Levanto em consideração a média

mensal pluviométrica, os dados mostram que quanto maior o número de chuvas, mais baixa é a densidade de espermatozoides. Mostrando ainda uma relação direta entre elas.

Pithecopus nordestinus apresentou uma constante produção espermatogênica, e uma rápida maturação das células germinativas. Essas características mostram que seu ciclo reprodutivo é explosivo.

Não foram encontradas exemplares de machos adultos de *Pithecopus nordestinus* na Estação Ecológica do Tapacurá - EET durante o mês de Novembro. Neste período, as áreas que hospedam a maioria dos espécimes durante o estudo foram afetadas pelo estresse hídrico e o estrato de gramíneas e arbustos foi completamente reduzido. Isso se dá pelo fato de que modificações na estrutura do habitat, principalmente relacionadas à vegetação, podem influenciar a estrutura das comunidades de anuros, reduzindo as taxas de riqueza e diversidade de espécies e afetando a reprodução de *Pithecopus nordestinus*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho cumpriu com os objetivos propostos, onde os valores mensais das densidades de espermatídes primária, espermatídes secundária e espermatozoides apresentaram variações significativas ao longo dos meses de coleta demonstrando também, relação com a variação pluviométrica da região.

Visto isso, trouxe informações importantes para trabalhos futuros para a família Phyllomedusidae, pois apresentam características importantes para aumentar o banco de dados sobre a família e visar trabalhos de conservação da espécie.

Este trabalho pode trazer informações chave sobre a espermatogênese dos testículos de *Pithecopus nordestinus*, onde se sabe pouco sobre a biologia reprodutiva dessa espécie e vem acrescentar informações importantes para futuros trabalhos

No entanto, julgasse necessário a busca de mais informações sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, onde é importante ser revisado o período de coleta e quando os coletar para as informações serem mais robustos em relação aos ciclos reprodutivos.

As buscas neste trabalho se deram mensalmente com esforço amostral de 3 dias de excursões, o ideal para buscas em trabalhos de biologia reprodutiva que seja quinzenal com esforço de 3 dias cada totalizando 6 dias de buscas. Isso pode trazer melhores resultados.

9. REFERENCIAS

AB'SÁBER, Aziz Nacib. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul: primeira aproximação. **Geomorfologia**, São Paulo, n.52, p.1-121, 1977

ABE, A. B. Estivation in South America Amphibian and Reptiles. **Braz Jour Med Bio Res.** n. 28, p.1241–1247, 1995.

AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMAS - APAC. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/chuvas-rmr.php> acesso em 20/11/2018>. Acesso em 20 nov.2018.

ANGULO. A. *Pithecopus nordestinus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016:e.T135878A107298562**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20163.RLTS.T135878A107298562.en>>. Acesso em 28 nov. 2018.

ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia.** n.16, p. 851–864, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S010181751999000300022>> Acesso em 29 de set. 2018.

BENTLEY, P. J. Adaptations of Amphibia to Arid Environments. **Science.** n.29, p.619-623, 1966

BLAUSTEIN AR, WAKE DB. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American* 272: 52–57

CALLARD, L. P.; G. V. CALLARD; V. LANCE; J. L. BOLAFFT & J. S. ROSSET. 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. **Biology of Reproduction** 18 (1): 1-11.

CALDAS L. S., et al. **Autoecology of Phyllomedusa nordestina (Anura: Hylidae) in areas of the Caatinga and Atlantic Forest in the State of Sergipe, Brazil.** In: *North-Western Journal of Zoology*, v.12, n, 2, p.271-285 Oradea, Romania, 2016 Article No.: e151510. Disponível em:<<http://biozoojournals.ro/nwjz/index.html>>. Acesso em 18 de set. 2018.

CARAMASCHI, U. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 64, n. 2, p.159-179, 2006.

CARAMASHI, U; SILVANO Débora. **Trachycephalus atlas**. **The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T56048A11417153**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T56048A11417153.en>>. Acesso em 28 Nov. 2018.

CARDOSO, A. J.; MARTINS, J. E. **Diversidade de anuros durante o turno de vocalização em comunidades Neotropicais**. Papeis Avulsos de Zoologia, v.36, p.279-285, 1987.

CHAVES, M. F., et al. Influence of rainfall and temperature on the spermatogenesis of *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae). (**Zoologia**) Curitiba, v.34, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-46702017000100329>. Acesso em 29 de nov. 2018.

CHAVES, M. F.; **CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Leptodactylus macrosternum* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE BRASIL**. 85 f. Tese (Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural do Pernambuco – UFRPE, Pernambuco, 2016.

DA SILVA VIEIRA, W. L.; ARZABE, C.; SANTANA, G. G. **Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Cariri paraibano**, Nordeste do Brasil. Oecologia Brasiliensis, v. 11, n. 3, p. 383-396, 2007.

DAYTON, G. and L.A. FITZGERALD. 2005. Priority effects and desert anuran communities. Canadian Journal of Zoology 83(8)1112-1116.

DUELLMAN, W. E. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in amazonian Ecuador. Miscellaneous publication. Museum of natural history, university of Kansas 65: 1-352

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Johns Hopkins University press. p. 789, 1994.

FERREIRA, A., et al. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862)(anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil. **Biocel** . v.1, n. 32, p. 185-194, 2008.

_____. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). Acta Scientiarum. **Biological Sciences**. Maringá, v. 31, n. 4, p. 447-452, 2009

Frost, D.R. **Amphibian Species of the World 6.0** 2016, na Online Reference. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>>. Acesso em: 30 de Novembro de 2018 às 16:32.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS - IBF. Disponível em: <<https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>> Acesso em 2 de nov. de 2018.

HADDAD, C. B. F.; PRADO, C. P. A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. **Bioscience**. v. 55, n.3 p. 207-217.

_____. Elección del macho por la hembra de *hyla minuta* (Amphibia: Anura). **Acta Zoologica Liloana**, v. 42 p.81-91, 1992.

HERMOSILLA, I.B.; et al. Espermatogénesis em la rana Chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758)(Anura, Leptodactylidae). **Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción**, v. 54, n, 1, p. 103-115, 1983.

_____. Caracterización del ovario de la "Rana chilena" *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae). **Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción**, v. 57, p. 37-47.

HODL, W; Reproductive diversity in Amazonian lowland frogs. Fortschrine der Zoologie, BandNol. 38 . Hanke, W. (Hrsg.), **Biology and Physiology of Amphibians** Gusrav Fischer Verlag . Swrtsarr . New York . 1990

HOPWOOD, D. **Fixation e fixatives**. In: Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological tecniques. New York, Churchill Livingstone, 3. ed. p 21-42, 1990.

KÖPPEN-GEIGER; Classificação climática de Köppen-Geiger. Source: Contributors: Alchimista, Angrense, DCandido, Dante Raglione, Darwinius, Fasouzafreitas, Felipe Menegaz, Heitor C. Jorge, Juntas, LeonardoG, Manuel Anastácio, Marcelo-Silva, Ne8rd, OS2Warp, PatríciaR, Ramonne, Reynaldo, SangeYasha, 41 edições anónimas

LANCE, V.; CALLARD, L. P. Hormonal control of ovarian steroidogenesis in nonmammalian vertebrates. In "The Vertebrate ovary" (R. E. Jones. Ed.). p. 61-407. Plenum Press. New York, 1978

LEIVAS, P.T. et al. The **Reproductive Biology of the Invasive *Lithobates catesbeianus***. Froglog, v.104, p. 57-58, 2012.

LISTA ESTADUAL DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DA SECRETARIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE DE PERNAMBUCO - SEMA (Resolução 01-08 / 01/2015). Disponível em <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=280590>> Acesso em 28 de nov. de 2018.

LOFTS, B. Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. **General and Comparative Endocrinology** v. 4, p. 550–562, 1974. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(64\)90064-4](https://doi.org/10.1016/0016-6480(64)90064-4)>. Acesso em 15 de mar.2018.

MARTINS, M. et al. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, *hyla faber*. **Amphibia-Reptilia**. v, 19, p, 65-73, 1998.

MANDARIM-DE-LACERDA CA. **Métodos quantitativos em morfologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Eduerj. 131, 1995. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=280590>>. Acesso em 29 de set. 2018. MMA – Ministério do Meio Ambiente: Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Disponível

em:<http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2014/p_mma_444_2014_lista_esp%C3%A9cies_ame%C3%A7adas_extin%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 28 de Nov. de 2018.

MOURA, Geraldo J. B., et al. **Herpetofauna de Pernambuco**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011.

MOURA, Geraldo J. B.; **Os anfíbios anuros arborícolas da Ilha de Paulo Afonso-Bahia, Nordeste do Brasil**. In: _____ (org.). Vertebrados terrestres da Ilha de Paulo Afonso Região Nordeste do Brasil. Anfíbios, Répteis, Aves e Mamíferos. Editora UFRPE.

OLIVEIRA, C., et al. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura). **Revista Chilena de Anatomia**, v. 20, p. 263-268, 2002.
OLIVEIRA, C, VICENTINI, C.A, TABOGA, S.R. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia**. v. 56, p.75-83, 2003.

OLIVEIRA, C.; et. al. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**: v. 11, n.1, p. 39-46, jun.2003.

PRADO, G.M.; POMBAL JUNIOR, J.P. **Distribuição espacial e temporal dos anuros em um brejo da Reserva Biológica de Duas Bocas, Sudeste do Brasil**. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, v.63, n.4, p. 685-705, out-dez, 2005.

PROTÁZIO, A. S.; et al. *Biology and Conservation*, vol. 8, p. 88-95, 2013

ROBINSON, G.; GRAY, T. **Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining**. In: BANCROFT JD, STEVENS A. *Theory and practice of histological techniques*. 3. ed. Edinburgh London Melbourne and New York, cap. 27, p. 525-562, 1990.

RODRIGUES, L. M.; SANTOS, D. R.; SILVEIRA, T. B.;BLAMIREs, D. (2012): Comunidades de anuros, na fazenda Vale do Ipê, no município de Montes Claros de Goiás, Brasil. *Revista de Ciências Agro-Ambientais* 10(1): 53-59.

RYAN, M. J. The t'ngara frog. A study in sexual selection and communication. Chicago, **The University of Chicago**. p.230, 1985.

SANTOS, LIA R. de S.; OLIVEIRA, Classius de. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. Sociedade Brasileira de Zoologia, v. 24, n. 1, p. 64-70, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/21670>>. Acesso em 14 de set. de 2018.

SANTOS, L.R.S, et al. **Germ Cell Dynamics during the Annual Reproductive Cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae)**. *Zoological Science*, 28, 840-844, 2012.

SASSO-CERRI, E.; et al. Testicular morphological changes the seasonal reproductive cycle in the Bulfrog *Rana catesbiana*. **Journal of Experimental Zoology** 301: 249-260, 2004.

SHB (Sociedade Brasileira de Herpetologia). **Brazilian Amphibians: List of Species**. Disponível em: <<http://sbherpetologia.org.br/wp-content/uploads/2016/10/Segallaetal2016-1.pdf>>. Acesso em 30 de Outubro de 2018.

SHLAEPFER, M. A.; GAVIN, T. A. Edge effects on lizards and frogs in tropical forest fragments. **Conservation Biology**. v.15, p.1079-1090, 2001.

SOS MATA ATLÂNTICA. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/nossas-causas/mata-atlantica/>> Acesso 2 de nov. de 2018.

STEBBINS, R.C.; COHEN, N.W. **A Natural History of Amphibians**. Princeton University Press, New Jersey, 1995

STEINMETZ, S. (2004): A Mata Atlântica. pp. 1-188. In: Ambiental Consulting (eds.), Animais da Mata Atlântica: Patrimônio Natural do Brasil. São Paulo. Empresa das Artes.

TONHASCA-JÚNIOR, A. (2005): Ecologia e história natural da Mata Atlântica. Rio de Janeiro. Interciência.

VILLAGRA, A. L. I., et al. **Sermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study**. Zygote, Cambridge University Press, p. 1-9, 2012.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. The effects of logging on reptiles and amphibians of tropical forest. In: The cutting edge: conservation wildlife in logged tropical forest, 2001.

WEIBEL ER (1979) Fleischener Lecture: looking into the lung: what can tell us? **American Journal of Roentgenology**. 133 (6) 1021-1031.

WOODWARD, B. D. **paternal effects on juvenile growth in *Scaphiopus multiplicatus* (the New Mexico spade foot toad)**. Amer. Nat., 128: 58-65, 1986.

ZAR JH (1999) Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall. 663 pp.