

PONTÍFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados

Camila Menta Britto

Gametogêneses e atividade reprodutiva de *Scinax* aff. *perereca* (Anura, Scinaxinae) no
Parque das Mangabeiras, Minas Gerais, Brasil

Belo Horizonte, 30 de março de 2017

Camila Menta Britto

Gametogêneses e atividade reprodutiva de *Scinax* aff. *perereca* (Anura, Scinaxinae) no
Parque das Mangabeiras, Minas Gerais, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade
Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção de título de Mestre em Biologia de Vertebrados.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Barreto Nascimento

Belo Horizonte, 30 de março de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

B862g Britto, Camila Menta
Gametogêneses e atividade reprodutiva de *Scinax* aff. *perereca* (Anura, Scinaxinae) no Parque das Mangabeiras, Minas Gerais, Brasil / Camila Menta Britto. Belo Horizonte, 2017.
50 f.: il.

Orientadora: Luciana Barreto Nascimento
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados

1. Anfíbio - Belo Horizonte (MG) - Aspectos ambientais. 2. Gônadas - Maturação. 3. Anfíbio - Reprodução. 4. Anuro - Trópicos. I. Nascimento, Luciana Barreto. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 597.8

Camila Menta Britto

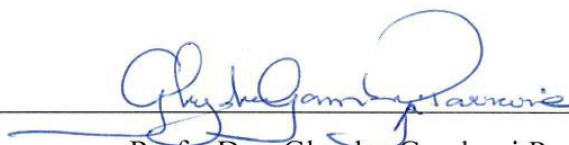
Gametogêneses e atividade reprodutiva de *Scinax* aff. *perereca* (Anura, Scinaxinae) no
Parque das Mangabeiras, Minas Gerais, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade
Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção de título de Mestre em Biologia de Vertebrados.

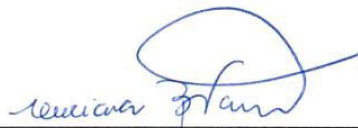
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos (Instituto Butantan)



Profa. Dra. Gleydes Gambogi Parreira (UFMG)



Profa. Dra. Luciana Barreto Nascimento (Orientadora PUC Minas)

Belo Horizonte, 30 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados pela oportunidade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIGAPQ 2067-14) e Fundação de Amparo à pesquisa da PUC Minas (FIP/PUC Minas) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

A Luciana B. Nascimento pela orientação, oportunidade, confiança, disponibilidade, paciência, carinho, amizade, conhecimento compartilhado e por todos os ensinamentos;

À Luciana B. Nascimentos e à Gleydes G. Parreira por me fornecer um material tão lindo e preservado. Estendo esse agradecimento a todos os coletores e colaboradores.

Ao Rubens Miranda e ao Rogério pela confecção das lâminas e pela dedicação.

Ao Parque Municipal das Mangabeiras e ao Santuário da Nossa Senhora da Piedade por toda hospitalidade e oportunidade.

Ao Carlos Felipe e a Líbia pela ajuda com material bibliográfico, ensinamentos e discussão de temas relacionados à reprodução de anuros.

Ao Nilo Bazzoli e José Enemir dos Santos pelo apoio acadêmico e ensinamentos histológicos e histoquímicos, ao Lucas Marcon, Fábio P. Arantes e Conrado Galdino pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas críticas e sugestões que certamente enriquecerão muito meu trabalho.

A todos os outros professores do programa por contribuírem para minha formação acadêmica e humana, à Cledma Rabelo por todo cuidado.

A Deus pelo seu amor por mim, pela vida, pelas oportunidades, por me permitir chegar até aqui.

A minha mãe pelo amor incondicional, carinho, dedicação e sacrifícios. A toda minha família pelo carinho, amor e paciência.

A todos os meus colegas do mestrado, em especial ao Lucas, Viviane, Jéssica, Cacau, Ítalo, Alice, Rúbia, Amadeus, Thais, Laís e Isabela, obrigada por todo apoio, incentivo e torcida.

Minha sincera gratidão a todos os meus amigos de laboratório de herpetologia Bia, Lucas, Pam, Libia, Stefânia, Gerson, Paula, Marina, Jordane, Iago e Verônica por sempre me ajudarem quando precisei e por serem grandes companheiros.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Temperatura média mensal (barras), umidade média mensal (linha pontilhada) e precipitação total mensal (linha contínua) de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil) de novembro de 1990 a outubro de 1991.....	17
Figura 2: Vista lateral dos testículos e corpos de gordura celomática de machos de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> indivíduo MCNAM20325.....	21
Figura 3: Células da linhagem espermato gênica de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i>	22
Figura 4: Estádios de maturação testicular encontrados nos indivíduos de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> corados por Hematoxilina-eosina.....	25
Figura 5: Vista ventral dos ovários de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i>	26
Figura 6: Células da linhagem ovogênica de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i>	28
Figura 7: Estádios de maturação dos ovários encontrados em <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> corados por Hematoxilina-eosina.....	30
Figura 8: Número de indivíduos nos diferentes estádios de maturação gonadal de machos (A) e fêmeas (B) de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> entre Novembro de 1990 e Outubro de 1991.....	33
Figura 9: Variação do índice gonadosomático (IGS) de machos e de fêmeas ao longo do ano (A e B, respectivamente) e com os estádios reprodutivos (C e D, respectivamente).....	34
Figura 10: Relação do índice hepatossomático (IHS) de machos e de fêmeas ao longo do ano (A e B), respectivamente e os estádios reprodutivos (C e D), respectivamente.....	35
Figura 11: Relação do volume testicular ao longo do ano (A) e com os estádios reprodutivos de machos (B).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Morfologia e morfometria dos túbulos seminíferos nos diferentes estádios de maturação testicular de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> (média, erro padrão e amplitude).....	24
Tabela 2: Morfologia e morfometria dos folículos em diferentes estádios de maturação ovariana de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> (média, erro padrão e amplitude).....	29
Tabela 3: Relação entre a massa corporal, massa testicular, massa dos corpos de gordura, IGS, IHS e volume testicular de machos de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> com a temperatura média mensal (°C), umidade média mensal (%) e precipitação total mensal (mm) (respectivamente, r^2 e p). *Valores significativos.....	31
Tabela 4: Relação entre a massa corporal, massa ovariano, massa dos corpos de gordura, IGS, IHS de fêmeas de <i>Scinax</i> aff. <i>perereca</i> com a temperatura média mensal (°C), umidade média mensal (%) e precipitação total mensal (mm) (respectivamente, r^2 e p). *Valores significativos.....	32

SUMÁRIO

<i>Resumo.....</i>	<i>11</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>12</i>
<i>Introdução.....</i>	<i>13</i>
<i>Materiais e métodos.....</i>	<i>17</i>
<i>Obtenção e processamento dos espécimes.....</i>	<i>17</i>
<i>Análise morfometria e histológica.....</i>	<i>18</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>19</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>21</i>
<i>Testículos e espermatogênese.....</i>	<i>21</i>
<i>Estádios de Maturação Testicular.....</i>	<i>24</i>
<i>Ovário e ovogênese.....</i>	<i>26</i>
<i>Estádios de Maturação Ovariana.....</i>	<i>29</i>
<i>Aspectos reprodutivos e variáveis ambientais.....</i>	<i>31</i>
<i>Atividade reprodutiva.....</i>	<i>35</i>
<i>Discussão.....</i>	<i>37</i>
<i>Conclusão.....</i>	<i>42</i>
<i>Referencias bibliográficas.....</i>	<i>43</i>

RESUMO

Estudamos a gametogênese e a reprodução de uma população de *Scinax* aff. *perereca* em área de transição de Mata Atlântica e Cerrado. Foram objetivos do presente estudo: (I) descrever a morfologia microscópica das gônadas; (II) determinar o padrão reprodutivo de *Scinax* aff. *perereca*; (III) avaliar os efeitos da temperatura, umidade e precipitação na atividade reprodutiva. Os animais foram coletados, mensalmente no período de Novembro de 1990 a Outubro de 1991, no Parque Municipal das Mangabeiras, em Belo Horizonte (MG). Amostras das gônadas de 194 machos e 41 fêmeas foram submetidas a análises microscópicas e histoquímicas. A morfologia gonadal de *Scinax* aff. *perereca* foi semelhante a indicada para outros hilídeos. Machos em estágio de maturação avançada foram encontrados em todos os meses e os machos em estágio esgotado, nos meses de Setembro a Abril, exceto Dezembro. Encontramos fêmeas com ovários em três estádios de maturação (inicial, intermediário e avançado) e parcialmente desovados. Os ovários parcialmente desovados apresentam porção flácida que corresponde à região de folículos vazios. A zona radiata dos ovócitos IV é espessa, o que permite inferir que a desova da espécie ocorra em locais de grande abrasão, ou seja, em ambientes lóticos. A união dos ovos pode ser mantida pelas sialomucinas produzidas pelas células foliculares. Não houve efeito das variáveis ambientais sobre a atividade reprodutiva. Com base na presença de fêmeas em estágio parcialmente desovados e machos em estágio esgotado nos meses de Setembro a Abril, consideramos que *Scinax* aff. *perereca* possui padrão reprodutivo prolongado, ou seja final da estação seca, estação chuvosa e início da estação seca.

Palavras-chaves: reprodução, maturação gonadal, região neotropical, variação sazonal.

Abstract

We studies on gametogenesis and reproduction of a population of *Scinax* aff. *perereca* in transition area of Atlantic Forest and Cerrado. Objectives of the present study: (I) to describe the microscopic morphology of the gonads; (II) determine the reproductive pattern of *Scinax* aff. *perereca*; (III) evaluation of the effects of temperature, humidity and precipitation on reproductive reproduction. The animals were collected monthly from November 1990 to October 1991, at Mangabeiras Municipal Park, in Belo Horizonte (MG). Samples of the gonads of 194 males and 41 females submitted to microscopic and histochemical analysis. The gonadal morphology of *Scinax* aff. *perereca* was an indication for other hílideos. Males in maturation stage were found in all months and males in depleted stage, from September to April, except December. We found females with ovaries in three stages of maturation (initial, intermediate and advanced) and partially spawned. Partially spawned ovaries presented a flaccid region corresponding to the empty follicles region. The radiata zone of the oocytes IV is thick, which allows inferring that a spawning of the species occurs in places of great abrasion, this is lotic environment. The union of the eggs can be keep by the sialomucinas produced by follicular cells. There was no effect of environmental variables on a reproductive activity. Based on the presence of partially spawned males and depleted males from September to April, we consider that *Scinax* aff. *perereca* has an extended breeding pattern, dry season, rainy season and early dry season.

Keywords: reproduction, gonadal maturation, neotropical region, seasonal variation.

Introdução

A ordem Anura, dentre os tetrápodes, apresenta a maior diversidade de estratégias reprodutivas (Duellman e Trueb 1994; Haddad e Prado 2005). Essa diversidade pode ser explicada pela grande variabilidade de atributos morfológicos, fisiológicos e comportamentais do grupo (Pombal e Haddad 2005), bem como pela influência dos fatores abióticos (umidade, temperatura, precipitação, sazonalidade, dentre outros), pois são ectotermos, e a seleção sexual (Ferreira *et al.* 2008). O sucesso reprodutivo dos anuros, bem como dos demais vertebrados, depende da capacidade de adaptar seu ciclo reprodutivo ao ambiente em que vivem. Considerando que qualquer ambiente habitável apresenta algum tipo de flutuação, esta adaptação requer um controle do ciclo reprodutivo para produzir uma prole na época do ano mais propícia para a sobrevivência da mesma. Este controle do ciclo reprodutivo envolve que percebam as mudanças do ambiente e modifiquem sua fisiologia de acordo com elas, sendo esta capacidade acompanhada de modulação neuroendócrina (Callard *et al.* 1978). No caso das espécies de regiões tropicais, onde as condições ambientais para os anuros são propícias, os ciclos reprodutivos tendem a ser contínuos ou potencialmente contínuos, perdurando ao longo da estação chuvosa (Prado *et al.* 2004; Wells 2007).

O comportamento reprodutivo dos anuros pode ser dividido em dois padrões: prolongado e explosivo. O padrão prolongado abrange períodos de mais de um mês podendo perdurar o ano todo, enquanto o padrão explosivo refere-se a períodos de reprodução de alguns dias a algumas semanas (Wells 1977; Wells 2007). Pressões seletivas favorecem o padrão prolongado ou explosivo, como fatores abióticos (temperatura e pluviosidade), fatores ecológicos (competições de larva-predador), fatores demográficos (tamanho da ninhada, frequência de reprodução individual das fêmeas) (Wells 1977) e modos reprodutivos (local de deposição dos ovos, característica dos ovos, duração do desenvolvimento, cuidado parental) (Haddad e Prado 2005).

Em anfíbios que apresentam padrão reprodutivo prolongado, a manutenção da massa testicular, pode estar relacionada com alterações compensatórias no volume dos componentes testiculares ao longo do ano (Sasso-Cerri *et al.* 2004). Alterações no volume testicular podem indicar os diferentes estádios de maturação, como apresentado para lagartos (Vieira *et al.* 2001; Van Sluys *et al.* 2004), peixes Siluriformes (Santos *et al.* 2006) e para anuros (Santos *et al.* 2011; Sasso-Cerri *et al.* 2004).

Estudos que contemplem análises sobre a morfologia e histologia de gônadas de anuros são importantes para compreender a dinâmica reprodutiva e sua relação com fatores endógenos e exógenos, além de determinar com maior eficácia o período em que a espécie está reproduzindo, subsidiando os conhecimentos ecológicos e comportamentais da espécie (Melchior *et al.* 2004; Santos e Oliveira 2007; Ferreira *et al.* 2008). Durante a gametogênese as características morfológicas da espermatogênese e ovogênese podem variar entre os táxons, sendo que estas características podem também constituir informações importantes para estudos de filogenia e sistemática de anuros (Ogielska e Kotusz 2004).

Nos anfíbios, a diferenciação sexo-gonadal ocorre geralmente durante a fase larval, no momento da metamorfose (Ogielska e Kotusz 2004; Haczkiwicz e Ogielska 2013). Nos testículos destes animais ocorre a formação de cistos que são compostos por células da linhagem espermatogênica, em geral em mesmo estágio de desenvolvimento, delimitadas por projeções citoplasmáticas das células de Sertoli (Lofts 1974; Duellman e Trueb 1986). Os ovários são compostos por folículos contendo células ovogênicas em diversas fases germinativas. Enquanto as ovogônias são encontradas esporadicamente em ninhos na periferia do órgão, ovócitos em diferentes estádios compõem os ovários quase totalmente. Estas células ovogênicas são envolvidas por zona radiata, células foliculares, membrana basal e a teca conjuntiva, que conjuntamente compõem o folículo ovariano (Lofts 1974; Oliveira e Santos 2004; Prado *et al.* 2004).

Considerando que alterações morfofuncionais normalmente ocorrem nos componentes testiculares de anfíbios, alguns parâmetros morfométricos podem ser úteis como indicativos de fases distintas do ciclo reprodutivo. Em vertebrados de reprodução sazonal, o índice gonadosomático (IGS) é utilizado como parâmetro indicativo de atividade testicular durante o ciclo reprodutivo (Rastogi *et al.* 1978; Delgado *et al.* 1989; Guarino *et al.* 1993). Este índice fornece informações sobre regressão testicular e é utilizado como indicação do período de acasalamento (Sasso-Cerri *et al.* 2004). Como indicativo do estado funcional dos ovários, frequentemente tem-se reportado ao índice gonadosomático, uma vez que este expressa a porcentagem que as gônadas representam da massa total ou da massa corporal dos indivíduos (Vazzoler 1996). No caso dos anuros, assim como em peixes, ovócitos em estádios avançados, tendem a ser mais pesados, devido ao intenso acúmulo de vitelo (Costa *et al.* 1998a).

Durante a espermatogênese, o parênquima hepático dos anuros possui várias funções, como a produção de ligações esteróides, proteínas e a formação e

armazenamento de lipídios e carboidratos, ambos utilizados para a atividade metabólica dos testículos e durante a degradação dos hormônios esteróides (Kao *et al.* 1993). De acordo com Costa (1991), a variação da alimentação, como também de hormônios sexuais, reflete no índice hepatossomático (IHS), que tem sido utilizado como indicador do período pré reprodutivo (Rastogi *et al.* 1978). Em indivíduos adultos de rã touro, principalmente no período de reprodução, o fígado sintetiza e secreta o precursor das proteínas do vitelo, a vitelogenina, que é transportada até as gônadas via corrente sanguínea, para participar da formação das gônadas (Costa *et al.* 1991).

Na literatura existem muitos estudos de biologia reprodutiva de anuros utilizando informações sobre local de deposição de ovos e estratégias reprodutivas (e.g. Prado *et al.* 2004; Haddad e Prado 2005; Pombal e Haddad 2005), ou indicando a ocorrência de evento reprodutivo devido a observação de amplexo (e.g. Canelas e Bertoluci 2007; Galdino *et al.* 2008; Pirani *et al.* 2013), visualização das gônadas a partir da transparência da pele do abdômen (e.g. Galdino *et al.* 2008; Pirani *et al.* 2013) e vocalização (e.g. Canelas e Bertoluci 2007; Galdino *et al.* 2008; Pirani *et al.* 2013). Entretanto, estudos morfológicos e histológicos das gônadas são escassos na região tropical (e.g. Oliveira *et al.* 2002; Prado *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2007; Santos e Oliveira 2008; Ferreira *et al.* 2009; Santos *et al.* 2011; Ferreira e Mehanna 2012; Villagra *et al.* 2012; Leite *et al.* 2015) e mais escassos ainda sobre da sub família Scinaxinae, (Frost *et al.* 2017), sendo que apenas duas espécies foram estudadas *Scinax fuscovarius* e *S. fuscmarginatus* (e.g. Oliveira e Andrade 1997; Oliveira e Vicentini 1998; Oliveira *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2004; Rodrigues *et al.* 2005; Toledo e Haddad 2005; Goldberg 2014).

Dentre os anuros, a família *Hylidae* contém a maior diversidade de espécies entre os anfíbios (Frost *et al.* 2016). É um grupo considerado monofilético e composto por sete subfamílias, 49 gêneros e 692 espécies (Frost *et al.* 2016; Duellman *et al.* 2016). *Scinax* aff. *perereca* é uma espécie desta família, que está em processo de descrição, sendo associada à subfamília Scinaxinae (Nascimento *et al.* in prep.).

Scinax aff. *perereca* possui sua distribuição geográfica nas áreas elevadas das Serras do Espinhaço e Mantiqueira, estado de Minas Gerais (Galdino *et al.* 2008; Nascimento *et al.* in prep.). Ocorre no Parque Municipal das Mangabeiras, município de Belo Horizonte (Galdino *et al.* 2008; Nascimento *et al.* in prep.), na Serra da Piedade, município de Caeté (Glauss *et al.* in prep), Serra do Caraça, município de Catas Altas (Afonso e Eterovick 2007; Canelas e Bertoluci 2007), Floresta Estadual do Uaimií

(FLOE Uaimií), município de Ouro Preto (Pirani *et al.* 2012). Poucas são as informações sobre história natural desta espécie. Canelas e Bertoluci (2007) indicam que, na Serra do Caraça, *S. aff. perereca* foi registrada, com base em abundância de vocalização, no período chuvoso, nos meses de outubro, novembro, janeiro, fevereiro e março. A ocorrência de amplexo e de fêmeas grávidas foi registrada apenas no mês de outubro (Canelas e Bertoluci 2007). Pirani *et al.* (2012) indicaram, com base em vocalização, que a espécie ocorre no período chuvoso, nos meses de novembro e janeiro, classificando-a como de padrão reprodutivo prolongado.

A chuva e a temperatura não afetaram a ocorrência da espécie nos microambientes do Parque das Mangabeiras (município de Belo Horizonte), provavelmente porque estes fatores abióticos tiveram pouca variação, em estudo realizado por Galdino *et al.* (2008). Todas as fêmeas registradas, nos meses de outubro, dezembro, fevereiro e abril, possuíam ovócitos na cavidade abdominal, visualizados a partir da transparência da pele do abdômen (Galdino *et al.* 2008).

Considerando que as informações sobre a biologia reprodutiva de *Scinax aff. perereca* ainda são incipientes, e não tratam da morfologia das gônadas, este estudo teve como objetivo analisar a biologia reprodutiva a partir dos ciclos reprodutivos de machos e fêmeas. Desta forma, foram objetivos específicos do presente estudo (I) descrever a morfologia microscópica das gônadas; (II) determinar o padrão reprodutivo de *Scinax aff. perereca*; e (III) avaliar os efeitos da temperatura, umidade e precipitação sobre a atividade reprodutiva

Materiais e métodos

Obtenção e processamento dos espécimes

Os espécimes de *Scinax* aff. *perereca* analisados foram coletados, mensalmente de novembro de 1990 a outubro de 1991, no Parque Municipal das Mangabeiras (PMM) (19°55'57"S e 43°56'32"W, 800 a 1.000m de altitude). O parque ocupa uma área de 2.350.000m² e um perímetro de 8.000m, localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, no sudeste do Brasil (Galdino *et al.* 2008) e constitui um fragmento de mata secundária urbana transição entre floresta semidecidual (Mata Atlântica *lato sensu*) e Cerrado (Nascimento *et al.* 2001; Galdino *et al.* 2008). O principal riacho do Parque é o Córrego da Serra que possui lagos artificiais (Galdino *et al.* 2008), onde os exemplares deste estudo foram coletados.

Os dados climáticos da região estudada foram obtidos no 5º Distrito de Belo Horizonte, Minas Gerais. Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (Fig.1). De novembro de 1990 a outubro de 1991 a temperatura média anual foi 22.1°C (19.2-25.1°C). A umidade média anual foi 66.7% (54.4-81.2%) e a precipitação total teve média anual de 145.1mm (0.0-651.2mm). O clima nos trópicos é determinado pela oscilação da chuva tropical ao longo do ano, sendo dividido em dois períodos, de chuva (outubro-março) e o de seca (abril-setembro).

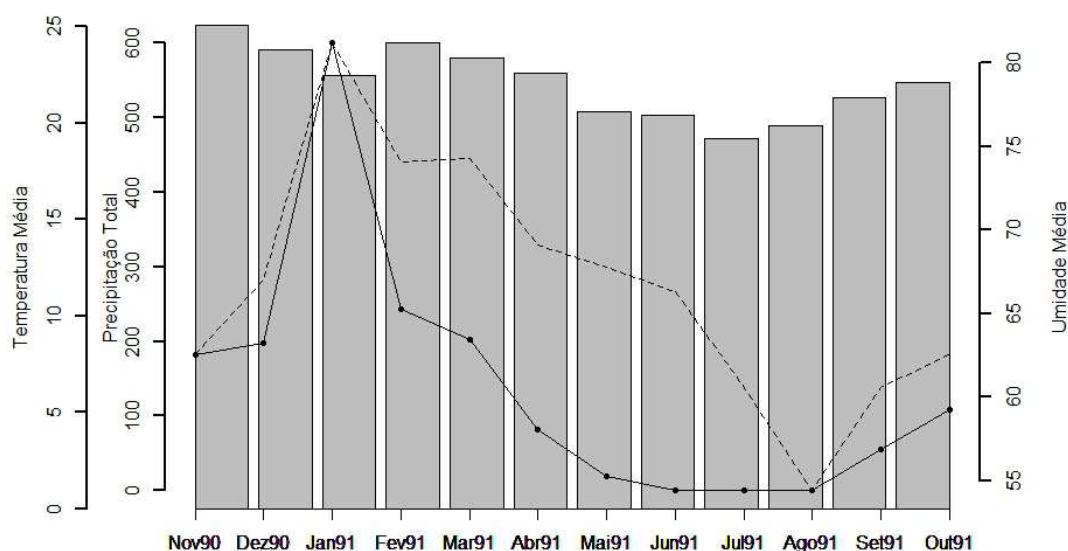


Figura 1: Temperatura média mensal (barras), umidade média mensal (linha pontilhada)

e precipitação total mensal (linha contínua) de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil) de novembro de 1990 a outubro de 1991.

Adicionalmente realizamos campanhas em 2016 para coleta de indivíduos para a análise macroscópica das gônadas (macho MCNAM20325) e documentação fotográfica em outras localidades próximas, como a Serra da Piedade (19°49'9"S 43°40'38"W, 1720m de altitude) no município de Caeté, Minas Gerais. As coletas foram realizadas principalmente no período noturno, que corresponde ao período de atividade da espécie estudada. Coletamos os animais sob permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio; licença nº 37266-2). Os indivíduos capturados foram eutanasiados com aplicação de lidocaína (Sebben 2007). A maioria dos exemplares utilizados neste estudo estão depositados na coleção de herpetologia do Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (tombados em um lote MCNAM20434 e fêmea MCNAM4627).

Análise morfométrica e histológica

Para cada exemplar coletado foram tomadas medidas do comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa do corpo (PM), fígado (PF), gônadas (PG) e corpos de gordura (CG). A morfologia macroscópica foi descrita a partir da coloração, formato e posição das gônadas. As gônadas de indivíduos de ambos os sexos foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e conservadas em álcool a 70%. As amostras foram incluídas em parafina e, posteriormente, cortes histológicos de cinco micrômetros foram montados em lâminas de vidro e corados em hematoxilina-eosina (HE). Para determinar o conteúdo histoquímico de proteínas e carboidratos na zona radiata e células foliculares dos ovócitos, foram utilizadas as seguintes técnicas: ácido periódico Schiff (PAS), Alcian Blue (AB) pH 2.5 e pH 0.5.

As gônadas foram analisadas quanto aos estádios de maturação para determinação do ciclo reprodutivo. A caracterização morfológica das estruturas foi realizada microscopia de luz. Parâmetros morfométricos histológicos foram tomados com auxílio de ocular micrométrica acoplada a microscópio de luz e do software Motic® e as fotografias foram registradas com câmera acoplada ao microscópio de luz e do software Olympus CellSens.

Os estádios de espermatogênese foram descritos através de parâmetros morfométricos, características morfológicas e fase da divisão celular das células germinativas a partir de análises histológicas das gônadas. Analisamos e classificamos os estádios de desenvolvimento das células espermatogênicas, baseados em Costa *et al.* (1998b), Santos *et al.* (2002), Oliveira e Santos (2008) e Leivas *et al.* (2012). Para calcular o diâmetro dos túbulos seminíferos dividimos o corte histológico em cinco campos diferentes. Utilizamos assim, quatro campos na extremidade e um campo central no corte. Mensuramos o diâmetro de três túbulos seminíferos em cada campo (quatro nas extremidades e um no centro do campo) totalizando 15 túbulos por indivíduos independente do estágio de maturação. A partir do estágio de maturação dos túbulos foi feita a caracterização dos estádios de desenvolvimento gonadal, o estágio que apresentou mais túbulos foi utilizado para caracterizar o estágio de maturação gonadal. Foram utilizados de sete a 24 indivíduos por mês. Posteriormente, para os parâmetros morfométricos individuais de cada célula da linhagem espermatogênica, medimos os diâmetros nucleares de 80 células.

Os estádios de desenvolvimento das células ovogênicas foram analisados e classificados baseados em Ogielska e Kotuzs (2004) e Oliveira e Santos (2004). Para calcular o diâmetro dos ovócitos dividimos o corte histológico em cinco campos diferentes. Utilizamos assim, quatro campos na extremidade e um campo central no corte. Mensuramos o diâmetro de três ovócitos em cada campo (quatro nas extremidades e um no centro do campo) totalizando 15 ovócitos por indivíduos independente do estágio de maturação. A partir do estágio de maturação desses ovócitos foi feita a caracterização dos estádios de desenvolvimento gonadal, o estágio que apresentou mais túbulos foi utilizado para caracterizar o estágio de maturação gonadal. Foram utilizados de 0 a 10 indivíduos por mês. Posteriormente, para os parâmetros morfométricos individuais de cada célula da linhagem ovogênica, medimos os diâmetros nucleares de 80 células. Determinamos também, a espessura da zona radiata e a altura das células foliculares de 30 ovócitos em III e de 30 em VI (6-10 indivíduos diferentes) adaptado de Lima (2013).

Análise estatística

Para verificar a normalidade dos dados, utilizamos o teste Shapiro-Wilk. Análise estatística descritiva (média, erro padrão e amplitude) foi realizada para

descrição das gônadas e células das linhagens espermatogênica e ovogênica. O volume testicular médio por indivíduo foi calculado a partir da fórmula: $(4/3)\pi(C/2)(L/2)^2$, onde C representa o comprimento e L a largura do testículo (Pizzatto e Marques 2002).

Foi utilizada uma correlação de Spearman para testar a relação entre a temperatura média mensal (°C), umidade média mensal (%) e precipitação total mensal (mm) com a atividade reprodutiva de *Scinax aff. perereca*. Desta forma, as variáveis de resposta de cada sexo (massa das gônadas, massa dos corpos de gordura, IGS, IHS e volume testicular) foram relacionadas com a temperatura, umidade e precipitação.

O índice gonadosomático (IGS), que estabelece uma relação entre a massa das gônadas e a massa corporal do indivíduo, foi calculado conforme a fórmula: $IGS = PG/PM \times 100$, onde PG representa a massa da gônada e PM, massa corporal (Costa *et al.* 1998a; Leivas *et al.* 2012). O IGS foi calculado para cada indivíduo e analisado separadamente para cada sexo.

O índice hepatossomático (IHS) estabelece uma relação entre a massa do fígado e a massa corporal do indivíduo. Para calcular o índice hepatossomático foi utilizada a fórmula: $IHS = PF/PM \times 100$, onde PF representa a massa do fígado e PM, massa corporal (Vazzoler 1996). O IHS foi calculado para cada indivíduo e analisado separadamente para cada sexo.

Aplicamos o teste de Kruskal-Wallis para avaliar o efeito entre o período de chuva (outubro-março) e o período de seca (abril-setembro) no volume testicular, IGS e IHS de machos e fêmeas. A tabulação dos dados foi realizada com auxílio do software Excel (2007) e a confecção dos gráficos e os testes estatísticos foram feitos na plataforma estatística R (R Development Core Team. 2016). O nível de significância foi considerado para $p \leq 0.05$.

Resultados

Testículos e espermatogênese

Foram coletados 194 machos todos os meses de novembro de 1990 a outubro de 1991. O comprimento rostro-cloacal (CRC) médio foi de 36.0mm (± 0.02 ; 17.3-55.3mm). A massa corporal (PM) média dos machos foi de 5.3g (± 0.1 ; 3.5-10.0g). Os testículos de *Scinax* aff. *perereca* são órgãos pares localizados na região dorsal da cavidade peritoneal, em uma posição ventral aos rins, sendo que o esquerdo posiciona-se ligeiramente mais cranial que o direito (Fig. 2). Os testículos são elipsóides, sem lóbulos aparentes e sua coloração é branco leitosa. Apresentaram comprimento médio de 0.60mm (± 0.14 ; 0.06-1.63mm) e largura média de 0.23mm (± 0.06 ; 0.02-0.59). Estão conectados a cavidade abdominal por intermédio do mesórquio. O massa testicular média foi de 18.2mg (± 1.2 ; 3.0-45.0mg) e o volume testicular médio foi de $18.1\mu\text{m}^3$ (± 2.1 ; 0.1-120.3 μm^3). Verificamos em alguns indivíduos a ocorrência de corpos de gordura associados à porção cranial do testículo (Fig. 4). Estes corpos de gordura são digitiformes, de cor branco leitosa, com massa média correspondente a 0.02mg (± 0.01 ; 0.0-0.9mg). Os testículos não apresentaram diferenças morfológicas macroscópicas nos diferentes estádios de maturação gonadal.

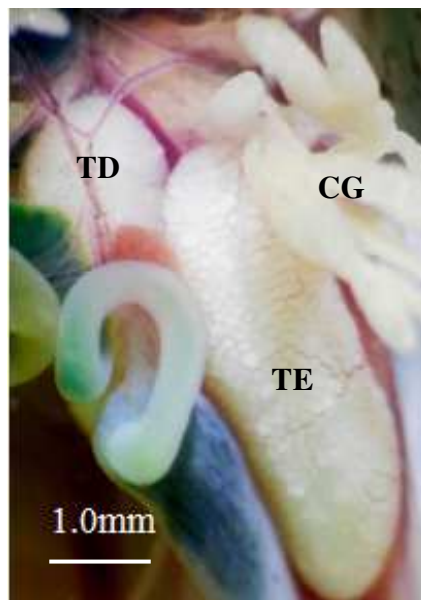


Figura 2: Vista ventral dos testículos e corpos de gordura celomática de machos de *Scinax* aff. *perereca* indivíduo MCNAM20325 CG- corpos de gordura celomática; TD- testículo direito; TE- testículo esquerdo. Aumento de 20x. Barra=1.0mm.

No interior dos testículos, estão presentes túbulos seminíferos que são estruturas enoveladas e envoltas por tecido conjuntivo. Eles apresentaram cistos de células da linhagem espermato gênica em diversos estádios de diferenciação, sendo que em cada cisto as células se encontram no mesmo estágio (Fig. 3). Essas células apresentaram morfometria diferenciada.

Dois tipos de espermatogônias foram observados nos túbulos seminíferos de *Scinax* aff. *perereca*. As espermatogônias I apresentaram diâmetro médio de 20.0µm (± 3.7 ; 10.8-27.3µm), constituem as maiores células visualizadas, sendo encontradas isoladamente na periferia dos túbulos seminíferos, possuem núcleo multilobulado e levemente basófilo. As espermatogônias II apresentaram diâmetro médio de 10.2µm (± 2.1 ; 6.2-16.2µm), formam pequenos cistos fortemente basófilos na periferia dos túbulos e possuem núcleo multilobulado e basófilo.

Os espermatócitos I apresentaram diâmetro médio de 10.4µm (± 2.0 ; 5.8-15.4µm), formam cistos grandes e populosos e apresentam núcleo esférico e basófilo. Os espermatócitos II apresentaram diâmetro médio de 8.0µm (± 1.4 ; 5.2-11.8µm), formam cistos maiores e mais populosos do que os cistos de espermatócitos I, possuem núcleo esférico e basófilo.

As espermátides arredondadas apresentaram diâmetro médio de 6.1µm (± 1.1 ; 3.3-10.1µm), são pequenas e podem ou não estar dentro de cistos, possuem núcleo fortemente basófilo. As espermátides alongadas formam feixes de células paralelas voltadas para células de Sertoli. Não foi possível medir o diâmetro das espermátides longas e espermatozóides. Os espermatozóides apresentam núcleo bastante alongado fortemente basófilo, o flagelo tem um aspecto filamentososo e é intensamente acidófilo. Os espermatozóides ficam acumulados no lúmen dos túbulos seminíferos.

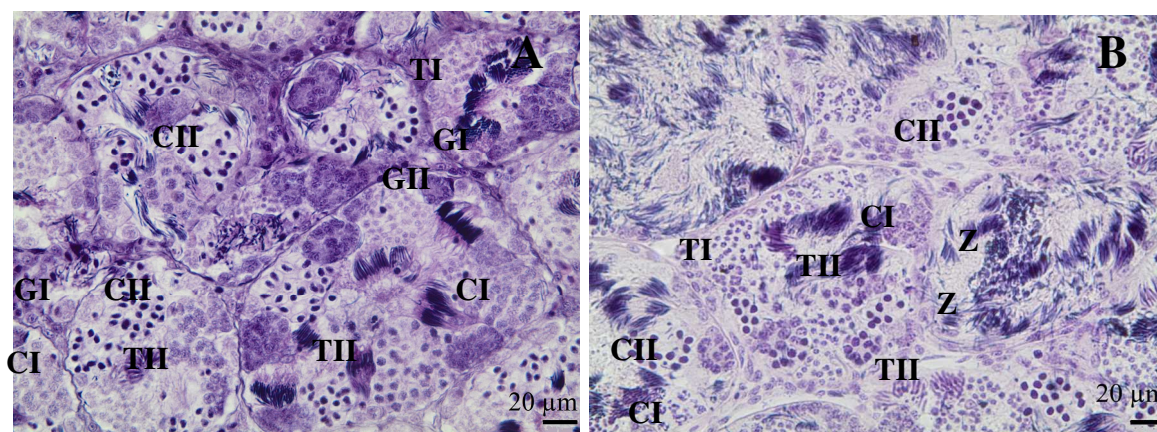


Figura 3: Células da linhagem espermato gênica de *Scinax* aff. *perereca*: espermatogônia I (GI), espermatogônia II (GII), espermatócito I (CI), espermatócito II

(CII), espermatíde arredondada (TI), espermatíde alongada (TII) e espermatozóide (Z).
Aumento de 200x. Barra=20.0 μ m.

Estádios de maturação testicular

Os testículos analisados apresentaram os seguintes estádios de maturação (Tab. 1): início da maturação, estágio 2 (n=16 indivíduos); maturação intermediária, estágio 3 (n=87 indivíduos); maturação avançada, estágio 4 (n=78 indivíduos); e esgotado, estágio 5 (n=13 indivíduos). Estes estádios são apresentados na Figura 4.

Tabela 1: Morfologia e morfometria dos túbulos seminíferos nos diferentes estádios de maturação testicular de *Scinax* aff. *perereca* (média, erro padrão e amplitude).

Estádio	Morfologia dos túbulos	Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm)	Volume dos túbulos seminíferos (μm^3)
Início da Maturação (estádio 2)	Cistos de espermatogônias I e II e espermatócitos I e II.	255.97 (± 11.56 ; 202.75-356.60)	0.04 (± 0.00 ; 0.02-0.06)
Maturação intermediária (estádio 3)	Cistos de espermatogônias e espermatócitos I e II, muitos cistos de espermatídes, presença de poucos espermatozóides.	271.55 (± 3.35 ; 191.53-362.17)	0.05 (± 0.00 ; 0.01-0.11)
Maturação Avançada (estádio 4)	Poucos cistos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes, mas muitos espermatozóides livres.	272.30 (± 3.89 ; 177.01-373.91)	0.05 (± 0.01 ; 0.01-0.13)
Esgotado (estádio 5)	Poucos cistos em diferentes fases de desenvolvimento. Lúmen amplo dos túbulos com espermatozóides residuais.	267.72 (± 11.94 ; 183.99-347.27)	0.05 (± 0.01 ; 0.01-0.09)

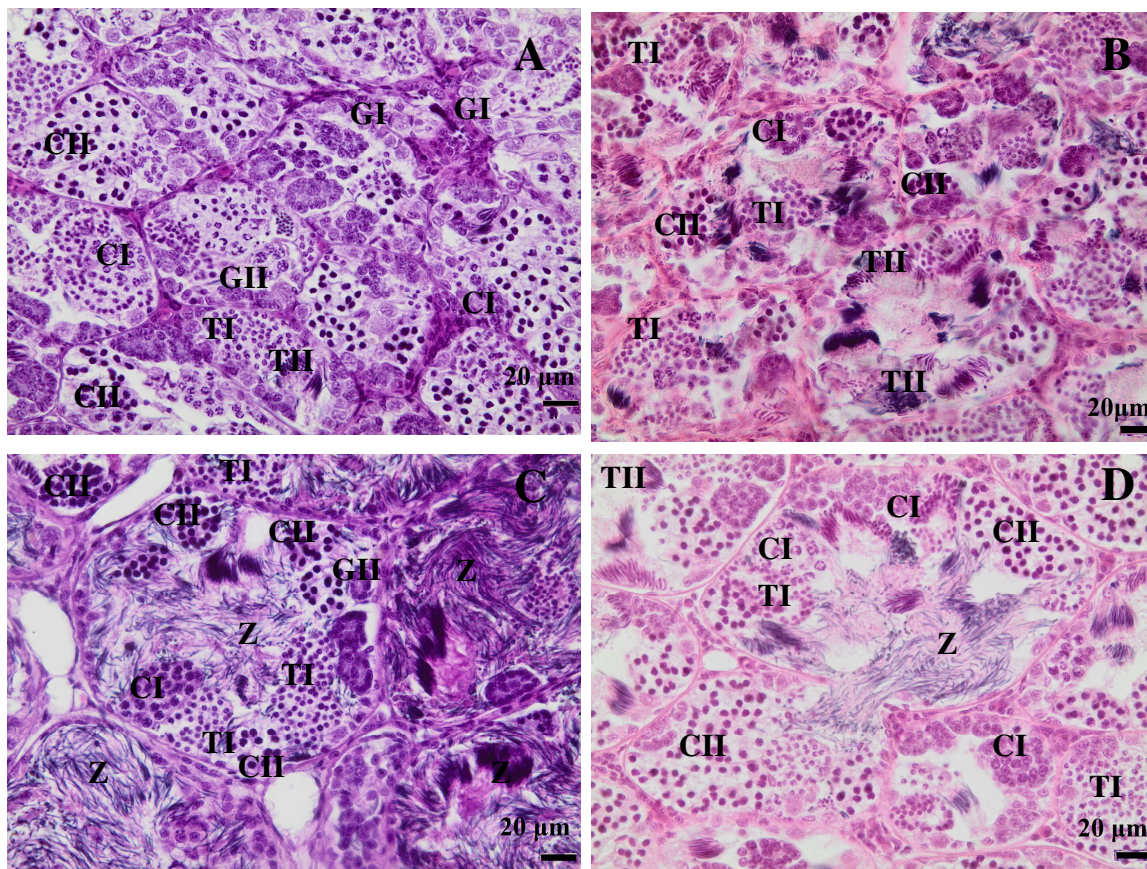


Figura 4: Estádios de maturação testicular encontrados nos indivíduos de *Scinax* aff. *perereca* corados por Hematoxilina-eosina. A: início da maturação, estágio 2. B: maturação intermediária, estágio 3. C: maturação avançada, estágio 4. D: esgotado, estágio 5. Espermatogônia I (GI), espermatogônia II (GII), espermatócito I (CI), espermatócito II (CII), espermatíde arredondada (TI), espermatíde alongada (TII) e espermatozóide (Z). Aumento de 200x. Barra=20.0µm

Ovário e ovogênese

Foram coletadas 41 fêmeas no período de novembro de 1990 a outubro de 1991. Fêmeas não foram encontradas em maio, junho e outubro. A média do comprimento rostro-cloacal (CRC) das fêmeas foi de 39.2mm (± 0.02 ; 33.6-49.0mm) e da massa corporal (PM) de 6.9g (± 0.1 ; 5.0-10.0g). Os ovários de *Scinax* aff. *perereca* são órgãos pares, localizados ventralmente aos rins e dorsalmente ao tubo digestório (Fig. 5), revestidos por fina camada de peritônio, que delimita quatro a seis lóbulos ovarianos. Em estádios de desova parcial, eles apresentavam cranialmente lóbulos flácidos, ou seja, com aspecto transparente e hemorrágico. A massa média do ovário foi de 84.7mg (± 20.4 ; 10.0-965.0mg). Ovários pequenos e imaturos apresentavam ovócitos completamente despigmentados e ovários maiores e maduros apresentavam ovócitos com pigmentação. Assim, a coloração dos ovários, que tem parede transparente, é determinada pela coloração dos ovócitos que são bicolores, com uma região pigmentada mais escura, que variou do marrom ao preto e outra não pigmentada, tendo a cor amarela correspondendo aos grãos de vitelo. Corpos gordurosos ou adiposos podem estar aderidos à porção cranial dos ovários e apresentaram massa média de 0.02mg (± 0.01 ; 0.0-0.20mg).



Figura 5: Vista ventral dos ovários de *Scinax* aff. *perereca*. F- fígado; E- estômago; I- intestino; OD- ovário direito; OE- ovário esquerdo; OI – ovócitos em estádios iniciais de maturação; OM- ovários em estádios avançados de maturação. Animal fixado MCNAM 4627. Aumento de 10x. Barra=1.0mm.

As ovogônias (Fig. 6) apresentaram diâmetro médio de 73.8 μ m (± 2.8 ; 41.4-111.6 μ m), sendo as menores células da linhagem germinativa de fêmeas, mas não foram

comuns nos ovários analisados. Seu núcleo volumoso e levemente basófilo ocupa a maior parte do citoplasma. Estas células ocorrem em todos os estádios de desenvolvimento dos ovários, localizando-se na periferia destes.

Os ovócitos I ou perinucleolar inicial apresentaram o diâmetro médio de $170.8\mu\text{m}$ (± 6.7 ; 53.8 - $296.6\mu\text{m}$). São células arredondadas e compostas de citoplasma escasso e fortemente basófilo e núcleo volumoso e acidófilo. Os ovócitos II ou perinucleolar avançado apresentaram o diâmetro médio de $307.5\mu\text{m}$ (± 7.5 ; 165.4 - $460.7\mu\text{m}$), possuem citoplasma mais volumoso e levemente acidófilo e com grande número de nucléolos na periferia do núcleo acidófilo. Observou-se o início de formação da zona radiata. Os folículos ovarianos são compostos de ovócitos envoltos por células foliculares pavimentosas.

Os ovócitos III ou pré-vitelogênico apresentaram o diâmetro médio de $541.7\mu\text{m}$ (± 12.4 ; 367.6 - $818.4\mu\text{m}$) e correspondem ao início do processo de vitelogênese, caracterizado pelo surgimento na periferia do citoplasma, ainda levemente basófilo e granuloso, das vesículas corticais, que aparecem não coradas nas colorações com HE. O citoplasma passou a ser acidófilo, em razão, do acúmulo de grânulos eosinófilos (grânulos de vitelo), que ocupam grande parte de sua extensão. As células foliculares dos ovócitos III tiveram altura média de $17,9\mu\text{m}$ (± 10.5 ; 6.6 - $49.3\mu\text{m}$) e mativeram-se pavimentosas. A zona radiata é fina com média de altura de $8.4\mu\text{m}$ (± 3.0 ; 3.7 - $14.2\mu\text{m}$), e apresentou reação positiva para PAS e Alcian Blue (pH 0.5 e pH 2.5).

Os ovócitos IV ou vitelogênicos apresentaram diâmetro médio de $1064.4\mu\text{m}$ (± 51.3 ; 381.1 - $1882.2\mu\text{m}$) e há maior quantidade de vitelo. A vitelogênese progride e o citoplasma se torna acidófilo, chegando à maturação avançada. As células foliculares dos ovócitos IV tiveram altura média de $144,9$ (± 40.6 ; 56.0 - $240.7\mu\text{m}$) e apresentaram forma cúbica, estando dispostas em até três camadas. Coraram positivamente com PAS, indicando presença de glicoconjugados neutros, e com Alcian Blue (pH 0.5 e pH 2.5), indicando a presença de glicoconjugados ácidos carboxilados e sulfatados. A zona radiata atinge seu auge de desenvolvimento, caracterizada por espessa camada com altura média de $38.8\mu\text{m}$ (± 39.5 ; 8.2 - $170.2\mu\text{m}$), e reagindo positivamente para PAS e Alcian Blue (pH 0.5 e pH 2.5).

Observamos a presença de desova parcelada em fêmeas de *Scinax* aff. *perereca*. Em um mesmo ovário que estava no estágio de parcialmente desovado, verificamos a presença de ovócitos em todos os estádios de maturação, principalmente de ovócitos III e IV, ovócitos atrésicos, além de numerosos folículos pós-ovulatórios.

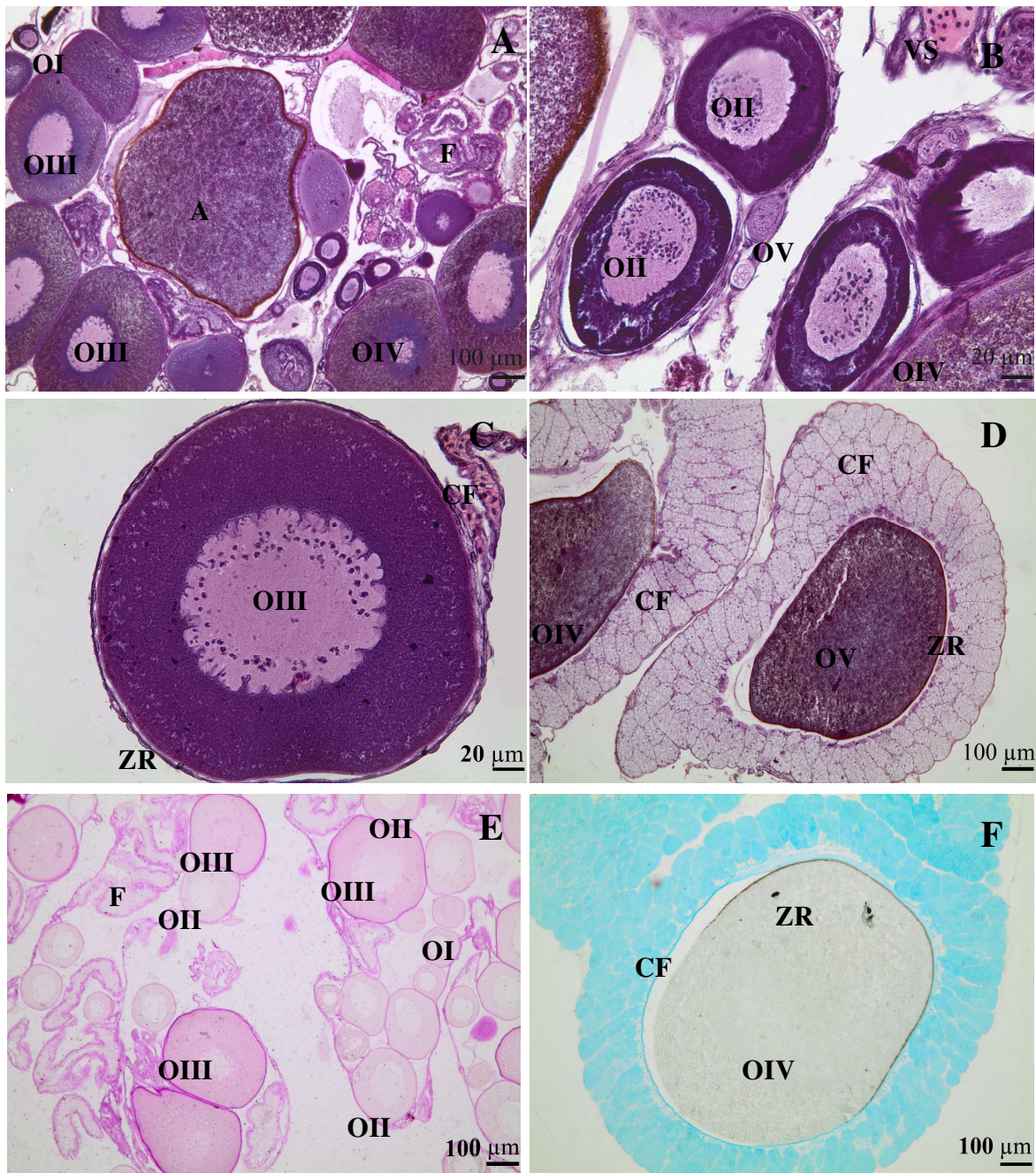


Figura 6: Células da linhagem ovogênica de *Scinax* aff. *perereca*: A: ovócitos em diversos estádios de maturação- HE - Aumento de 40x. Barra=100.0µm. B-C: ovócitos em diversos estádios de maturação- HE – Aumento de 200x. Barra=20.0 µm; D: ovócito IV com camada de células foliculares – HE - Aumento de 40x. Barra=100.0µm; E: ovócitos em diversos estádios de maturação - PAS positivo - Aumento de 40x. Barra=100.0µm; F: ovócito IV com camada de células foliculares - AB 2.5 positivo - Aumento de 40x. Barra=100.0µm. Ovogônias (OV), ovócitos I (OI), ovócitos II (OII), ovócitos III (OIII), ovócitos IV (OIV), ovócitos atresícos (A), folículos pós-ovulatórios, (F) vaso sanguíneos (VS) e zona radiata (ZR).

Estádios de maturação ovariana

Os ovários analisados apresentaram os seguintes estádios de maturação (Tabela 2): início da maturação, estágio 2 (n=5 indivíduos); maturação intermediária, estágio 3 (n=7 indivíduos); maturação avançada, estágio 4 (n=13 indivíduos); e parcialmente desovado, estágio 5 (n=16 indivíduos). Estes estádios são representados na Figura 8.

Tabela 2: Morfologia e morfometria dos folículos em diferentes estádios de maturação ovariana de *Scinax aff. perereca* (média, erro padrão e amplitude).

Estádio	Morfologia dos folículos	Diâmetro dos folículos ovarianos (µm)
Início da Maturação (estádio 2)	Presença de ovogônias e ovócitos I, II e poucos ovócitos III.	445.69 (±69.22; 243.51-624.99)
Maturação intermediária (estádio 3)	Poucas ovogônias e ovócitos I e II, grande número de ovócitos III e IV.	390.09 (±32.60; 245.54-509.74)
Maturação Avançada (estádio 4)	Poucas ovogônias, ovócitos I, II e III e grande número de ovócitos IV.	900.47 (±105.64 363.67-1684.72)
Parcialmente Desovado (estádio 5)	Presença ovogônias e ovócitos I, II, III e IV e folículos pós-ovulatórios.	456.84 (±37.10 217.55-731.59)

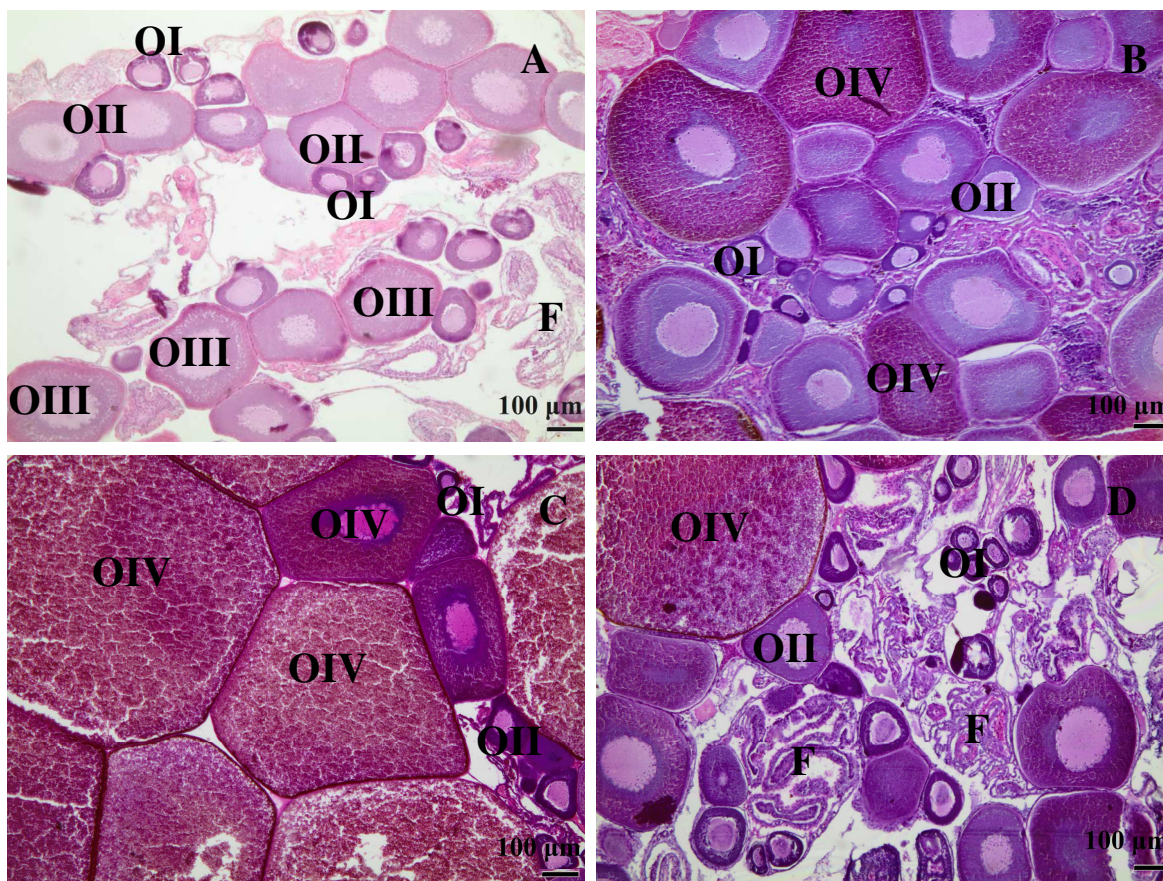


Figura 7: Estádios de maturação dos ovários encontrados em *Scinax* aff. *perereca* corados por Hematoxilina-eosina. A: início da maturação, estágio 2; B: maturação intermediária, estágio 3; C: maturação avançada, estágio 4; D: parcialmente desovado, estágio 5. Aumento de 40x. Barra=100.0µm. Ovócitos I (OI), ovócitos II (OII), ovócitos III (OIII), ovócitos IV (OIV), folículos pós-ovulatórios (F).

Encontramos correlação significativa entre a massa corporal, IHS e volume testicular com a temperatura média mensal para machos (Tabela 3). Apenas o IHS apresentou correlação significativa com a umidade média mensal. Obtivemos correlação significativa para massa corporal, IHS e volume testicular com a precipitação total.

Tabela 3: Relação entre a massa corporal, massa testicular, massa dos corpos de gordura, IGS, IHS e volume testicular de machos de *Scinax aff. perereca* com a temperatura média mensal (°C), umidade média mensal (%) e precipitação total mensal (mm) (respectivamente, r^2 e p). *Valores significativos.

Variáveis	Temperatura Média		Umidade média		Precipitação Total	
	r^2	p	r^2	p	r^2	p
Massa corporal	1.17	0.02*	-0.01	0.98	0.21	0.02*
Massa testicular	0.01	0.98	0.08	0.25	0.02	0.71
Massa corpos de gordura	0.32	3.79	0.52	4.20	0.35	5.18
IGS	-0.01	0.87	0.09	0.08	0.01	0.83
IHS	0.2	0.01*	0.27	0.01*	0.22	0.01*
Volume testicular	0.21	0.01*	0.07	0.30	0.16	0.02*

Encontramos correlação significativa e positiva da massa corporal e IHS de fêmeas com a temperatura média mensal (Tabela 4). O IHS apresentou correlação significativa e positiva com a umidade média mensal. Não houve correlação dos parâmetros morfométricos de fêmeas com a precipitação total mensal.

Tabela 4: Relação entre a massa corporal, massa ovariano, massa dos corpos de gordura, IGS, IHS de fêmeas de *Scinax aff. perereca* com a temperatura média mensal (°C), umidade média mensal (%) e precipitação total mensal (mm) (respectivamente, r^2 e p). *Valores significativos.

Variáveis	Temperatura Média		Umidade média		Precipitação Total	
	r^2	p	r^2	p	r^2	p
Massa corporal	0.31	0.05*	0.15	0.32	0.21	0.18
Massa ovariano	-0.02	0.85	0.17	0.29	0.12	0.41
Massa corpos de gordura	0.10	0.48	0.07	0.64	-0.08	0.57
IGS	-0.15	0.31	0.05	0.72	0.01	0.95
IHS	0.34	0.02*	0.38	0.01*	0.29	0.95

Atividade reprodutiva

O estágio maturação avançada (estádio 4) correspondente ao período reprodutivo da espécie *Scinax* aff. *perereca*. Os machos estiveram aptos a reprodução o ano todo, mas, o evento reprodutivo só ocorreu no período de setembro a abril, quando encontramos machos em estágio esgotado (Figura 8A). As fêmeas se apresentaram reprodutivamente ativas no final da estação seca, estação chuvosa e início da estação seca, ou seja, de setembro a abril, quando há presença de fêmeas maduras e parcialmente desovadas (Figura 8B).

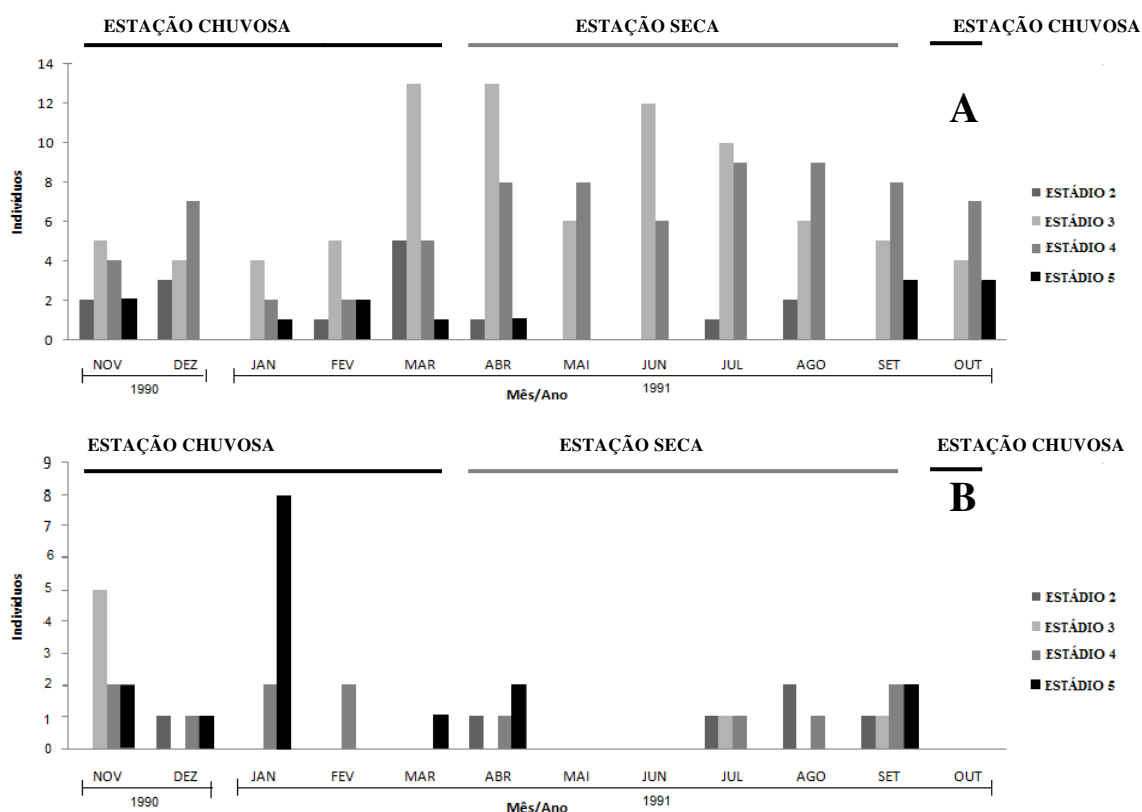


Figura 8: Número de indivíduos nos diferentes estádios de maturação gonadal de machos (A) e fêmeas (B) de *Scinax* aff. *perereca* entre Novembro de 1990 e Outubro de 1991. Estádios de maturação gonadal de machos: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 - Esgotado). Estádios de maturação gonadal de fêmeas: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 – Parcialmente desovado.

Os maiores valores de IGS para machos (Figura 9A) corresponderam à fevereiro (0.58) de 1991 e o menor à dezembro (0.28) de 1990. O IGS das fêmeas (Figura 9B) apresentou maior valor em de julho (8.44) e o menor em agosto (2.29) de 1991. Os

machos em período de maturação intermediária e avançada (estádios 3 e 4) apresentaram maior média que os não reprodutivos, ou seja, em maturação inicial e esgotado (estádios 2 e 3) (Figura 9C). Para fêmeas, o resultado foi oposto (Figura 9D), pois a menor média correspondeu à maturação avançada (estádio 4), seguida das maturações intermediária, inicial e parcialmente desovado (respectivamente, estádios 3, 2 e 5). A relação ao IGS e os períodos de seca e chuva não apresentou diferença significativa ($p=0.35$). O mesmo foi observado para fêmeas ($p=0.38$).

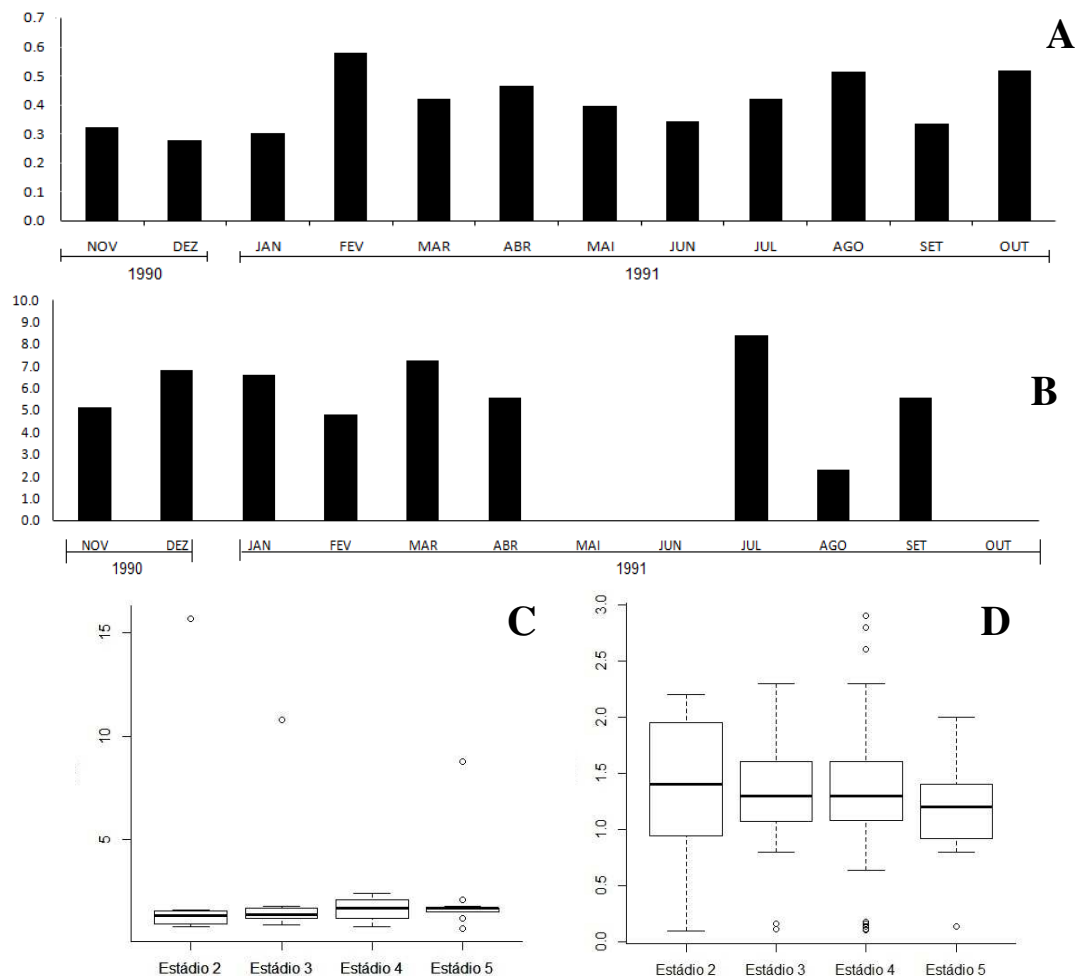


Figura 9: Variação do índice gonadosomático (IGS) de machos e de fêmeas ao longo do ano (A e B, respectivamente) e com os estádios reprodutivos (C e D, respectivamente). Estádios de maturação gonadal de machos: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 - Esgotado. Estádios de maturação gonadal de fêmeas: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 – Parcialmente desovado.

O maior valor de IHS de machos foi no mês de fevereiro (1.79) de 1991 e o menor no mês de novembro (1.07) de 1990 (Figura 10A). O valor máximo de IHS das fêmeas foi (5.25) no mês de abril e o menor (0.97) no mês de setembro de 1991 (Figura 10B). A média do IHS de machos em período de maturação inicial (estádio 2) foi maior em relação aos demais estádios (respectivamente,estádios 3, 4 e 5) (Figura 10C). Para fêmeas, A média do IHS de machos em período de maturação avançada (estádio 4), em relação aos demais estádios (respectivamente,estádios 2, 3 e 5) (Figura 10D). A relação ao IHS de machos e os períodos de seca e chuva não apresentou diferença significativa ($p=0.73$). O mesmo foi observado para fêmeas ($p=0.49$).

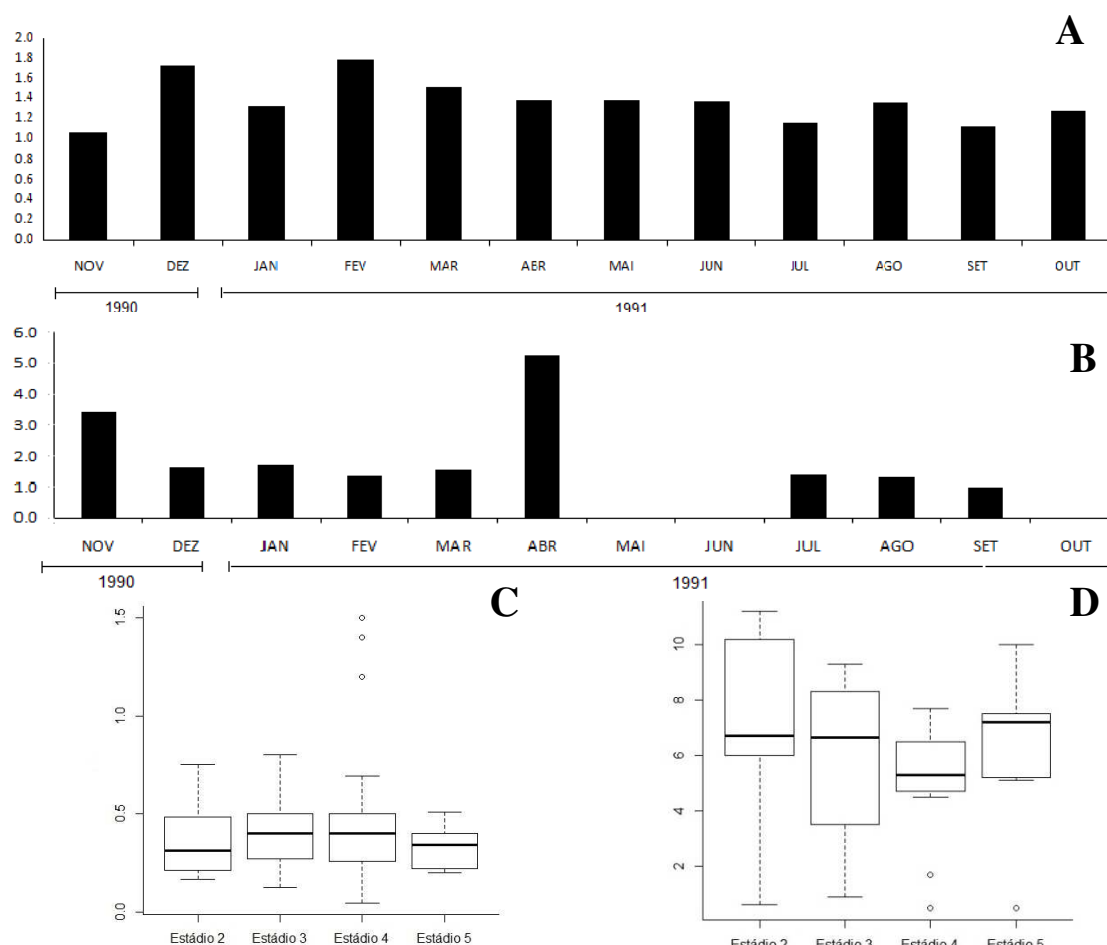


Figura 10: Relação do índice hepatossomático (IHS) de machos e de fêmeas ao longo do ano (A e B), respectivamente e os estádios reprodutivos (C e D), respectivamente. Estádios de maturação gonadal de machos: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 - Esgotado. Estádios de maturação gonadal de fêmeas: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 – Parcialmente desovado.

O volume testicular apresentou maior valor ($38.4\mu\text{m}^3$) no mês de fevereiro e menor ($11.9\mu\text{m}^3$) em outubro de 1991 (Figura 11A). A maior média de volume testicular foi registrada para machos em maturação avançada (estádio 4) (Figura 11B). A menor média do volume testicular foi de machos em estágio de maturação inicial (estádio 2). Entretanto não encontramos diferença significativa entre as médias do volume testicular. A relação do volume testicular e os períodos de seca e chuva não apresentaram diferença significativa ($p=0.64$).

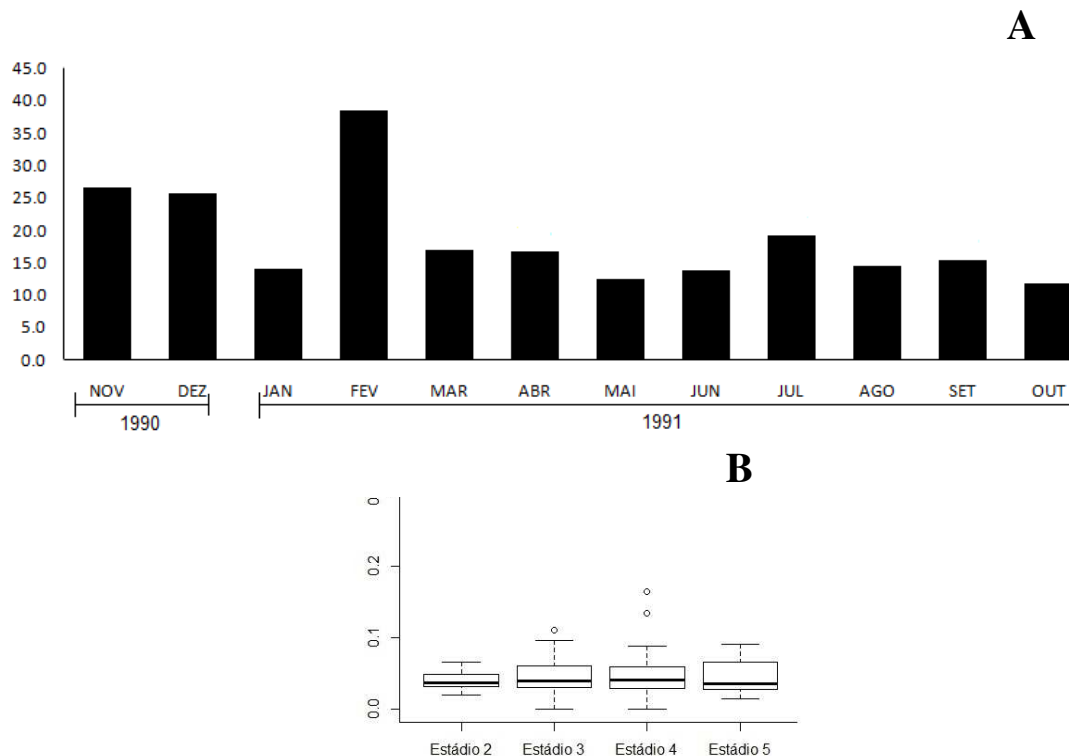


Figura 11: Relação do volume testicular ao longo do ano (A) e com os estádios reprodutivos de machos (B). Estádios de maturação gonadal de machos: estágio 2- Maturação Inicial; estágio 3 - Maturação Intermediária; estágio 4 - Maturação Avançada; e estágio 5 - Esgotado.

Discussão

Scinax aff. *perereca* é uma espécie em processo de descrição taxonômica, que possui sua distribuição geográfica nas áreas elevadas das Serras do Espinhaço e Mantiqueira, em Minas Gerais (Galdino *et al.* 2008; Nascimento *et al.* in prep.), teve a morfologia macroscópica das gônadas similar à descrita para outros hilídeos (Lofts 1974; Duellman e Trueb 1986; Oliveira e Andrade 1997; Oliveira e Vicentini 1998; Ferreira *et al.* 2008; Santos e Oliveira 2008). A morfologia dos corpos de gordura em ambos os sexos também não diferiu do descrito para *Amphibia* (Duellman e Trueb 1986; Oliveira *et al.* 2004). Os estádios da espermatogênese foram semelhantes à de outros anuros (Lofts 1974; Oliveira *et al.* 2002; Santos e Oliveira 2008; Villagra *et al.* 2012). Os cistos espermatogênicos alojam as células germinativas no mesmo estágio de diferenciação, estabelecendo uma sincronia de desenvolvimento, um padrão comum nos anamniotas e em várias espécies de anuros (Lofts 1974; Costa *et al.* 1998b; Prado *et al.* 2004; Santos e Oliveira, 2008; Ferreira *et al.* 2008). A morfologia do sistema reprodutor de fêmeas de *Scinax* aff. *perereca* também segue o padrão descrito para anfíbios anuros (Lofts 1974). Na literatura existem mais estudos sobre espermatogênese do que ovogênese em anuros, porém, os estádios de maturação dos folículos ovarianos encontrados para a espécie estudada foi semelhante aos poucos que existem para o grupo (Lofts 1974; Oliveira e Andrade 1997; Costa *et al.* 1998a; Oliveira e Santos 2004).

Em peixes Teleostei, a espessura da zona radiata é um tema relativamente bem abordado e é frequentemente associado ao modo reprodutivo (e.g. Andrade *et al.* 2001, Santos *et al.*, 2006; Melo *et al.* 2011; Weber *et al.* 2012). Andrade *et al.* (2001) mostraram que, para espécies de peixes, cujos ovos sofrem mais abrasão devido à características do ambiente, a zona radiata apresenta maior espessura. Para Teleostei a morfologia das células foliculares pode variar de acordo com a espécie e o nível de maturação gonadal (Bazzoli 2003). Melo *et al.* (2011) encontraram inicialmente pequenas células pavimentosas que, com o desenvolvimento do ovócito, tornaram-se altas e cúbicas. De acordo com estes autores, normalmente, essas células que estão em volta dos ovócitos possuem grande capacidade de síntese de substâncias que são transferidas para a superfície da zona radiata que está associado à capacidade de adesão dos ovos ao substrato. Para o hilídeo *Bokermannohyla nanuzae*, uma perereca endêmica de riachos no sudeste do Brasil, a zona radiata apresentou espessura fina em relação ao

ovócito (Lima 2013) e os ninhos foram encontrados em locais de pouca abrasão, como remansos de riachos, aderidos a rochas na superfície da água (Eterovick e Sazima 2004; Lima 2014). A zona radiata dos ovos de *Ololygon longilinea*, também hilídeo, apresentou espessura fina em relação ao tamanho do ovócito (Felippe *et al.* 2014). Carvalho (2001) observou ninhos de *O. longilinea* em locais de remanso próximas a superfície, aderidos a folhas e raízes, onde o fluxo de água era bem menor, fato que pode ser associado à espessura fina da zona radiata dos ovos desta espécie por Felippe *et al.* (2014).

A presença espessura da zona radiata em *S. aff. perereca* permite inferir que sua desova ocorra em locais de grande abrasão, como em áreas de riachos e próximos a quedas de água onde o fluxo é intenso, ambiente onde os adultos ocorrem (Galdino *et al.* 2008). Em *Scinax aff. perereca* o resultado da análise histoquímica da camada de células foliculares e zona radiata indicou presença de glicoconjugados neutros e de glicoconjugados ácidos carboxilados e sulfatados, que em conjunto sugerem secreção de sialomucinas, como ocorre em peixes (Andrade *et al.* 2001; Santos *et al.* 2006; Melo *et al.* 2011; Weber *et al.* 2012). Em locais de muita abrasão, como o provável ambiente de desova de *Scinax aff. perereca*, a presença de sialomucinas estaria relacionada ao processo de adesão destes ovos, evitando que sejam deslocados. Desta forma, estudos sobre a morfologia da zona radiata e a natureza da secreção das células foliculares em diferentes espécies de anuros devem ser realizados para melhor compreensão da função destas estruturas e permitir inferências sobre os locais de desova das espécies, que em muitos casos, são desconhecidos (Haddad e Prado 2005).

Em um mesmo ovário de *Scinax aff. perereca*, que estava parcialmente desovado verificou-se a presença de ovócitos em todos os estádios de maturação, principalmente de ovócitos III e IV, ovócitos atrésicos, além de numerosos folículos pós-ovulatórios. Isto sugere que as fêmeas reorganizam seus ovários e entram em um novo ciclo que parece ser fechado diretamente em um estágio intermediário. Estas características e a ausência do estágio de repouso indicam que *S. aff. perereca* apresenta desova do tipo parcelada. A contribuição da desova parcelada para o aumento do número de ovócitos a serem postos durante o período reprodutivo possibilita maior probabilidade de sobrevivência da espécie (Nikolsky 1963). Segundo McEvoy e McEvoy (1992) esse tipo de desova constitui estratégia reprodutiva desenvolvida para reduzir: predação de ovos e larvas; risco de desova em condições hidrográficas e climáticas desfavoráveis e; competição por locais de desova.

As análises microscópicas revelaram que os machos estiveram aptos a reproduzir, apresentando estágio de maturação avançada (estádio 4) o ano todo. Entretanto, foram encontradas fêmeas parcialmente desovadas de setembro a abril. Estudos mostram que mesmo o macho estando reprodutivo o ano inteiro, a atividade reprodutiva da espécie não precisa ser necessariamente contínua. Fêmeas podem modular esse ciclo com picos reprodutivos em determinadas épocas do ano (Oliveira *et al.* 2007; Leivas *et al.* 2012). Acreditamos então, que as fêmeas de *S. aff. perereca* modulam o período reprodutivo da espécie, pois apesar dos machos serem aptos a reprodução o ano todo, os eventos reprodutivos só ocorreram no período de setembro a abril, quando além do exposto, verificamos machos com testículos em estágio esgotado. Estas características, o tipo de desova parcelada e ciclo contínuo de reprodução de *S. aff. perereca* sugerem que machos e fêmeas participem mais de uma vez de evento em um único período reprodutivo. Assim, machos manteriam suas células germinativas em um estágio intermediário de maturação durante todo o ano e quando iniciassem as atividades reprodutivas, o processo de maturação dessas células seria acelerado, uma estratégia para conseguirem reproduzir mais vezes durante o período de reprodução, possivelmente com diferentes parceiros, garantindo além do sucesso de ovos e larvas, a variabilidade genética da espécie.

A atividade reprodutiva das espécies está relacionada às condições climáticas de onde vivem (Huang *et al.* 1997; Blaustein *et al.* 2002). Assim, mudanças ambientais relativamente pequenas na temperatura e na pluviosidade podem afetar os ritmos gametogênicos, estabelecer ciclos contínuos ou descontínuos e interferir na estrutura de uma comunidade (Huang *et al.* 1997; Blaustein *et al.* 2002). No presente estudo, não observamos diferença significativa para os vários parâmetros analisados entre o período chuvoso e o período seco, mostrando que os mesmos não têm efeito sobre o ciclo reprodutivo. Galdino *et al.* (2008), também no Parque, verificaram que a chuva e a temperatura não afetaram a ocorrência da espécie nos diversos microambientes habitados.

Pirani *et al.* (2013) indicaram, com base em estudos de vocalização, que *Scinax aff. perereca* é uma espécie que vocaliza na estação chuvosa e possui padrão reprodutivo prolongado. Canelas e Bertolotti (2007) apontaram a ocorrência de amplexo e fêmeas grávidas apenas no mês de outubro. Porém, no presente estudo, no qual o ciclo reprodutivo, com base na histologia e morfologia gonadal, foi analisado, foi possível verificar que *Scinax aff. perereca* possui padrão reprodutivo prolongado, de setembro a

abril, compreendendo o final da estação seca, estação chuvosa e início da estação seca, ou seja, mais amplo do que o reportado por esses autores.

Em machos, fatores exógenos como temperatura e fotoperíodo são responsáveis por induzir a proliferação espermatogonial (Chiefi e Minucci 2004). Para machos de *Scinax aff. perereca* encontramos efeito significativo e positivo na relação entre a temperatura média mensal e a massa corporal, IHS e volume testicular, assim como entre a umidade média mensal sobre IHS. Em relação à precipitação total obtivemos correlação significativa e positiva sobre massa corporal, IHS e volume testicular. Para fêmeas encontramos efeito positivo e significativo da temperatura média mensal sobre a massa corporal e IHS, assim como da umidade média sobre IHS. Experimentos realizados com fêmeas de algumas espécies de anuros revelaram temperaturas preferenciais para a maturação e o desenvolvimento final de ovócitos sendo que, de modo geral, temperaturas mais elevadas parecem ser preferenciais para a manutenção da integridade do ovário e do crescimento de ovócitos vitelogênicos (Jorgensen *et al.* 1978). O sucesso reprodutivo das fêmeas é limitado pelos recursos devido ao grande gasto energético para ovogênese (em particular na vitelogênese) e o sucesso reprodutivo dos machos está diretamente ligado ao acesso às fêmeas (Freeman e Herron 2009). Em ambientes tropicais sazonais, conforme se inicia a estação chuvosa, os recursos aumentam gradativamente diminuindo a competição pelos mesmos, explicando assim, o aumento da massa corporal, das reservas energéticas no fígado (IHS) e no volume testicular.

De acordo com alguns estudos o índice gonadossomático (IGS) é utilizado como parâmetro indicativo de atividade testicular durante o ciclo reprodutivo (Rastogi *et al.* 1978; Delgado *et al.* 1989; Guarino *et al.* 1993). Entretanto, para machos e fêmeas da espécie estudada, não encontramos diferença significativa entre os diversos estádios de maturação. Além disto, não houve efeito dos fatores abióticos, como temperatura, umidade e precipitação, sobre o IGS de machos e fêmeas. Portanto, não consideramos este um bom parâmetro para avaliar o estágio reprodutivo *S. aff. perereca*.

O índice hepatossomático tem sido utilizado como indicador do período pré reprodutivo, correlacionado a outros fatores como o índice gonadossomático (Rastogi *et al.* 1978; Delgado *et al.* 1989; Guarino *et al.* 1993; Costa *et al.* 1991). Em machos e fêmeas de *Scinax aff. perereca* quando comparamos os estádios reprodutivos ao longo do ano e o IHS, podemos ver que os meses com menores valores no IHS são os meses com mais indivíduos nos estádios de maturação intermediária e maturação avançada

(respectivamente, maturação 3 e 4). A diminuição do IHS do estágio de maturação intermediária para a avançada pode estar relacionada à possível participação do fígado na síntese e secreção de substâncias hepáticas para formação do vitelo exógeno no processo de maturação ovocitária, assim como para peixes (Bazzoli *et al.* 1998), e para a atividade metabólica dos testículos (Kao *et al.* 1993), ou seja, pré-evento reprodutivo.

O volume testicular sofreu efeito de duas variáveis ambientais testadas, a temperatura e precipitação. Quanto maior os valores de temperatura e precipitação maior o volume testicular. Apesar das médias dos estágios de maturação terem sido diferentes, não encontramos diferença significativa entre os estágios de maturação testicular e o volume do mesmo. Acreditamos que, apesar dos machos de *S. aff. perereca* serem aptos a reprodução o ano todo, eventos reprodutivos só ocorram no período em que as fêmeas estão aptas a reproduzir, comprovado pela presença de machos com testículos em estágio esgotado. Isto permite indicar que a espécie apresenta reprodução prolongada (*sensu* Wells 1977). Os resultados do presente estudo confirmam a importância da realização de avaliação da morfologia gonadal para a compreensão da biologia reprodutiva de espécies neotropicais.

Conclusão

- Os testículos de *Scinax* aff. *perereca* não apresentaram diferenças morfológicas macroscópicas nos diferentes estádios de maturação gonadal.
- Nos ovários, houve variação morfológica, determinada pelos ovócitos nos diferentes estádios de maturação, ou pelo processo de desova.
- Machos maduros de *Scinax* aff. *perereca* ocorrem o ano inteiro, mas fêmeas apenas de Setembro a Abril.
- Não houve efeito das variáveis ambientais sobre a atividade reprodutiva.
- *Scinax* aff. *perereca* possui desova parcelada e padrão reprodutivo prolongado.

Referencias bibliográficas

- Afonso, L.G. & P.C. Eterovick. 2007. Spatial and temporal distribution of breeding anurans in streams in southeastern Brazil. - *Journal of Natural History*, 41(13-16): 949-963.
- Andrade, R.F., Bazzoli, N., Rizzo, E. & Y. Sato. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). - *Tissue Cell*, 33:524-32.
- Báo, S.N., Vieira, G.H.C. & A.P. Fernandes. 2001. Spermiogenesis in *elanophryniscus cambaraensis* (Amphibia, Anura, Bufonidae): ultrastructural and cytochemical studies of carbohydrates using lectins. - *Cytobios*, 106:203-216.
- Bazzoli, N., Mesquita, T.L, Santos, G.B. & E. Rizzo. 1998. Análise comparativa da reprodução de *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. - *BioSystems*, New York, 6(6): 99-112.
- Bazzoli, N. 2003. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho H.P, Godinho A.L, editors. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. - *Belo Horizonte: PUC Minas*. pp 291-306.
- Blaustein, A.R., Root, T.L., Kiesecker, J.M., Belden, L.K., Olson, D.H. & D. M. Green. 2002. Amphibian phenology and climate change. - *Conservation Biology*, 16(6):1454-1455.
- Callard, I.P., Callard, G.V., Lance, V., Bolaffi, J.L. & J.S. Rosset. 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. - *Biology of Reproduction* 18:16-43.
- Canelas, M.A & J. Bertoluci. 2007. Anurans of the Serra do Caraça, southeastern Brazil: species composition and phenological patterns of calling activity. - *Iheringia*, 97:21-26.

Carvalho, R.R. 2001. Biologia reprodutiva de *Scinax Longilineus* (B. Lutz, 1968) (Anura, Hylidae) no Parque das Mangabeiras, município de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Zoologia*, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil.

Costa C.S.L. 1991. Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã touro no sistema Anfigraja. - *Dissertação Mestrado em zootecnia. Universidade Federal de Viçosa*, Minas Gerais. Brasil.

Costa, C.L.S., Lima, S.L., Andrade, D.R. & C.A Agostinho. 1998a. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no Sistema Anfigranja de Criação intensiva. - *Revista Brasileira de Zootecnia*, 7(4):642-650.

Costa C.L.S., S.L. Lima, D.R. Andrade & C.A. Agostinho. 1998b. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no Sistema Anfigranja de Criação intensiva. - *Revista Brasileira de Zootecnia*, 27(4):651-657.

Chieffi, P. & S. Minucci. 2004. Environmental influence on testicular MAP kinase (ERK1) activity in the frog. - *The Journal of Experimental Biology*, 207:2209-2213.

Delgado, M.J, Gutierrez, P. & M. Alonso-Bedate. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in frog, *Rana perezi*. - *General and Comparative Endocrinology*, 73:1–11.

Duellman, W.E. & L.Trueb. 1986. Biology of amphibians. - *McGraw-Hill*, New York.

Duellman, W.E. & L. Trueb. 1994. Biology of Amphibians. - *Baltimore, The Johns Hopkins University Press*.

Duellman, W.E., Marion, A.B., &S.B. Hedges. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). - *Zootaxa*, 4104(1):1-109.

Eterovick, P.C. & I Sazima. 2004. Anfíbios da Serra do Cipó – *Amphibians from the Serra do Cipó*. Belo Horizonte, Brazil: Puc Minas (Ed), pp.152.

Felippe, C., Galdino, C.A.B. & L.B Nascimento. Reprodução de *Scinax longilineus* (B. LUTZ, 1968). - *Dados não publicados*.

Ferreira A., Mehanna M. & C.A.P. Prado. 2008. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil. – *Biocell* 32(2):185-194.

Ferreira A., dos Santos Rosa A. & M. Mehanna. 2009. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). - *Acta Scientiarum, Biological Sciences* 31(4):447-452.

Ferreira, A. & M. Mehanna. 2012. Seasonal testicular changes in *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura, Hylidae). - *Biocell*, 57-62.

Freeman, S. & J.C. Herron. 2009. Análise evolutiva. – *Artmed Editora*, pp 407.

Frost, D.R. 2017. Amphibian Species of the world: an Online Reference. Version 6.0. Eletronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. - *American Museum of Natural History*, New York, USA.

Galdino, C.A.B., Carvalho Jr, R.R., Menezes, M.A.V.N. & L.B Nascimento. 2008. Habitat use by a tree frog species of *Scinax* (Amphibia, Hylidae) at an urban forest fragment from south-eastern Brazil. – *Iheringia* 98:412–415.

Glauss, L.H.A & L.B. Nascimento. 2014. Anfíbios e répteis da Serra da Piedade, Caeté (MG). *Trabalho de conclusão de curso de graduação* Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Brasil.

Goldberg, J. 2014. Gonadal Differentiation and Development in the Snouted Treefrog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). - *Journal of Herpetology*, 49(2):000–000.

Guarino, F.M, Di Fiore, M.M, Caputo, V., Angelini, F., Iela, L & R.K. Rastogi. 1993. Seasonal analysis of the reproductive cycle in two wild populations of *Rana italica* Dubois, 1985. - *AnimBiol*, 2:24–43.

Hackiewicz, K. & M. Ogielska. 2013. Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries. - *Zoological Science*, 30:125-134.

Haddad, C.F.B & Prado, C.P.A. 2005. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. - *BioScience*, 55(3):207-217.

Huang, W.S., Lin, J.Y. & J.Y.L. Yu. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. - *Zoological Science*, 14: 497-503.

Jorgensen, C.B, Hede, K.E. & L.O. Larsen. 1978. Environmental control of annual ovarian cycle in the toad *Bufo bufo* (L): Role of temperature. In: Assenmacher, I., Farner, D. S. - *Environmental Endocrinology*, pp. 28-36.

Kao Y.H, P, Alexander, V.V.C., Yang, J.Y.L., Yu. 1993. Annual patterns of testicular development and activity in the Chinese bullfrog (*Rana rugulosa* Wiegmann). - *Zoological Science*, 10: 331-357.

Lacerda, J.V.A., Assis, B., Santana, D.J. & R.N. Feio. 2009. Anurans in bromeliads, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, State of Minas Gerais, south eastern Brazil. - *CheckList* 5:800–806.

Leivas, P.T., M.O. Moura & Favaro L.F. 2012. The Reproductive Biology of the Invasive *Lithobates catesbeianus*. - *Froglog (Milton Keynes)*, 104:57-58.

Leite, G.B, Franco-Belussi, L., Provete, D.B & Oliveira C. 2015. Comparative testis morphology of Neotropical anurans. – *Zoologischer Anzeiger* 257:29–38.

Lima, N.G.S, Eterovick, P.C., Santos, J.E. & N. Bazzoli. 2013. Distribuição espacial e reprodução de *Bokermannohyla nanuzae* na RPPN Santuário do Caraça, sudeste do

Brasil. *Dissertação de Mestrado* Programa de Pós-graduação em Zoologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Brasil.

Lima, N.G.S., Gontijo, A.S.B. & PC. Eterovick. 2014. Breeding behaviour of *Bokermannohyla nanuzae* (Anura, Hylidae) at an Atlantic Forest site in southeastern Brazil. - *Journal of Natural History*, 48(23-24):1439-1452.

Lofts, B. 1974. Reproduction physiology of the amphibia. - *New York: Academic Press*, 2:107-218.

Mcevoy, L.A. & J. Mcevoy. 1992. Multiple spawning in several commercial fishes and its consequences for fisheries management, cultivation and experimentation. - *Journal of Fish Biology*, 41:125-136.

Melchioris, J., Di-Bernardo, M., Pontes, G. M. F., Oliveira, R. B., Solé, M. & A. Kwet. 2004. Reprodução de *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. – *Phyllomedusa* 3(1):61-66.

Melo, R.M., Arantes, F.P, Sato, Y., dos Santos, J.E, Rizzo E. & N. Bazzoli. 2011. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: Siluriformes).- *Journal of Morphology*, 272(5):525-35.

Moura, M.R. & R.N. Feio. 2010. *Hypsiboas faber* (Wied-Neuwied) predation on *Scinax* aff. *perereca* (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil. - *Herpetology Notes*, 3:353-354

Moura, M.R., Motta, A.P., Fernandes, V.D. & R.N. Feio. 2012. Herpetofauna from Serra do Brigadeiro, an Atlantic Forest remain in the state of Minas Gerais, Southeastern Brazil. - *Biota Neotrop.* 12(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v12n1/en/abstract?inventory+bn01012012012>

Nascimento, L.B., Pombal Jr., J.P. & C.F.B. Haddad. 2001. A new frog of the genus *Hylodes* (Amphibia: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Brazil. - *Journal of Zoology*, 254:421-428.

Nascimento, L.B., Nunes, I. & R. Carvalho J.R. A new cryptic species of the *Scinax ruber* clade (Amphibia, Anura, Hylidae) from the highlands of the Minas Gerais state, Brazil. *Dados não publicados*.

Nikolsky, G.V. 1963. The ecology of fishes. - *London: Academic Press*.

Ogielska M. & A. Kotusz. 2004. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. - *Journal of Morphology* 259:41–54.

Oliveira, C. & U.J.A. Andrade. 1997. Anatomia dos ovários e corpos adiposos de *Scinax fuscovaria* (Anura, Hylidae). - *Acta Biologica Leopoldensia* 19(2):173-183.

Oliveira, C. & C.A. Vicentini. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). - *Biociências* 6:79-88.

Oliveira, C., C. Zanetoni & R. Zieri. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). - *Revista Chilena de Anatomia*, 20:263-268.

Oliveira C., Vicentini C.A., S.R. Taboga. 2003. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (AnuraHylidae). - *Caryologia* 56(1):75–83.

Oliveira, C. & L.R.S, Santos. 2004. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). - *Revista Brasileira de Zoologia* 21:919-923.

Oliveira, E.F., Feio, R.N. & S.L.P. da Matta. 2007. Reproductive aspects of *Dendropsophus minutes* (Peters, 1872) in the municipality of Viçosa, Minas Gerais state. - *Ceres*, 54(313):230-238.

Pirani, R., Nascimento, L.B. & R.N. Feio. 2013. Anurans in a forest remnant in the transition zone between cerrado and atlantic rain forest domains in southeastern Brazil. - *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3):1093-1104.

Pizzatto, L. & O.A.V. Marques. 2002. Reproductive biology of the false coral snake *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) from southeastern Brazil. – *Amphibia-Reptilia*, 23:495–504

Pombal Jr. J.P. & C.F.B. Haddad. 2005. Estratégias e modos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 45(15): 201-213.

Prado, C.P.A, Abdalla, F.C., Silva, A.P.Z. & J. Zina. 2004. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. - *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 21(4):177-184.

Rastogi, R.K., Iela, L., DelRio, G., DiMeglio, M., Russo, A. & G. Chieffi. 1978. Environmental influence on testicular activity in the Green frog, *Rana esculenta*. - *Journal of Experimental Zoology*, 206:49-63

Rodrigues, D.J, Uetanabaro, M. & F.S Lopes. 2005. Reproductive patterns of *Trachycephalus venulosus* (Laurenti, 1768) and *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) from the Cerrado, Central Brazil. - *Journal of Natural History* 39(35):3217–3226.

Santos, J.E., Padilha, G.E.V., Boncompagni-júnior, O., Santos, G.B., Rizzo, E. & N. Bazzoli. 2006. Oocyte growth and follicular envelope development in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). - *Tissue Cell* 38: 303–310.

Santos L.R.S. & C. Oliveira. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). - *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1):64–70.

Santos, L.R.S. & C. Oliveira. 2008. Histological aspects and structural characteristics of testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). – *Micron*, doi:10.1016/j.micron.2008.03.006

- Santos L.R.S., Franco-Belussi L. & C. Oliveira. 2011. Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutes* (Anura: Hylidae). - *Zoological science* 28(11):840-844.
- Sasso-Cerri, E., De Faria, F.P., Freymüller, E., & S.M. Miraglia. 2004. Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. - *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(3):249-260.
- Sebben, A. 2007. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. - In “Herpetologia no Brasil II” Ed by L B Nascimento, M E Oliveira, *Sociedade Brasileira de Herpetologia*, Belo Horizonte, pp 311-325.
- Toledo, L.F. & C.F.B. Haddad. 2005. Reproductive biology of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. - *Jornal of Nature History*. 39(32):3029-3037.
- Van Sluys, M., Ferreira, V.M. & C.F.D. Rocha. 2004. Natural history of the lizard *Enyalius brasiliensis* (Lesson, 1828) (Leiosauridae) from an Atlantic Forest of southeastern Brazil. - *Brazilian Journal of Biology*, 64(2):353-356.
- Vazzoler, A. E. A. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. – *Maringá, Editora da Universidade Estadual de Maringá*, 169p.
- Vieira, G.H.C, Wiederhecker, H.C., Colli, G.R. & S.N. Bão. 2001. Spermiogenesis and testicular cycle of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae) in the Cerrado of central Brazil. - *Amphibia-Reptilia* 22:217-233.
- Villagra A.L.I., Cisint S.B., Crespo C.A., Medina M.F., Ramos I. & S.N. Fernández. 2012. Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study. - *Zygote* 20(1):1-9.
- Weber, A.A., Arantes, F.P., Sato, Y., Rizzo, E., & N. Bazzoli. 2013. Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae). - *Zygote*, 21(02):198-202.

Wells K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. - *Animal Behaviour*, 25:666-693.

Wells K.D. 2007. The Ecology and Behavior of Amphibians. - *University of Chicago Press, Chicago, IL*.