



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE EDUCAÇÃO**

THAIS HENRIQUE SILVA

**ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO FÍGADO DE *Leptodactylus
macrostenum* COLETADOS NA REGIÃO DE CUITÉ- PB**

CUITÉ PB

2015

THAIS HENRIQUE SILVA

**ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO FÍGADO DE *Leptodactylus
macrostenum* COLETADOS NA REGIÃO DE CUITÉ- PB**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Fernanda das Chagas
Angelo M. Tenorio

CUITÉ PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586a Silva, Thaís Henrique.

Aspectos histomorfométricos do fígado de *Leptodactylus macrosternum* coletados na região de Cuité, PB. / Thaís Henrique Silva. – Cuité: CES, 2015.

45 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientadora: Fernanda das Chagas Angelo M. Tenório.
Coorientador: Marcio Frazão Chaves.

1. Anfíbios. 2. Hepatócitos. 3. Células de Kuppfer. 4.
Morfometria I. Título.

CDU 59

THAIS HENRIQUE SILVA

ASPECTOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO FÍGADO DE *Leptodactylus macrostenum* COLETADOS NA REGIÃO DE CUITÉ- PB

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Fernanda C. Angelo M. Tenório (Orientador)

Prof. Msc. Marcio Frazão Chaves

Prof.^a Msc. Caroline Guimarães D'assunção

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

- Arthur Schopenhauer

Dedico aos meus pais Waldir e Penha, e as
minhas irmãs, Thalita e Thainá.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, por me dar discernimento e por ter me capacitado a chegar a mais uma conquista.
- Aos meus pais Waldir Carlos e Penha Henrique, pelos conselhos, pelas orações, pelo apoio financeiro e por estarem sempre ao meu lado me dando suporte e apoio, obrigado pelo carinho e amor. Amo vocês!
- As minhas irmãs Thalita e Thainá Henrique, por me desejarem sempre o melhor.
- Agradeço a Francinete, William, Francineide, Fernanda, Josenildo, Waleska, Willyane, Ronaldo, Francisca e a todos os meus queridos familiares pelo apoio moral e suporte espiritual, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.
- Agradeço aos meus orientadores e professores, Marcio Frazão, pelo incentivo e por confiar em meu trabalho e em especial a professora Fernanda Angelo, por ter me ensinado tanto mesmo as adversidades, por ter acreditado em mim e por ter me orientado de forma magnífica, obrigada pela recepção e pela amizade. Esta vitória tem a contribuição de vocês.
- A professora Caroline Guimarães D'assunção pela sua participação em minha banca. Obrigada pela sua presença.
- Agradeço aos meus colegas de laboratório, ao grupo LABAN pelo companheirismo e auxílio durante todo o meu processo acadêmico em especial a Dyego Costa, Alexandra Simões, Leomyr Sângelo e Tatyane Sousa.
- Agradeço a minha grande amiga Mônica Diana, pelo seu companheirismo, por estar sempre ao meu lado em todos esses anos de curso, agradeço por estar comigo em todos os momentos de dificuldade, alegrias, pelos conselhos dados (alguns rs), pelas noites em claro de estudo e pelos mais simples momentos que você esteve comigo. Muito Obrigada!
- Aos meus colegas de sala Mayara Patrícia, Hellena Lima, Máisa Veríssimo e a muitos outros amigos que mesmo estando longe, guardo comigo lembranças boas de nossos momentos.
- Aos meus queridos amigos Laerte Cavalcante, Francielly Morgana, Priscila Nunes, obrigada pela paciência e carinho, vocês são mais que especiais.
- Agradeço a João Paulo pela colaboração neste trabalho e por se disponibilizar a me auxiliar, obrigada!
- Em especial agradeço a Maria Emanuela e Renato Lucas, dois companheiros de carreira acadêmica que estarão sempre em meu coração, agradeço por todos os

anos em que compartilhamos conhecimentos, alegrias e desentendimentos, são sem dúvida dois dos meus melhores amigos.

- Agradeço a UFCG pelo me acolher de forma magnífica e a todos os professores do CES nos quais eu tive a honra de ser aluna.

- A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

O *Leptodactylus macrosternum* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), é um anfíbio anuro de hábito noturno e tem como habitat preferencial corpos de água lânticos. O fígado desempenha nesses animais um importante papel nos processos de estocagem de nutrientes. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar os aspectos histomorfológicos do fígado de *Leptodactylus macrosternum*. Os fígados são provenientes dos animais coletados da cidade de Cuité-PB, os quais foram fixados em formol, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente, o órgão foi clivado, obtendo-se fragmentos, os quais em seguida foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração histológica Hematoxilina-Eosina, analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50. A análise morfométrica do fígado, utilizando uma quadrícula com 100 pontos-teste foi realizada, colocada sobre os cortes das lâminas histológicas coradas pela Hematoxilina-Eosina. A contagem foi feita nas lâminas preparadas, onde foram contados 10 campos, utilizando a objetiva de 40x, perfazendo um total de 5.000 pontos por grupo. De maneira semelhante, foram quantificadas as células de Kupffer em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina. Todos os dados foram analisados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com o post hoc de Dunn ($p < 0,05$). Não houve variação significativa na população de *L. macrosternum*, nem correlação entre o surgimento de mais machos ou fêmeas quando comparados com o período de chuvas, os valores do índice hepatossomático não apresentaram variações significativas. As análises histológicas descreveram o fígado como sendo semelhante à maioria dos vertebrados. A análise dos dados histomorfológicos das células de Kupffer mostram variação significativa apenas entre os indivíduos da lâmina 4 comparadas com as lâminas 7, 9 e 11.

Palavras-Chave: Anfíbios, hepatócitos, células de Kupffer, Morfometria

ABSTRACT

The *Leptodactylus macrosternum* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), is an amphibious anuro of nocturnal and its preferred habitat lentic water bodies. The liver plays an important role in these animals in nutrient storage processes. Thus, this study aimed to analyze the morphologic aspects of *Leptodactylus macrosternum* liver. The livers are from animals collected from the city of Cuité-PB, which were fixed in formalin, remaining the same for 24 hours. Subsequently the body was cleaved to give fragments, which were then dehydrated in ethyl alcohol (increasing concentrations), diaphanized by xylene, and embedded in paraffin impregnated. In sequence, the sections were subjected to histological staining technique hematoxylin-eosin, analyzed in light microscope OLYMPUS BX-49 brand and photographed under light microscope OLYMPUS BX-50. The morphometric analysis of the liver, using a grid with 100 points-test was performed, placed on the cuts of histological slides stained with hematoxylin-eosin. Counting was done in prepared slides, which were counted 10 fields, using the 40x objective, a total of 5,000 points per group. Similarly, Kupffer cells on slides stained with hematoxylin and eosin were quantified. All data were analyzed using Kruskal-Wallis nonparametric test with Dunn's post hoc test ($P < 0.05$). There was no significant variation in the population of *L. macrosternum*, nor correlation between the emergence of more males or females when compared to the rainy season, the values of liver somatic index did not show significant variations. Histological analysis describes the liver as being similar to most vertebrates. The analysis of data from histomorphometric Kupffer cells show significant variation among individuals only 4 of the blade compared with the blades 7, 9 and 11.

Key words : Amphibians , hepatocytes , Kupffer cells , morphometry

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- *Leptodactylus macrosternum*, coletado no Horto Florestal Olho D'água da Bica, município de Cuité- PB.....21
- Figura 2- Anatomia do *Leptodactylus macrosternun*. Fígado do animal localizado na cavidade superior (seta branca).....23
- Figura 3- Análise morfológica do fígado. (A e B) Após a remoção do fígado, o mesmo foi clivado obtendo fragmentos (asterisco e seta). (C) Procedimento de inclusão com parafina. (D) Material emblocado e pronto para o corte no micrótomo.....24
- Figura 4. Distribuição da Pluviosidade total (mm) em um período de maio a dezembro de 2013 (AESAs, 2015).....27
- Figura 5. Variações Médias do índice hepatossomático de fêmeas e machos adultos de *Leptodactylus macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro.....29
- Figura 6. Análise histológica do fígado de *Leptodactylus macrosternum*.s. A- Parênquima (P) bem desenvolvido com hepatócitos (setas); B- Malha vascular com veias de vários calibres (VS); C- Células de Kupffer em grande quantidade (setas); D- Células de Kupffer em maior aumento (setas).....30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Número de fêmeas e machos adultos e relação Macho:Fêmea (M:F) de *L. macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro.....26
- Tabela 2. Média e Desvio Padrão do Comprimento Rostro-Cloacal e Peso Corpóreo de fêmeas e machos adultos de *L. macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro.....28
- Tabela 3. Média e desvio padrão do peso do fígado de *L. macrosternum*.....28
- Tabela 4. Variações do índice hepatossomático (Média±Desvio Padrão) de fêmeas e machos adultos de *Leptodactylus macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro.....29
- Tabela 5. Média±Desvio padrão das células de Kupffer do fígado de *Leptodactylus macrosternum* coletados no Horto Floresta Olho D'água da Bica, Cuité-PB entre os meses de maio e dezembro.....31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AESA - Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba
CRC - Comprimento Rostro Cloacal
HFODB - Horto Florestal Olho d'água da Bica
H&E - Hematoxilina Eosina
IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IGS- Índice Gonadossomático
IHS - Índice Hepatossomático
K - Fator de Condição
LABAN- Laboratório de Biosistemática de Anfíbios
PC - Peso Corporal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓTICA	17
3.1 <i>Leptodactylus macrosternum</i>	17
3.2 MORFOLOGIA DO FÍGADO	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 COLETA DOS ANIMAIS.....	21
4.2 ANÁLISE DO COMPRIMENTO ROSTRO-CLACAL	21
4.3 PESO DO FÍGADO E PESO COPORAL DO MACHO E FÊMEA DE <i>Leptodactylus macrosternum</i>	22
4.4 ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO	22
4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FÍGADO	22
4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO FÍGADO	24
4.7 CORRELAÇÃO DOS ASPÉCTOS MORFOLÓGICOS MORFOMÉTRICOS COM O SEXO E O PERÍODO DE COLETA	24
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	32
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO - LICENÇA DE COLETA	41

1 INTRODUÇÃO

A família Leptodactylidae é distribuída em quatro gêneros, sendo *Leptodactylus* o mais numeroso, composto por 88 espécies sendo que, destas, 75 ocorrem no Brasil (OLIVEIRA et al. 2010).

Dentre essas espécies encontra-se o *Leptodactylus macrosternum* (*L. macrosternum*) que é uma espécie de rã de médio porte que pode atingir até 11 cm de CRC (SOEIRO, 2003).

O *L. macrosternum* tem por nome vulgar rã-manteiga. Esta espécie possui um dorso acinzentado com pregas longitudinais proeminentes, é de hábito noturno e tem como habitat preferencial corpos de água lânticos como banhados, arroios e canais onde vivem em meio às gramíneas (FREITAS & SILVA, 2004).

O período reprodutivo do *L. macrosternum* está diretamente relacionado com o período de chuvas, para isso, os machos, escondidos em meio à vegetação, emitem uma vocalização de notas curtas e de baixa frequência a fim de chamar a atenção da fêmea. Os ovos tem cor escura, e são envolvidos por uma espécie de "ninho" de espuma branca. A dieta desta espécie consiste, principalmente, de pequenos artrópodes, além de anuros, peixes, anelídeos e moluscos, cujo principal órgão que metaboliza todos esses alimentos é o fígado (STRUSSMANN, 1984; LAJMANOVICH, 1996; MANEYRO et al., 2004; SANABRIA et al., 2005; TEIXEIRA & VRCIBRADIC, 2003; SOLÉ et al., 2009).

O fígado desempenha nos vertebrados um importante papel nos processos de estocagem de nutrientes. Nessa perspectiva o fígado é o principal órgão envolvido e relacionado ao metabolismo proteico. É a maior glândula dos vertebrados (HILDEBRAND & GOSLOW, 2006), está localizado na parte superior da cavidade abdominal, tem como função a liberação e regulação de substâncias químicas no organismo, também tem como função o armazenamento de substâncias, secreção de bile e desintoxicação. Essas funções exercem um papel essencial na manutenção da homeostase do corpo (HILDEBRAND & GOSLOW, 2006).

O fígado nos anuros é constituído por hepatócitos, que são células poliédricas com diâmetro variado entre 20 e 30 µm. Também são encontradas células de

Kupffer, que são macrófagos que tem como função fagocitar outras células, atuam metabolizando hemácias velhas digerindo sua hemoglobina e secretam imunossustâncias. O tecido hepático não sofre mudança durante e depois da metamorfose (VIERTEL & RICHTER,1999).

O arranjo do tecido hepático é diretamente relacionado com as características fisiológicas dos animais, tais como reprodução e reserva de nutrientes. Os Hepatócitos estão normalmente dispostos em “parede” na maioria dos vertebrados, contendo uma ou duas camadas de células, a morfologia do fígado pode variar entre as espécies de acordo com sua fisiologia. (FRANCO-BELUSSI et al., 2012).

A identificação das espécies de anfíbios e o estudo de suas particularidades ecológicas revelam-se decisivos para o sucesso das ações que buscam conservar a sua biodiversidade, bem como compreender sua relação com o ambiente (HEYER et al.,1994).

Correlacionar o fígado do anfíbio com a época reprodutiva e as estações em que essas espécies foram encontradas, podem nos dizer como estes espécimes se adaptam à flutuação sazonal e qual a relação morfométrica do fígado comparado com o período de reprodução, levando em consideração que pouco se sabe sobre esses aspectos.

Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar a histomorfometria do fígado de *L. macrosternum* durante o período de coleta e também correlacionar a morfometria do fígado diferenciando macho e fêmea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar histomorfometricamente o fígado de *Leptodactylus macrosternum* (ANURA, LEPTODACTILIDAE), como também correlacionar o fígado com o período de coleta diferenciando macho e fêmea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir o Comprimento Rostro-Cloacal de *Leptodactylus macrosternum*;
- Avaliar o Índice Hepatosomático de machos e fêmeas, comparando-os com os períodos de chuvas;
- Analisar morfometricamente o fígado de *Leptodactylus macrosternum*;
- Analisar a relação do fígado durante o período de coleta e suas características diferenciando macho e fêmea;
- Analisar Histologicamente o fígado de *Leptodactylus macrosternum*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Leptodactylus macrosternum*

Das sete classes de vertebrados conhecidas pelos zoólogos, três são terrestres, três são aquáticas e uma é intermediária sendo representada pelos anfíbios, que tem aspectos de vertebrados aquáticos e terrestres (POUG, et al. 1993). Os indivíduos desta classe são os sapos, rãs, salamandras e cobra-cega, que tem um desenvolvimento dividido em uma fase larval (aquática) e a fase adulta (terrestre) (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Nos anfíbios, a pele é uma estrutura fina e flexível e é rica em glândulas mucosas que tem função de secreção de fluidos com a finalidade de umedecer a pele (HIDELBRAND & GOSLOW 2006). A respiração dos anfíbios é cutânea e pulmonar na fase adulta, na fase aquática a respiração é realizada através das brânquias. Os anfíbios anuros são denominados pecilotérmicos, pois sua temperatura corporal varia de acordo com a temperatura do ambiente (HIDELBRAND & GOSLOW 2006). As principais famílias da ordem anura estão divididas em Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae, e Pipidae (RODRIGUES, 2003).

A família *leptodactylidae* é uma das famílias de anuros mais amplamente distribuídas na América do Sul. Sua distribuição espacial inclui o Brasil, Uruguai, Paraguai, e Argentina. Os Anfíbios anuros, podem se adaptar e habitar vários ambientes distintos que variam desde florestas com elevadas altitudes a bancos de areia. (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Loebmann & Mai (2008), fizeram um levantamento das espécies de anfíbios na região nordeste do estado do Piauí e obtiveram como resultado uma diversidade de vinte e um espécimes de seis famílias de anuros, nos quais a família Leptodactylidae foi representada com quatro espécimes, sendo a segunda família com o maior número de distribuição na região nordeste do estado.

Os estudos dos anuros se consolidam na obtenção de informações básicas sobre a ecologia das espécies (SHINE, 1995). Informações básicas como o ciclo reprodutivo, dieta, história natural, morfologia e anatomia são essenciais para a definição de cada indivíduo, como também, suas características e habitat. (SAWAYA et al., 2008).

O *L. macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) é conhecido vulgarmente como rã-manteiga, esse tipo de rã habita áreas abertas, também é encontrada em açudes ou até mesmo áreas inundadas. Esses animais têm hábitos noturnos e se alimentam de insetos entre outros pequenos artrópodes. A estação de acasalamento é de setembro a fevereiro e estes animais também aproveitam o período de chuvas para se reproduzir (PEREIRA, 2009).

Com relação aos poucos estudos realizados sobre os anfíbios anuros Cuervas & Martori (2007) afirmam:

Os estudos sobre os anuros são essenciais para a formulação de boas estratégias de conservação. Tais estudos fornecem informações cruciais sobre a história de vida desses animais, suas atividades diárias e energia que precisam para realizá-las, dessa forma, identificando as flutuações na população e os efeitos da modificação do habitat sobre elas.

A espécie *L. macrosternum* é uma rã de que varia entre médio e grande porte, na sua morfologia apresenta estrias longitudinais no dorso, o padrão de coloração varia desde o verde até o marrom claro com várias manchas irregulares denominadas ocelos, de hábitos noturnos e com uma dieta baseada em pequenos artrópodes. Apesar de ser bastante abundante no território brasileiro, esta espécie é pouco estudada (HEYER et al., 2010).

A Caatinga está entre os domínios geográficos brasileiros em que se encontram a espécie em estudo. Ocupa aproximadamente uma área de 800.000km², é um domínio morfoclimático característico do Brasil e possui uma vasta fauna de répteis e anfíbios. Hoje, se conhecem na caatinga cerca de quarenta e oito espécies de anfíbios anuros incluindo o *L. macrosternum*, muitos deles são espécies endêmicas da caatinga. (LEAL et al., 2005).

Na região da Paraíba foram registrados poucos estudos a longo prazo em relação a herpetofauna. Na região de Cabaceiras, Cascon (1987) registrou 18 espécies de anfíbios enquanto Arzabe (1999) registrou 16 espécies em São José do Bonfim. Um fato que dificulta e limita um melhor conhecimento dos anfíbios da caatinga é a imprevisibilidade das precipitações, visto que muitas espécies incluindo o *L. macrosternum*, são ativas unicamente em períodos de chuva, pois é no período chuvoso que *L. macrosternum* se reproduz. Como as chuvas na caatinga são muito

imprevisíveis o planejamento de pesquisas sobre os anuros se torna mais difícil. (VANZOLINI, 1974; VANZOLINI, 1976; VITT & VANGLIDER, 1983).

De acordo com Ribeiro et al., 2005:

Os anfíbios anuros, em geral, apresentam plano de corpo pouco variável, o que em muitos casos dificulta a identificação por meio de uma análise superficial. Algumas espécies próximas, como *Eleutherodactylus guentheri* e *E. binotatus* (Leptodactylidae), exigem um exame mais atento, por exemplo, nos tamanhos relativos dos artelhos.

3.2 MORFOLOGIA DO FÍGADO

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula. É um órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A sua anatomia se distingue em três lobos principais, o lobo direito e o lobo esquerdo e o lobo médio, os quais são constituídos por células denominadas de hepatócitos. Essas células hepáticas são as principais células que constituem o fígado. Possuem um núcleo central arredondado com um ou dois nucléolos. Os hepatócitos estão distribuídos em placas, como um “muro”, essas placas possuem células denominadas células de Kupffer, que tem uma morfologia estrelada com um núcleo oval e atuam como macrófagos. (GARTNER; HIAT, 2003; GUYTON, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

De acordo com Junqueira & Carneiro (2004), os hepatócitos são as células mais importantes do fígado constituindo cerca de 2/3 da sua massa. Entre os cordões de hepatócitos estão os sinusóides vasculares revestidos por células endoteliais fenestradas. Além dos hepatócitos, das células endoteliais fenestradas e dos componentes biliares, existem outros tipos de células, macrófagos conhecidos como células de Kupffer. Estas células são encontradas na superfície luminal das células endoteliais, e suas principais funções são: metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias que eventualmente penetrem no sangue portal a partir do intestino grosso. As células de Kupffer constituem cerca de 15% da população celular no fígado e são corados com hematoxilina e eosina (H&E).

O fígado tem múltiplas funções vitais, dentre elas, a produção de proteínas importantes para o plasma sanguíneo como a albumina, além de produzir igualmente colesterol e proteínas especiais que ajudam a transportar as gorduras por todo o organismo.

Outra função do fígado é captar a glicose e armazená-la como glicogênio. Quando o organismo necessita de gerar mais energia e calor, o fígado volta a converter o glicogênio em glicose e liberta-a para a corrente sanguínea. O fígado é um órgão de vital importância, e suas funções principais são a produção e o armazenamento da bile, armazenamento de lipídeos, glicogênio e vitaminas, além de sintetizar proteínas como: fibrinogênio e protrombina e metabolizar drogas (GEORGE & CASTRO, 1998).

O fígado de *L. macrosternum* possui o mesmo padrão morfológico de outros anuros, dividido em três lobos e localizado na cavidade abdominal associado a outros órgãos. (FRANCO-BELUSSI et al., 2012).

Stéfani et al. (2002), faz ressalva sobre a necessidade de mais informações a respeito das atividades enzimáticas e metabólicas do fígado dos anfíbios, visto que, existem poucas referências na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DOS ANIMAIS

Foram utilizados 53 espécimes machos e fêmeas de *Leptodactylus macrosternum* (figura 1), procedentes do Horto florestal olho d'água da bica (HFODB) localizada no município de Cuité-Paraíba com prévia autorização do IBAMA cujo número para habilitação de coleta é: 44134-1. Os animais foram coletados durante os meses de maio a dezembro de 2013. Após a captura os animais foram levados ao laboratório de biossistemática de anfíbios (LABAN) e foram mantidos em recintos com habitat seminatural composto por gramíneas, solo encharcado e água, com temperatura ambiente por um período de 24 horas.



Figura 1- *Leptodactylus macrosternum*, coletado no Horto florestal olho d'água da bica, município de Cuité- PB

4.2 ANÁLISE DO COMPRIMENTO ROSTRO-CLOACAL

Para a análise e descrição dos valores de comprimento rostro-cloacal de *L. macrosternum* foi realizado através da medição em milímetros, com o auxílio do paquímetro digital.

4.3. PESO DO FÍGADO E PESO CORPORAL DO MACHO E FÊMEA DO *Leptodacylus macrosternum*

Os fígados coletados foram pesados utilizando balança analítica de precisão, bem como o peso corporal dos machos e fêmeas.

4.4 ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

Para a análise dos índices hepatossomáticos de machos e fêmeas e comparação com o período de chuvas na região, foram coletados dados da AESA e correlacionados com o período de coleta desses animais.

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FÍGADO

Todos os indivíduos coletados foram submetidos à eutanásia no primeiro dia após a coleta. Para tanto, os animais foram anestesiados com éter. Em seguida, foi realizada a abertura da cavidade abdominal (figura 2) para remoção total do fígado (figura 3A) o qual foi mergulhado imediatamente em fixador formol, permanecendo no mesmo por 24 horas. Esse processo foi realizado em todos os animais coletados. Após esses procedimentos, os fígados foram clivados, obtendo-se fragmentos (figura 3B), os quais se submeteram à técnica de inclusão com parafina (figura 3C). Em seguida, os blocos (figura 3D) foram seccionados em micrótomo do tipo Minot (Leica[®] RM 2035) ajustado para 3 μ m, os cortes foram feitos no laboratório da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em temperatura ambiente, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E) analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS[®] BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS[®] BX-50.

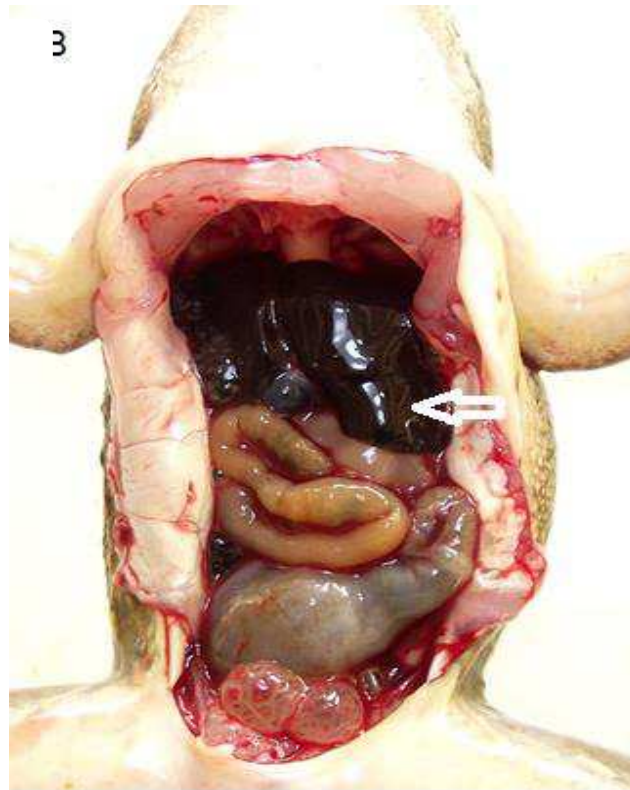


Figura 2- Anatomia do *Leptodactylus macrosternum*. Fígado do animal localizado na cavidade superior (seta branca).

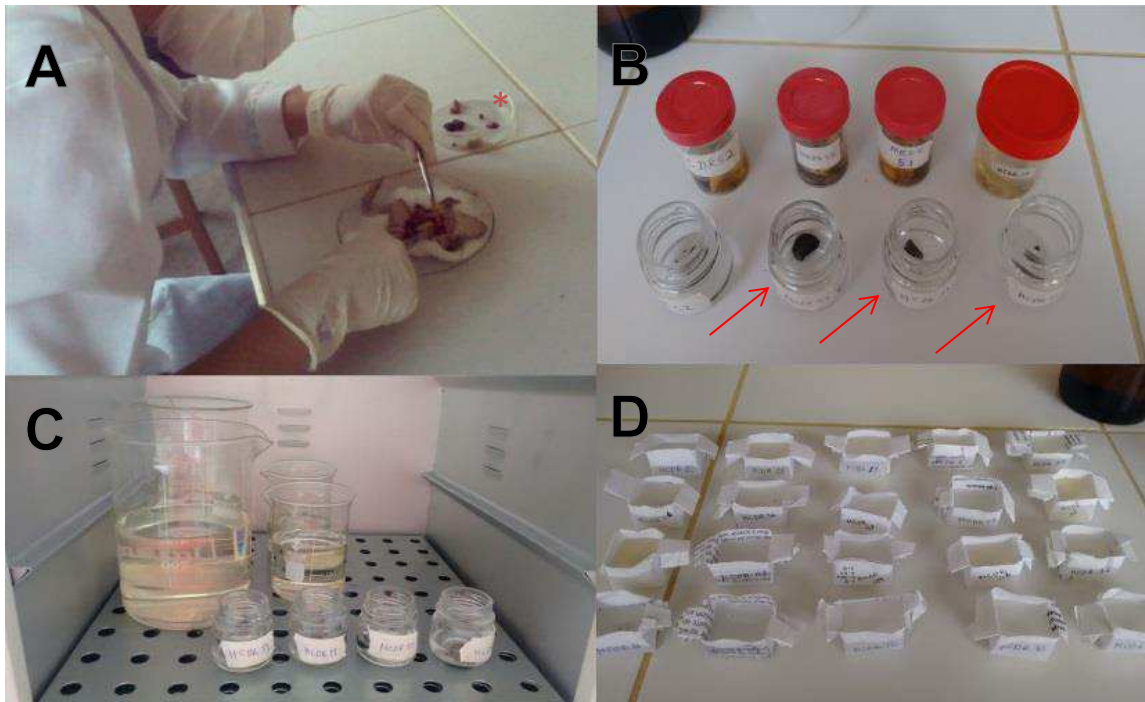


Figura 3- Análise morfológica do fígado. (A e B) Após a remoção do fígado, o mesmo foi clivado obtendo fragmentos (asterisco e seta). (C) Procedimento de inclusão com parafina. (D) Material emblocado e pronto para o corte no micrótomo

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO FÍGADO

Para a análise morfométrica foi determinada a quantidade de células de Kupffer em preparações coradas pela hematoxilina-eosina. Para tanto, utilizou-se uma gráticula com 100 pontos-teste, colocada sobre os cortes das preparações histológicas coradas pelo Hematoxilina-eosina. A contagem foi feita em vinte e três lâminas selecionadas de acordo com o período de coleta de maneira que foram contados 10 campos aleatórios, utilizando-se a objetiva de 40x.

4.7 CORRELAÇÃO DOS ASPÉCTOS MORFOLOGICOS E MORFOMÉTRICOS COM O SEXO E O PERÍODO DE COLETA

Para a análise de correlação dos aspectos morfométricos e morfológicos entre os machos e fêmeas de *L. macrosternum* e a relação desses animais durante o período de coleta foi utilizada a análise estatística.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados morfométricos, peso do fígado, peso corporal do macho e fêmea, Comprimento Rostro-Cloacal e Índice Hepatosomático foi realizada no programa computacional InStat (Stat Soft, 2001) por meio do métodos não-paramétricos de Kruskal-Wallis com pos-hoc de Dunn ($p > 0,05$).

5 RESULTADOS

Dos 53 indivíduos de *L. macrosternum* coletados na área do HFODB, foram contados 24 fêmeas e 29 machos (Tabela 1). O mês que apresentou maior número de indivíduos foi o mês de junho e não foi verificado indivíduos em campo nos meses de setembro e outubro. A maior razão sexual entre machos e fêmeas (M:F) do estudo foi no mês de junho e a menor em dezembro (Tabela 1).

Tabela 1. Número de fêmeas e machos adultos e relação Macho:Fêmea (M:F) de *L. macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro.

Meses	n Macho	n Fêmea	M:F	Total
Maio	5	4	1,25:1	9
Junho	11	4	2,75:1	15
Julho	3	5	0,60:1	8
Agosto	4	4	1,00:1	8
Setembro	0	0	0	0
Outubro	0	0	0	0
Novembro	4	3	1,33:1	7
Dezembro	2	4	0,50:1	6
Total	29	24	1,24:1	53

Dados meteorológicos mensais da pluviosidade foram conseguidos por meio da Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba (AESAs 2015) os quais foram empregados para descrever e relacionar as condições ambientais com a atividade reprodutiva e surgimento dos animais em campo (Figura 4).

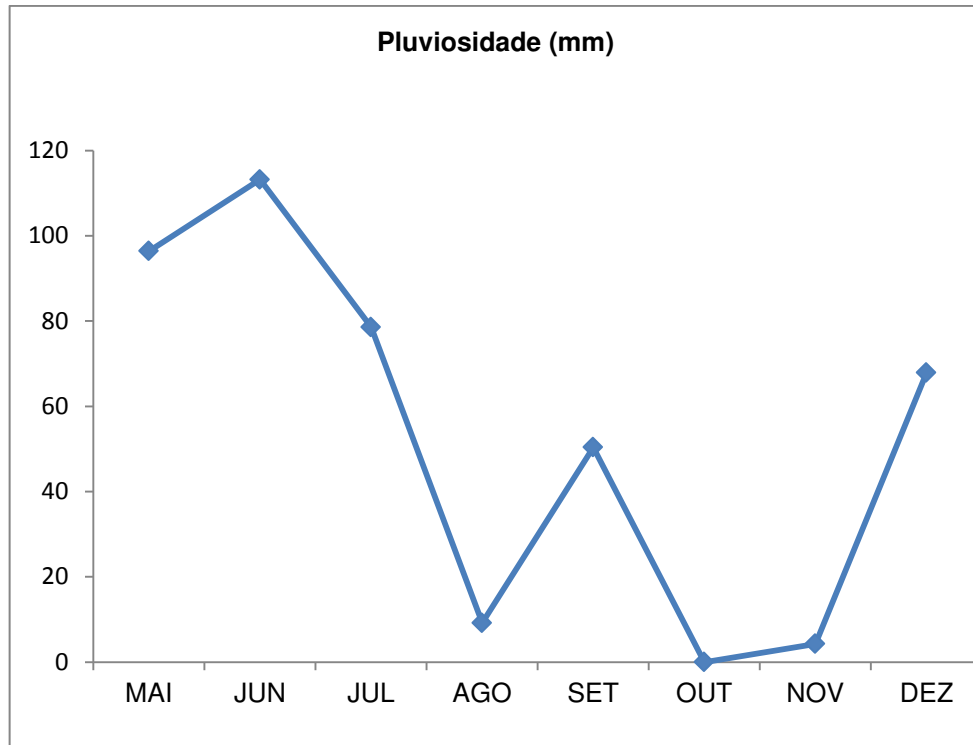


Figura 4. Distribuição da Pluviosidade total (mm) em um período de maio a dezembro de 2013 (AESAs, 2015).

Os valores do Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) para os machos e fêmeas de *L. macrosternum* não diferiram significativamente ao longo dos meses de amostras. Contudo, os maiores machos foram encontrados no mês de dezembro ($89,1 \pm 7,6$) e as maiores fêmeas em novembro ($77,4 \pm 6,1$), já os menores machos foram encontrados em maio ($64,7 \pm 14,8$) e as menores fêmeas em julho ($70,5 \pm 11,9$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média e Desvio Padrão do Comprimento Rostro-Cloacal e Peso Corpóreo de fêmeas e machos adultos de *L. macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro

Meses	Comprimento Rostro-cloacal (CRC)		Peso (g)	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
Maio	70,7±24,3a	64,7±14,8a	54,4±4,3a	42,1±13,8
Junho	72,7±3,53a	66,1±27,3a	42,9±10,3a	54,4±31,4a
Julho	70,5±11,9a	80,1±5,8a	42,5±16,1a	49,6±2,1a
Agosto	76,3±4,2a	65,5±30,5a	41,6±6,5a	65,5±30,5a
Novembro	77,4±6,1a	80,9±6,1a	43,4±8,4a	80,9±06,1a
Dezembro	71,4±18,7a	89,1±7,6a	44,7±31,2a	89,1±7,3

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

O peso dos machos de *L. macrosternum* apresentou diferenças significativas ao longo dos meses, sendo o período que apresentou os maiores valores médio de peso corporal (PC) foi o mês de dezembro (89,1±7,3) e o mês de maio foi o período em que se registraram o menor valor médio para este parâmetro (42,1±13,8) (Tabela 2).

Não foram verificadas diferenças significativas no peso corporal de fêmeas (Tabela 2), nem tão pouco no peso do fígado de machos e fêmeas de *L. macrosternum* em relação ao comprimento do animal ao longo de todo o período amostral (tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão do peso do fígado de *L. macrosternum*.

Meses	Peso Fígado (g)	
	Fêmea	Macho
Maio	1,1±0,3a	0,7±0,2a
Junho	0,5±0,4a	1,1±0,1a
Julho	1,1±0,6a	1,1±0,1a
Agosto	1,2±0,4a	1,1±0,5a
Novembro	1,1±0,1a	1,2±0,3a
Dezembro	1,1±1,1a	1,6±0,1a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Os maiores valores do índice hepatossomático (IHS) das fêmeas de *L. macrosternum* foi registrado no mês de julho (3,48±3,24) e menores no mês de

junho ($1,71 \pm 0,50$), já o maior IHS em machos foi verificado no mês de agosto ($2,56 \pm 1,57$) e menor em maio ($1,85 \pm 0,19$) (Tabela 4).

Tabela 4. Variações do índice hepatossomático (Média \pm Desvio Padrão) de fêmeas e machos adultos de *Leptodactylus macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro

	IHS (FEMEAS)	IHS (MACHOS)
Maio	$2,07 \pm 0,64a$	$1,85 \pm 0,19a$
Junho	$1,71 \pm 0,50a$	$2,33 \pm 0,95a$
Julho	$3,48 \pm 3,24a$	$2,30 \pm 0,11a$
Agosto	$3,16 \pm 1,32a$	$2,56 \pm 1,57a$
Novembro	$2,49 \pm 0,37a$	$2,15 \pm 0,20a$
Dezembro	$1,77 \pm 1,43a$	$2,20 \pm 0,20a$

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

O IHS de fêmeas de *L. macrosternum*, não pode ser utilizado como indicador do período reprodutivo, pois apresenta seus maiores índices no mês de julho enquanto que o maior pico de machos foi encontrado no mês de agosto, da mesma forma que divergiram os menores índices, que das fêmeas ocorreu no mês de junho e em machos no mês de maio (Figura 5).

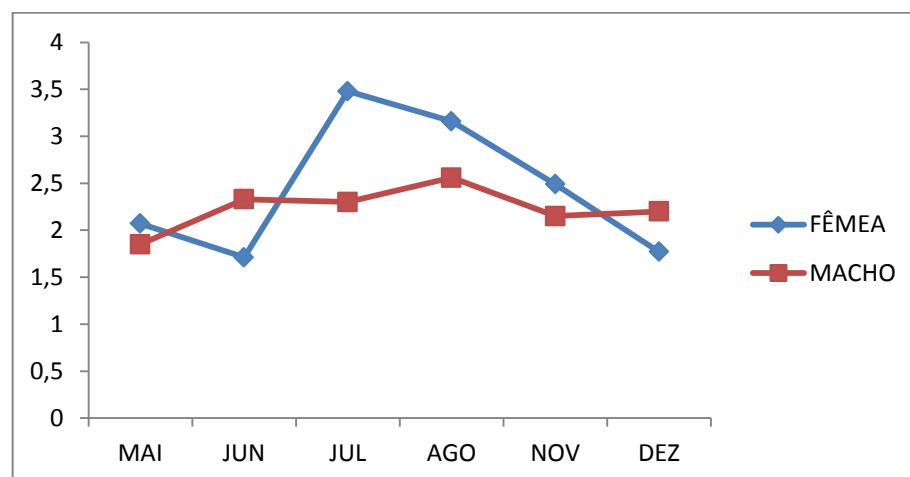


Figura 5. Variações Médias do índice hepatossomático de fêmeas e machos adultos de *Leptodactylus macrosternum*, capturados no HFODB nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro.

Os resultados histológicos mostraram que os fígados de todos os animais analisados apresentaram externamente uma delgada cápsula composta de tecido

conjuntivo fibroso, a cápsula de Glisson, um parênquima bem desenvolvido com hepatócitos (Figura 6A) e com uma malha vascular com veias de vários calibres (Figura 6B). Os hepatócitos dispuseram-se desordenadamente em torno da veia centro lobular, margeando os capilares sinusóides. Além disso, foram evidenciadas um aumento de células de Kupffer ao longo de todo o fígado (Figura 6C e 6D).

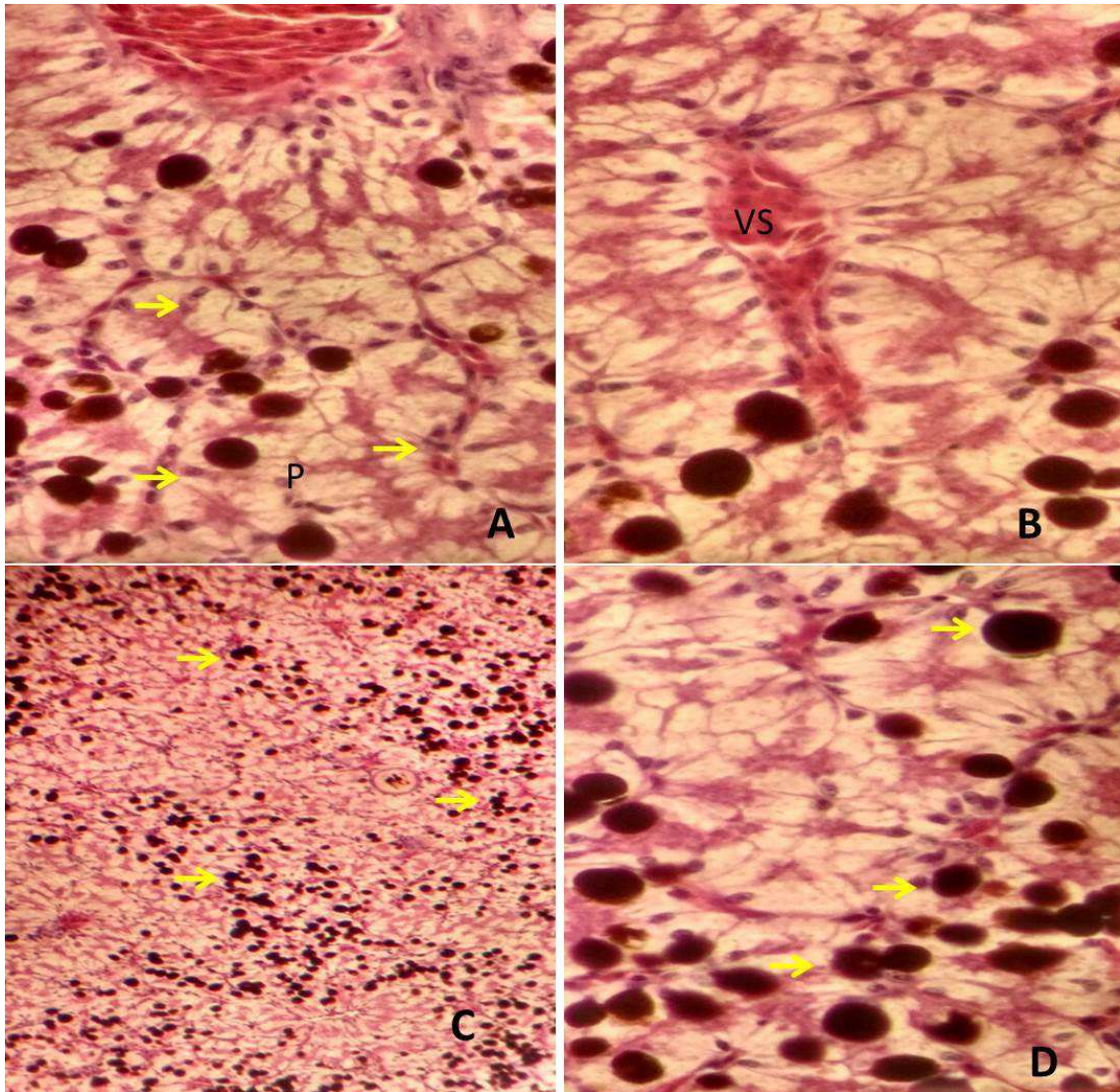


Figura 6. Análise histológica do fígado de *Leptodactylus macrosternum.s.* A- Parênquima (P) bem desenvolvido com hepatócitos (setas); B- Malha vascular com veias de vários calibres (VS); C- Células de Kupffer em grande quantidade (setas); D- Células de Kupffer em maior aumento (setas).

Tabela 5. Média±Desvio padrão das células de Kupffer do fígado de *Leptodactylus macrosternum* coletados no Horto Floresta Olho D'água da Bica, Cuité-PB entre os meses de maio e dezembro

Células de Kupffer (Média±Desvio Padrão)	
Lâmina 1	2,61±1,40a
Lâmina 2	2,67±1,58a
Lâmina 3	3,37±1,21a
Lâmina 4	4,52±1,31
Lâmina 5	3,22±2,46a
Lâmina 6	2,54±2,68a
Lâmina 7	2,19±0,82
Lâmina 8	3,60±3,11a
Lâmina 9	1,88±1,36
Lâmina 10	3,64±3,36a
Lâmina 11	2,60±1,39
Lâmina 12	3,22±3,46a
Lâmina 13	3,63±3,36a
Lâmina 14	2,20±0,81a
Lâmina 15	4,52±1,30a
Lâmina 16	5,05±1,92a
Lâmina 17	4,20±1,68a
Lâmina 18	4,21±1,69a
Lâmina 19	5,05±1,92a
Lâmina 20	4,20±1,68a
Lâmina 21	5,05±1,92a
Lâmina 22	4,20±1,92a
Lâmina 23	3,63±3,36a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

A análise dos dados histomofométricos das células de Kupffer do fígado de *L. macrosternum* mostram valores variando de 1,88±1,36 a 5,05±1,92. Contudo, só foi verificada variação significativa ($p < 0,05$) entre os indivíduos da lâmina 4 comparadas com as lâminas 7, 9 e 11.

6 DISCUSSÃO

Houve uma tendência de surgimento de *L. macrosternum* na área do HFODB, de acordo com o período chuvoso. O mês de junho apresentou o maior índice pluviométrico e o maior número de indivíduos coletados em campo, enquanto que nos meses de setembro e outubro apresentaram os menores índices e em contra partida não foram verificados indivíduos (Figura 4).

Vários anuros da caatinga demonstram uma tendência em ocorrer em períodos restritos do ano, condicionado principalmente pelas chuvas, tendo em vista que as larvas se desenvolvem apenas no meio aquático (VIEIRA et al. 2007). Este efeito decorrente das variações sazonais no surgimento e reprodução desses animais são bastante conhecidas, em várias populações, justificado pelo fato de que o índice de chuvas afeta o surgimento de poços o que interfere no número de indivíduos que se reproduzem nesse ambiente (MOREIRA & BARRETO, 1997).

Este padrão também foi encontrado em anuros de áreas de alto índice pluviométrico, como na floresta Amazônica e em áreas de mata atlântica no sudeste do Brasil, nas quais o fator físico que influenciou a reprodução de anuros foi à distribuição de chuvas e disponibilidade de corpos d'água (AICHINGER, 1987; BERTOLUCI, 1998; TOLEDO et al. 2003).

Não foi observado nesse estudo tendência no surgimento de mais machos ou fêmeas com relação a variações sazonais. A maior razão sexual desse estudo foi verificada no mês de junho, no qual o número de machos foi maior que o de fêmeas (Tabela 1), fato que pode estar relacionado ao maior índice de pluviosidade que ocorreu nesse mesmo mês. Em estudos sobre a dinâmica populacional de *Bufo schneideri* (Werner, 1894) e *Bufo rubescens* (Lutz, 1925) na região do cerrado brasileiro mostraram que a proporção de adultos do sexo masculino foi tendenciosa para ambas as espécies (VASCONCELLOS & COLLI, 2009), tendo em vista que os machos de bufonídeos são preponderantes em abundância em relação às fêmeas, porém esse fato é mais frequente nas espécies terrestres que nas espécies subaquáticas (ZUG & ZUG, 1979).

Outro fator que não divergiu significativamente entre os meses estudados foi o CRC de *L. macrosternum*, que variou entre 64,7mm e 89,1mm para machos e de 70,5mm e 76,3mm para fêmeas. Estes valores estão próximos aos encontrados para

esta mesma espécie em áreas de mata atlântica no estado da Bahia que apresentaram CRC máxima de 82.87mm e mínima de 79.83mm (SOEIRO, 2013) e em indivíduos encontrados no cerrado, que variaram de 9,2 a 76,6 mm (BRITO, 2011).

Os machos de *L. macrosternum* capturados no mês de dezembro apresentaram o maior peso corporal, diferenciando-se significativamente dos demais meses do estudo, enquanto que não houve significância no peso das fêmeas. O fato dos machos dessa espécie serem maiores e mais pesados nesse período pode estar relacionado ao fato de que anuros da família Leptodactylidae apresentam reprodução explosiva (BRASSALOTI et al., 2010), e, dessa maneira, há intensa competição entre machos, chegada sincrônica de machos e de fêmeas no sítio reprodutivo, razões sexuais operacionais altas e baixas oportunidades para seleção sexual por escolha realizada pelas fêmeas (ARAK 1983; OLSON et al. 1986). Portanto, tanto a competição como a escolha de fêmeas vêm mostrando correlação com a massa corporal nos anuros (LICHT 1976; ROBERTSON 1986) assim devido os anuros maiores conseguirem defender seus territórios por mais tempo, possibilita vantagens aos indivíduos pois lhes asseguram os recursos alimentares e locais mais propícios para reprodução (NARVAES & RODRIGUES, 2005).

O índice hepatossomático (IHS) expressa a porcentagem que o fígado representa no peso total dos indivíduos (RIBEIRO et al. 2007). Em relação à variação sazonal do IHS, as fêmeas apresentaram maiores valores em julho e os machos em agosto. Não foi observada relação com o período de chuvas, pois no mês de junho que apresentou o maior índice pluviométrico do estudo, as fêmeas apresentaram o menor IHS. Este índice, juntamente com o fator de condição (k) e o índice gonadossomático (IGS), têm sido utilizados como indicadores do período reprodutivo (RIBEIRO et al. 2007), entretanto, o IHS também pode estar relacionado com a mobilização das reservas energéticas necessárias para o processo de vitelogênese e preparação para o período de inverno (QUEROL et al., 2002).

Em peixes essa relação entre a época do ano e o IHS são bastante discutidas, a piranha *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837) apresentou uma relação do IHS com o período reprodutivo, nas quais tanto as fêmeas como os machos apresentaram menores valores no outono e inverno que podem ser decorrentes do gasto energético que a espécie sofreu durante o período reprodutivo

na primavera (FELIZARDO et al., 2010). Já para o cascudo *Loricariichthys platymetopon* (Isbrucker & Nijssen, 1979) o IHS não pode ser utilizado como indicador de período reprodutivo por apresentar seus maiores valores no outono (QUEROL et al. 2002). Neste caso, o IHS foi relacionado com o acúmulo de reservas energéticas para o período de inverno (QUEROL et al. 2002).

Portanto, o fato do menor IHS ter sido no mês de junho, pode estar relacionado com o gasto energético no período de maior pluviosidade, tendo em vista que foi o de maior abundância de indivíduos, fato que pode estar relacionado com a reprodução explosiva dessa espécie nesse mês.

O fígado de *L. macrosternum* apresentou o mesmo padrão morfológico de outros anuros. Divido em três lobos e localizado na cavidade abdominal associado a outros órgãos. Esta divisão também foi encontrada em anuros como *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863) (FRANCO-BELUSSI et al., 2012) e em peixes teleósteos (BRUSLE & ANADON, 1996; BOMBONATO et al., 2007). Os hepatócitos são células poliédricas, de grande conteúdo citoplasmático, núcleo central e um nucléolo proeminente, como apresentado em descrição de *E. nattereri* (FRANCO-BELUSSI et al., 2012)

O parênquima hepático nessa espécie apresentou-se bem desenvolvido constituído por uma malha vascular e tecido conjuntivo fibroso como encontrado em *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) (ROCHA et al. 2010). Já a disposição dos hepatócitos rodeando por capilares sinusóides foi encontrado em *Lithobates catesbeianus* (Dubois, 2006) (FENERICK JÚNIOR, 2008) divergindo do que foi encontrado em *E. nattereri* cujos hepatócitos estão dispostos em um cordão duplo formado por uma camada de células. (FRANCO-BELUSSI et al., 2012).

Estudos referentes à descrição morfométrica de fígados são escassas, o fato desses estudos serem raros dificulta a discussão e interpretação dos resultados acima descritos (HAAS, 2014). Entretanto, nos resultados apresentados neste trabalho pode-se perceber que não houve variação significativa na maioria dos indivíduos. De acordo com este trabalho, é clara a importância de mais estudos relacionada à histomorfometria de anuros.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve uma variação de acordo com os índices de chuva na população de *Leptodactylus macrosternum*, porém esta variação não foi significativa. Não houve correlação entre o surgimento de machos ou fêmeas de acordo com variações sazonais. Ocorreu diferença significativa no peso dos machos em determinados meses dentro do período de coleta e não houve variação significativa no peso das fêmeas. O maior valor de IHS se deu nas fêmeas, não foi observado relação do índice hepatossomático com o período de chuvas. Quanto à análise Histomorfométrica das lâminas, houve uma pequena variação das células de Kupffer. O fígado de *L. macrosternum*, é semelhante à maioria dos anuros e seus hepatócitos são de forma desordenada ao longo do tecido hepático.

REFERÊNCIAS

- AESA, Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado das Paraíba. Análise de Precipitação Mensal. 2013/2014. Disponível em: <<http://www.aesa.pb.gov.br/>> Acesso em: 04mar. 2015.
- AICHINGER, M. Annual activity patterns of anurans in a seasonal neotropical environment. **Oecologia**, 71(4). p.583-592. 1987
- ARAK, A. **Male-male competition and mate choice in anuran amphibians**. Pp. 181-210. In P. Bateson (Ed.), *Mate Choice*. Cambridge University Press, Cambridge. 1983.
- ARAUJO, O. C. et. al. Herpetofauna de um remanescente de cerrado no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotrop.** 2011, v11, n.3, pp. 47-62. In OLSON RJ, C. W., CHISHOLM S.W. 1986. Patterns of individual cell growth in marine centric diatoms. **J Gen Microbiol. In press.** 1986.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. (3), p.851- 864, 1999.
- BERTOLUCI, J. Annual patterns of breeding activity in Atlantic Rainforest anurans. **J. Herpetol.** 32(4):607-611. 1998.
- BRASSALOTI, R.A., ROSSA-FERES, D.C. & BERTOLUCI, J. Anuran fauna of the Semideciduous Forest of the Estação Ecológica dos Caetetus, Southeastern Brazil. **Biota Neotrop.** 10(1) 2010.
- BRITO, A. L. R. **Dieta de Leptodactylus macrosternum (Anura-Leptodactylidae) em áreas de restinga e manguezal na península de Ajuruteua, Bragança, Pará, Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Biologia, Bragança, Pará,-UFP, 2011.
- BOMBONATO, M.T.S.; et, al. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. *Acta Scientiarum – Biological Sciences*, v. 29, n. 1, p. 81-85, 2007.
- BRUSLÈ, J.; ANADON, G.G. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Ed.). *Fish morphology horizon of new research*. **Beirute: Science Publisher Inc.**, 16 p 1996.
- CASCON, P. **Observações sobre diversidade, ecologia e reprodução na anurofauna de uma área de caatinga**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 64p, 1987.
- CUEVAS, M.F. & R. MARTORI. 2007. Diversidad trófica de dos especies sintópicas del género *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) del sudeste de la provincia de Córdoba, Argentina. **Cuad. de Herp.** 21: 7-19.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1994.

FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S. et. al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 259-263, 2010.

FENERICK JUNIOR, J.; **Desempenho produtivo, hematologia e morfologia do tecido hepático de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, alimentada com ração contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios.** Tese doutorado - Universidade Estadual Paulista, 130 p, 2008.

FRANCO-BELUSSI, L.; et, al.; Liver Anatomy, Histochemistry, and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. **ZOOLOGICAL SCIENCE**, v. 29, n. 12, p. 844-848, 2012.

FREITAS, M. A. & SILVA, T.F.S. **Anfíbios na Bahia: um guia de identificação.** 60p. Il, 2004.

GEORGE, L. L.; CASTRO, R. R. L. **Histologia comparada.** 2. Ed. São Paulo: Roca, 1998.

GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores.** 2 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GUYTON, A.C., HALL, J.E.; **Tratado De Fisiologia Médica** 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002.

HAAS, L.S.; **Histomorfometria hepática como método para a predição de eficiência alimentar em bovinos de corte.** Monografia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 37p, 2014.

HEYER, W.R.; et. al. Measuring and monitoring biological diversity. **Standard methods for Amphibians.** Smithsonian Institution Press, Washington. 1994

HEYER, R.; et . 2010. *Leptodactylus latrans*. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2014.3. .

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. **Análise da estrutura dos vertebrados.** 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAJMANOVICH, R. C. **Dinámica trófica de juveniles de *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae), em una isla del Paraná, Santa Fe, Argentina.** **Cuadernos de Herpetología**, v. 10, p. 1-2, 1996.

LICHT, L.E. Sexual selection in toads (*Bufo americanus*). **Cano Jour. Zoo!**. 54: 1277-1284, 1976.

LEAL, I.R., TABARELLI, M. et.al. **Ecologia e conservação da caatinga**. 2^a ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005.

LOEBMANN D., MAI A.C.G., **List of species Amphibia, Coastal zone, state of Piauí, Northeastern Brazil**. Check List 4(2): p. 161-170, 2008.

MANEYRO, R. et. al., A Diet of the south American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Uruguay. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, n. 1, 2004.

MOREIRA, G & BARRETO, L.. **Seasonal variation in nocturnal calling activity of a savanna anuran community In central Brazil**. **Amphibia-Reptilia**. 18: 49-57. 1997.

NARVAES, P., & RODRIGUES, M. T. Visual communication , reproductive behavior , and home range of *Hylodes dactylocinus* (Anura , Leptodactylidae). **Phyllomedusa**, 4, 147–158, 2005.

OLIVEIRA, H. H. P.; SOUZA C.C.N et. al.; **Citogenética comparativa das famílias leptodactylidae e hylidae do cerrado goiano**. Goiânia, v.37, n. 9/10, p. 725-735, set./out, 2010.

PEREIRA, M. M. **Introdução à espermiacão e características seminais do anura nativo Rã-manteiga *leptodactylus ocellatus* e do exótico rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**. Tese de mestrado (Pós Graduação em biologia animal) - Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B. & MACFARLAND, W.N. 1993. **A vida dos vertebrados**. Atheneu editora, São Paulo.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), Bacia do Rio Uruguai Médio, Sul do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 92, n. 3, p. 79-84, 2002.

RIBEIRO, R.S.; EGITO, G.T.B.T.; HADDAD, C.F.B. Chave de identificação: Anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, estado de São Paulo- **Biota Neotropica**, v5 (n2), 2005.

RIBEIRO, J.R.I. A review of the species of *Belostoma* Latreille, 1807 (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae) from the four southeastern Brazilian States. **Zootaxa**, 1477:1-70, 2007.

RICKLEFS, R. E. & TRAVIS, J., A morphological approach to the study of avian community organization **The Auk** 97: 321-338, 1980.

ROBERTSON P.K. **Estimating in-situ soil permeability from CPT & CPTu**. Gregg Drilling & Testing Inc., Signal Hill, California, USA, 1986.

- ROCHA, R.M., et, al., Avaliação histopatológica do fígado de *brachyplatystoma rousseauxii* (CASTELNAU, 1855) da Baía do Guajará, Belém, Pará. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 101-109, jan./mar. 2010.
- RODRIGUES, M. T. Ecologia e Conservação da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Herpetofauna da caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. Capítulo 04. p. 181-236.
- SANABRIA, E. A.; QUIROGA, L. B.; ACOSTA, J. C. Dieta de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en un humedal del oeste de Argentina. **Revista Peruana de Biología**, v. 12. 2005.
- SAWAYA, R.J.; MARQUES, O.A.V. & MARTINS, M. 2008. Composição e história natural das serpentes de cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, 8(2):127-148.
- SHINE, R. **Australian Snakes: A Natural History**. Ithaca, Cornell University Press, 1995.
- SOLÉ, M.; DIAS, I.R.; RODRIGUES, E.A.S. et. al. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. **Herpetology Notes** v.2. 2009.
- STÉFANI, MV., NAKAGHI, LS. and URBINATI, EC. 2002. Alterações estruturais do fígado da rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) submetida a dietas contendo diferentes níveis de carboidratos. **Ars Veterinaria**, v 18, no. 1, p. 78-82.
- SOEIRO M.S. **Notas sobre a herpetofauna da ilha do Monte Cristo, Saubara, Bhaia**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em ciências biológicas), Universidade Federal da Bhaia, Bhaia, p 1-54, 2013.
- STRUSSMANN, C., et. al. Diet and foraging mode of *Bufo marinus* and *Leptodactylus ocellatus*. **Journal of Herpetology**, v. 18, n. 2, p. 138–146, 1984.
- TEIXEIRA, R. L. & VRCIBRADIC, D. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura; Leptodactylidae) from coastal lagoons of southeastern Brazil. **Cuadernos Herpetología**, v. 17, n. 1–2, p. 113–120, 2003.
- TOLEDO, L.F., ZINA, J. & HADDAD, C.F.B. Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de anfíbios anuros do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. **Holos Envir.** 3(2):136-149. 2003.
- VANZOLINI, P. E. Ecological and geographical distribution of lizards in Pernambuco, northeastern Brasil (Sauria). **Pap. Av. Zool.**, n. 28, p.61-90, 1974.
- VANZOLINI, P. E. On the lizards of a Cerrado-Caatinga contact: evolutionary and zoogeographical implications (Sauria). **Pap. Av. Zool.**, n. 29, p.111-119, 1976.
- VASCONCELLOS M.M. & COLLI G.R. Factors Affecting the Population Dynamics of Two Toads (Anura: Bufonidae) in a Seasonal Neotropical Savanna, **The American Society of Ichthyologists and Herpetologists**. *Copeia* 2009 (2):266-276. 2009.

VIEIRA, W.L. S.; ARZABE C. & SANTANA G.G. Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no cariri paraibano, nordeste do Brasil. **Oecol. Bras.**, 11 (3): 383-396, 2007 .

VIERTTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy viscera and endocrines. In: McDIARMID, R.W.; ALTING, R. **Tadpoles the biology of anuran larvae**. Chicago: University of Chicago, 1999.

VITT, L. J.; VANGLIDER, L. D. **Ecology of a snake community in northeastern Brazil. Amphibia-Reptilia**, n. 4, p. 273-296, 1983.

ZUG, G. R. & ZUG, P.B. The marine toad, *bufo marinus*: a natural history *resumé* of native populations. **Smithsonian Contributions to Zoology** 284: 1-58. 1979.

ANEXOS



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44134-1	Data da Emissão: 29/04/2014 13:34	Data para Revalidação*: 29/05/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: marcio frazao chaves	CPF: 035.782.934-40
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Leptodactylus macrosternum</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO BRASIL	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE	CNPJ: 05.055.128/0001-76

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e preparação do material biológico	05/2014	05/2014
2	Coleta e preparação do material biológico	06/2014	06/2014
3	Coleta e preparação do material biológico	07/2014	07/2014
4	Coleta e preparação do material biológico	08/2014	08/2014
5	Coleta e preparação do material biológico	08/2014	08/2014
6	Coleta e preparação do material biológico	09/2014	09/2014
7	Coleta e preparação do material biológico	10/2014	10/2014
8	Coleta e preparação do material biológico	11/2014	11/2014
9	Coleta e preparação do material biológico/ transporte de material para UFRPE	01/2015	01/2015
10	Coleta e preparação do material biológico	02/2015	02/2015
11	Coleta e preparação do material biológico	03/2015	03/2015
12	Coleta e preparação do material biológico	04/2015	04/2015
13	Coleta e preparação do material biológico/transporte de material biológico para UFRPE	05/2015	05/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45823892





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44134-1	Data da Emissão: 29/04/2014 13:34	Data para Revalidação*: 29/05/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: marcio frazao chaves	CPF: 035.782.934-40
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Leptodactylus macrosternum</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO BRASIL	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE	CNPJ: 05.055.128/0001-76

1	CUITE	PB	Lagoas temporárias e permanentes	Fora de UC Federal
---	-------	----	----------------------------------	--------------------

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Leptodactylus macrosternum</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Leptodactylus macrosternum</i>
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Leptodactylus macrosternum</i> (*Qtde: 72)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Sangue, Outras amostras biológicas(gÃ nadas, fÃ-gado e corpo gorduroso)
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	universidade federal rural de PE	colecão

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45823892





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44134-1	Data da Emissão: 29/04/2014 13:34	Data para Revalidação*: 29/05/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: marcio frazao chaves	CPF: 035.782.934-40
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Leptodactylus macrosternum</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO BRASIL	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE	CNPJ: 05.055.128/0001-76

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45823892





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44134-1	Data da Emissão: 29/04/2014 13:34	Data para Revalidação*: 29/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: marcio frazao chaves	CPF: 035.782.934-40
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Leptodactylus macrosternum</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), NORDESTE DO BRASIL	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE	CNPJ: 05.055.128/0001-76

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45823892

