



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Parâmetros reprodutivos de *Leptodactylus podicipinus*
(Amphibia: Anura: Leptodactylidae) em ambiente antropizado**

Rafael Oliveira Bordin

Dissertação apresentada à
Fundação Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Mestre em Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Marciana Sanabria

Coorientadora: Dr^a. Lilian Franco-Belussi

Campo Grande, MS

Janeiro, 2021

Membros da banca examinadora



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 104, DE 18 DE DEZEMBRO DE 2020.

Aprova a composição da banca examinadora de dissertação do aluno Rafael de Oliveira Bordin.

O PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DO CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL, do Instituto de Biociências, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar a composição da "Banca Examinadora de Dissertação" do aluno RAFAEL DE OLIVEIRA BORDIN, intitulada "Parâmetros reprodutivos de *Leptodactylus podicipinus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) em ambiente antropizado", sob a orientação da docente MARCIANA SANABRIA, e coorientação da docente LILIAN FRANCO BELUSSI, conforme segue:

Dra. MARCIANA SANABRIA (UFMS - Presidente)

Dr. GABRIEL ADAN ARAÚJO LEITE (UFSC)

Dr. RODRIGO ARANDA (UFR)

Dra. MARINA TREVIZAN GUERRA (UFMS)

Dra. ROBERTA AZEREDO MURTA DA FONSECA (UFMS)

Dra. VANDA LUCIA FERREIRA (UFMS)

FERNANDO ROGERIO DE CARVALHO.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Rogério de Carvalho, Coordenador(a) de Curso de Pós-graduação, Substituto(a)**, em 18/12/2020, às 15:31, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orqao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2323560** e o código CRC **CC38C738**.

COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Av. Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS



Agradecimentos

Agradeço a minha família por todo apoio durante a jornada,

Minhas orientadoras Dra. Marciana Sanabria e Dra. Lilian Franco-Belussi, pela paciência e direcionamentos,

Ao laboratório de Histologia coordenado pela Dra. Luciane Candeloro e ao Técnico Claudio,

Toda a equipe dos laboratórios de Patologia experimental – Lapex e Mapinguari, por toda a ajuda e auxílio,

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa e ao programa de pós graduação em Biologia Animal da UFMS pela oportunidade.

Sumário

Introdução Geral	5
Artigo	17
Resumo.....	19
Abstract	20
1. Introdução	21
2. Material e métodos.....	21
3. Resultados.....	24
4. Discussão	29
5. Referências bibliográficas.....	31
Normas prescritas pelo periódico	34
Certificação da Comissão de ética no uso de animais – CEUA.....	37

Introdução Geral

A classe Amphibia apresenta uma grande diversidade com uma larga distribuição ao redor do globo. Hoje são reconhecidas 8.261 espécies em todo o mundo (Frost 2020), sendo 13% destas ocorrentes no Brasil, totalizando 1.136 espécies alocadas em 20 famílias (Segalla et al. 2019). Mais especificamente no estado de Mato Grosso do Sul são descritas 97 espécies, representando 9% do total de espécies do país (Souza et al. 2017).

O grupo está entre os vertebrados com maior variação de traços reprodutivos que incluem habitat, ovoposição e comportamentos sexuais (Haddad & Prado 2005; Leite et al. 2015). Estes traços podem ser modulados por muitos fatores naturais abióticos, como clima, temperatura e umidade (Todd et al. 2011; Chaves et al. 2017). Entretanto, eles podem também ser influenciados por fatores bióticos, como relações comportamentais entre casais ou entre machos, como busca por amplexo ou competição de vários machos por uma fêmea (Emerson 1997; Zamudio et al. 2016), visto em espécies poliândricas com machos satélites próximos aos que ativamente vocalizam, espreitando na tentativa de fertilizar a fêmea também (Berec & Bajgar 2011). Além dos fatores naturais, a presença de atividades humanas em ambientes onde populações silvestres habitam também é um importante fator modulando características reprodutivas de anuros, o que resulta em vários impactos, tais como: declínios populacionais, distúrbios hormonais e reprodutivos, alterações morfológicas e intersexo (McCallum 2007; Collins 2010; Skelly et al. 2010; Lambert et al. 2015; Brodeur & Candioti 2017; Borges et al. 2019; Thambirajah et al. 2019).

Os anuros são os integrantes mais diversificados dentre os anfíbios, sendo facilmente reconhecidos por suas características, como a locomoção por salto, ausência de cauda e a vocalização dos machos durante o período reprodutivo (Vitt & Caldwell 2014). Além disso, realizam trocas gasosas através da pele e possuem um ciclo de vida característico, com reprodução por amplexo e imaturos com desenvolvimento através de metamorfose (Vitt & Caldwell 2014). As espécies variam muito em termos de tamanho e coloração, de forma que o corpo de cada uma está adaptada ao hábito de vida, com modificações morfológicas ou comportamentais para as atividades terrestres, arborícolas ou aquáticas (Heyer 1969; Bernarde 2012; Zamudio et al. 2016). As características reprodutivas, variações e especificidades da ordem podem refletir, entre outras coisas, os diferentes ambientes em que habitam (Haddad & Prado 2005).

As regiões tropicais apresentam uma grande diversidade em termos de reprodução de anuros, ocorrendo espécies de reprodução explosiva (aquelas nas quais a reprodução concentra-se em alguns meses do ano, com vários indivíduos se

reproduzindo ao mesmo tempo) e reprodução contínua (estendida ao longo do ano), além de haver algumas espécies oportunistas, que se reproduzem quando há condições favoráveis (Prado et al. 2000; Vitt & Caldwell 2014). Comumente, anuros se reproduzem durante a estação mais úmida do ano, ainda que algumas espécies possuem plasticidade reprodutiva para contornar situações ambientais adversas com diferentes estratégias (Heyer 1969; Santos et al. 2011; Toledo et al. 2012).

Em geral, para garantir a perpetuação e um número ótimo de prole, as espécies contam com estratégias reprodutivas que podem ser vistas como um conjunto de fatores fisiológicos e comportamentais, que levam os organismos a terem sucesso reprodutivo em determinados ambientes. Essas características podem estar relacionadas ao local de ovoposição, esforço reprodutivo, característica dos ovos, desenvolvimento de imaturos e cuidado parental, que definem o modo reprodutivo, algo bem característico em anuros (Prado et al. 2000). Os modos reprodutivos são muito variáveis, com 39 modos definidos por Haddad & Prado (2005), dos quais 31 são para a região Neotropical. Nesta região, as espécies apresentam diferentes combinações dos traços reprodutivos e muitas vezes pode apresentar mais de um modo, que são selecionados por diversas pressões, o que resulta em diferentes estratégias de amplexo, ovoposição, desenvolvimento de girinos e comportamentos com relação ao cuidado parental, que pode ser presente ou ausente dependendo da espécie (Haddad & Prado 2005; Toledo et al. 2012; Zamudio et al. 2016).

Espécies de *Leptodactylus* tem como características a reprodução em beiras de lagos e poças, em ninhos cheios de espuma gerada por secreção glandular, onde ocorre tanto o amplexo quanto a ovoposição (Prado et al. 2002). Também possuem registros de poliandria, com estudos apontando para a relação da massa testicular e produção espermática (Prado & Haddad 2003).

Leptodactylus podicipinus (Cope, 1862) possui aproximadamente 33 a 45 mm de comprimento rostro-cloacal e membros anteriores pequenos em relação aos posteriores, que são desenvolvidos para saltos (Ponssa et al. 2011). Geralmente, a coloração dos indivíduos é marrom-esverdeada no dorso com diversos pontos brancos na região ventral, membrana timpânica visível e dobras dorsolaterais (Heyer 1994).

É uma espécie que possui ampla distribuição geográfica e alta plasticidade reprodutiva. Pode ser considerada oportunista quanto ao uso do habitat e, sob condições favoráveis, pode se reproduzir o ano todo (Heyer 1994; Prado et al. 2000). Possui alimentação generalista, que varia de acordo com a disponibilidade de presas no ambiente (Rodrigues et al. 2004). Vive em áreas abertas, podendo ser comum em ambientes antropizados (Eterovick & Sazima 2004). Assim como a maioria das espécies de anfíbios, *L. podicipinus* vive em águas rasas nos estágios larvais, período em que as

suas gônadas se diferenciam e podem ser negativamente influenciadas por contaminantes que persistem no ambiente (Hayes et al. 2010; Smits et al. 2014).

Os sítios de vocalização dos machos de *L. podicipinus* podem ser bacias naturais ou construídas, que muitas vezes contam com a cobertura da vegetação da margem ou folhas da serapilheira, onde os machos ficam parcialmente submergidos enquanto vocalizam (Prado et al. 2002). A espécie também apresenta dimorfismo sexual com caracteres sexuais secundários nos machos, como calos sexuais e o saco vocal (Heyer 1994) e, em geral, são mais leves e menores do que as fêmeas (Prado et al. 2000). Há cuidado parental de girinos por parte das fêmeas até a metamorfose (Prado et al. 2002).

Os testículos são órgãos pares, localizados na região abdominal, conectados ventralmente aos rins pelo mesórquio (Ogieslka 2009). Apresentam forma ovoide e de coloração branca, os lóculos são esféricos e podem ser observados devido a transparência da túnica pois não possui pigmentação por melanócitos, algo comum em outras espécies (Figura 1) (Oliveira & Franco-Belussi 2012). Tal coloração por melanócitos pode ser alterada durante o período reprodutivo ou ser espécie-específica (Zhou et al. 2011; Oliveira & Franco-Belussi 2012). Os corpos gordurosos e a massa dos testículos podem variar ao longo do ano em relação a estação reprodutiva e demais características, como o tamanho do corpo e influência de pressão sexual, sendo a última na forma do risco de competição espermática (Byrne et al. 2002; Santos & Oliveira 2008; Chaves et al. 2017).

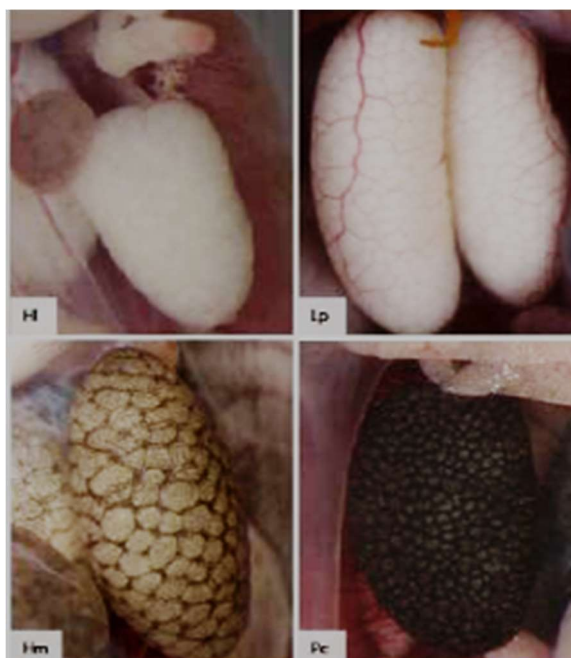


Figura 1. Morfologia testicular externa de diferentes espécies de anuros. Hl: *Holoaden luederwaldti*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Hm: *Hylodes magalhaesi*. Pc: *Physalaemus centralis*. Adaptado de Oliveira & Franco-Belussi 2012.

As gônadas masculinas são revestidas externamente pela túnica albugínea que serve de sustentação e proteção (Haider 2004; Oliveira & Franco-Belussi 2012). De acordo com o habitat e os diferentes modos reprodutivos, pode haver variações na sua espessura e rigidez (Leite et al. 2015).

Os testículos internamente são organizados em lóculos seminíferos, não possuem septos e as camadas de tecido conjuntivo delimitam a área desses lóculos. A região entre os lóculos é denominada intersticial, que contém vasos sanguíneos, células do tecido conjuntivo e células de Leydig, além de ductos eferentes circundando a região dos lóculos (Oliveira & Franco-Belussi 2012; Leite et al. 2015).

As células de Leydig são responsáveis pela síntese de andrógenos (Shan et al. 1997; Haider 2004; Santos & Oliveira 2008) e podem sofrer variações morfológicas de acordo com as mudanças sazonais (Pudney 1996; Pierantoni et al. 2002; Sasso-Cerri et al. 2005). A produção de hormônios sexuais é importante para a dinâmica reprodutiva, sobretudo o papel de hormônios andrógenos em machos, que influenciam as características reprodutivas, tanto fisiológicas, como na regulação das células de Leydig e Sertoli (Shan et al. 1997; Pierantoni et al. 2002), quanto comportamentais, que vão desde o estímulo para vocalização e formação do amplexo, até o aumento da agressividade em relações macho-macho (Emerson 1997; Harvey et al. 1997).

As células de Sertoli estão envolvidas em processos fundamentais no epitélio germinativo, como nutrição e sustentação dos cistos onde as células germinativas se desenvolvem. Também realizam fagocitose de resíduos citoplasmáticos provenientes do processo de espermiogênese (Billard 1970). Em anfíbios e peixes as células de Sertoli continuam se proliferando mesmo após o animal atingir maturação sexual (Bouma & Cloud 2005; Schulz et al. 2005).

No interior dos lóculos seminíferos estão distribuídos os cistos germinativos, que possuem vários grupos de células germinativas. Esses cistos possuem células no mesmo estágio germinativo, no entanto, dentro do lóculo pode haver vários cistos em variados estágios de diferenciação (Oliveira et al. 2003).

A configuração cística (Figura 2) é sustentada por extensões citoplasmáticas das células de Sertoli, frequentemente observadas em associação aos cistos até as fases finais de diferenciação, quando a forma cística é desfeita e substituída por uma configuração em feixe (Santos & Oliveira 2008). Essas células ficam associadas a parede basal do lóculo e continuam conectadas até estágios mais avançados da espermatogênese (Ferreira et al. 2009; Santos et al. 2011).

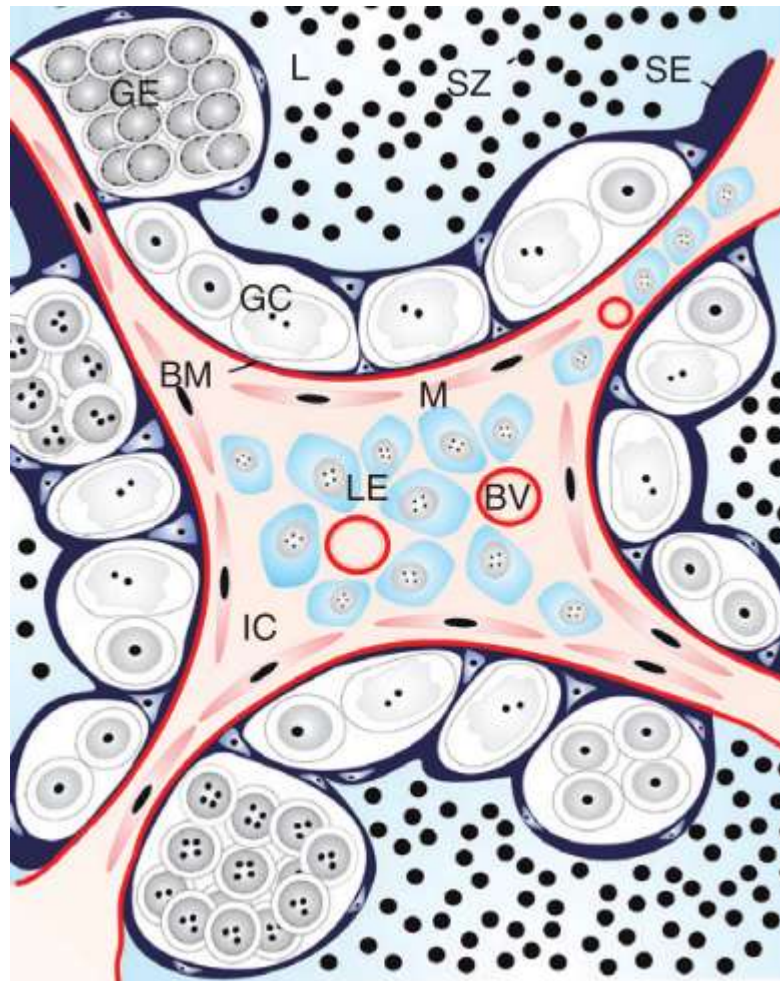


Figura 2. Esquema da Configuração cística do testículo de vertebrados, observa-se os compartimentos intersticial (IC) com membrana basal (BM), células mióides (M), vasos sanguíneos (BV) e células de Leydig (LE). No compartimento germinativo (GC), destaca-se o epitélio germinativo (GE), as células de Sertoli (SE), espermatozoides (SZ) no lúmen (L). Retirado de Schulz & Nóbrega 2011.

O processo de diferenciação celular durante a espermatogênese se dá quando o cisto germinativo é formado pela associação e mitose de células-filhas de espermatogônias, estas células se encontram na base do epitélio locular e são as menores células germinativas. As espermatogônias se proliferam por processo de mitose que, após alterações morfológicas, se diferenciam em espermatócito primário. Os espermatócitos primários são células maiores que após um primeiro processo meiótico originam as células tipo espermatócito secundário, de tamanho bem menor. Após a segunda meiose essas células se diferenciam em espermátides, que são células haploides que se alongam e adquirem a formação em feixe, deixando a configuração cística, que gera por fim espermatozoides após o processo de espermiogênese, processo que dá a forma final dos espermatozoides, geralmente com as caudas voltadas para o lúmen. Também é possível observar espermatozoides nos estágios

finais livres, preparados para seguir para os túbulos eferentes (Oliveira et al. 2003; Oliveira & Franco-Belussi 2012).

Em anuros a progressão do processo da espermatogênese pode durar toda uma estação, sendo que ao final do inverno pode restar apenas os estágios finais, levando a espermiogênese a ocorrer durante a estação reprodutiva, o que caracteriza o processo de reprodução descontínua. Apesar de algumas diferenças no processo de progressão germinativa, anuros, peixes e mamíferos compartilham de mecanismos similares quanto ao processo da espermatogênese (Pierantoni et al. 2002; Nóbrega et al. 2009).

O estudo da espermatogênese em anuros, permite melhor compreensão dos processos de controles internos e externos durante o ciclo reprodutivo desses animais, esclarecendo as diversificadas características e modos de vida das espécies. Os fatores ambientais e comportamentais podem influenciar o processo espermatogênico, tanto na variação de determinados tipos celulares durante o ano, como na variação da organização germinativa no testículo entre as espécies (Ferreira et al. 2009; Santos et al. 2011; Oliveira & Franco-Belussi 2012).

Apesar da morfologia do espermatozoide ser similar em algumas espécies (Figura 3), ela pode conter características únicas em diferentes grupos, o que pode estar relacionado ao tipo de fertilização, modo reprodutivo, tipo de amplexo e até mesmo presença ou ausência de competição espermática (Zamudio et al. 2016; Salles et al. 2017). Estudos apontam que a pressão sofrida por indivíduos de espécies com poliandria pode influenciar o tamanho do testículo, assim como a produção e morfologia do espermatozoide, acarretando na seleção sexual e, portanto, sendo um fator importante para a evolução e desempenho reprodutivo das espécies (Ball & Parker 1997; Byrne et al. 2002; Zeng et al. 2014).

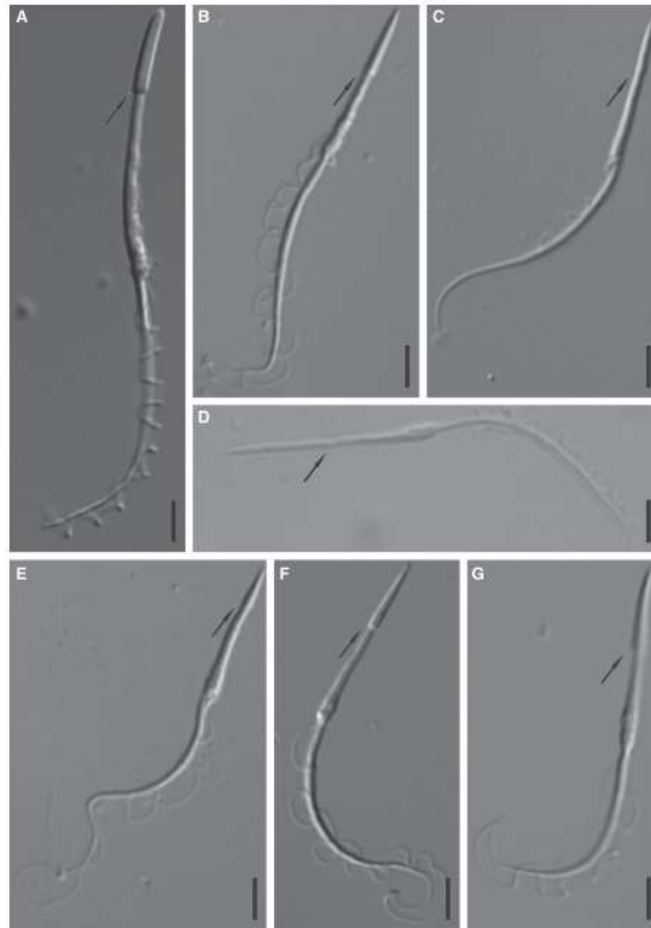


Figura 3. Morfologia de espermatozoides de espécies de Leptodactylidae. A - *Lithodytes lineatus*; B - *Leptodactylus macrosternum*; C - *L. bufonius*; D - *L. syphax*; E - *L. latrans*; F - *L. podicipinus*; G - *L. petersii*. Seta: borda acrossomal. Escala: 5 μ m Foto: Salles et al. 2017.

Os anfíbios que vivem em ambientes antropizados estão expostos a várias ameaças e muitas delas afetam partes específicas do seu desenvolvimento (Croteau et al. 2008). Dessa forma, um foco importante para estudos são as características reprodutivas de anuros silvestres provenientes de ambientes com diferentes usos do solo, como áreas urbanas e áreas sem atividade agrícola. As características do ambiente são determinantes para muitas estratégias e modos reprodutivos de anfíbios e, portanto, exercem grande influência na reprodução desses animais (Haddad & Prado 2005; Toledo et al. 2012). Essas áreas estão sujeitas a mudanças naturais, variações do ambiente, além da exposição à diversos contaminantes e influência antrópica, capazes de promover alterações na fisiologia e na reprodução de anfíbios e conseqüentemente, causar uma alteração na população desses animais (Smits et al. 2014; Lambert et al. 2015).

Em investigações laboratoriais, várias substâncias apresentaram atividades que mimetizam ou antagonizam aquelas dos hormônios sexuais esteroides e que, portanto, tornam esses compostos fortes candidatos a agentes causadores da deterioração da qualidade espermática e de desordens do sistema genital masculino (Sharpe & Skakkebaek 1993). Assim, o estudo de parâmetros morfológicos e características do tecido reprodutivo desses animais tem provido resultados para avaliação da reprodução de anfíbios (Çakici 2013; Franco-Belussi et al. 2014; Gregorio et al. 2016).

Ainda que *L. podicipinus* apresente alta plasticidade reprodutiva, seja amplamente distribuído e comum em ambientes antropizados, o conhecimento acerca da estrutura e fisiologia testicular desta espécie é escasso. Neste sentido, o presente estudo realizou uma investigação para avaliar as características da morfologia testicular e dos espermatozoides desta espécie em ambiente urbano.

Referências bibliográficas

- Ball MA, Parker GA (1997) Sperm competition games: Inter- and intra-species results of a continuous external fertilization model. *J Theor Biol.* <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0406>
- Berec M, Bajgar A (2011) Choosy outsiders? Satellite males associate with sexy hosts in the European tree frog *Hyla arborea*. *Acta Zool Acad Sci Hungaricae*.
- Bernarde PS (2012). Anfíbios e répteis: introdução ao estudo da herpetofauna brasileira. Anolis Books.
- Billard R (1970) La spermatogenèse de *Poecilia reticulata* III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. *Ann Biol Anim Bioch Biophys.* <https://doi.org/10.1051/rnd:19700104>
- Bionda CL, Lajmanovich RC, Salas NE, Martino AL, Di Tada IE (2011) Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *J Herpetol.* <https://doi.org/10.1670/09-238.1>
- Borges RE, Santos LRS, Assis RA, Benvindo-Souza M, Franco-Belussi L, Oliveira C (2019) Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3779-z>
- Bouma J, Cloud JG (2005) Sertoli cell biology in fishes and amphibians. In: Skinner MK, Griswold MD. (eds). *The Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press.
- Brodeur JC, Candiotti JV (2017) Impacts of Agriculture and Pesticides on Amphibian Terrestrial Life Stages: Potential Biomonitor/Bioindicator Species for the Pampa Region of Argentina. In: Larramendy ML. (ed). *Ecotoxicology and Genotoxicology - Non-traditional Terrestrial Models*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00163>

- Byrne PG, Roberts JD, Simmons LW (2002) Sperm competition selects for increased testes mass in Australian frogs. *J Evol Biol.* <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00409.x>
- Chaves MF, Tenório FCMA, Santos ILVL, Neto CJCL, Texeira VW, Moura GJB, Texeira AAC (2017) Correlations of condition factor and gonadosomatic, hepatosomatic and lipo-somatic relations of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae) in the Brazilian semi-arid. *An. Acad. Bras. Ciênc.* <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160221>
- Collins JP (2010) Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Dis Aquat Organ* 92:93–99. <https://doi.org/10.3354/dao02307>
- Croteau MC, Hogan NS, Gibson JC (2008) Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. In: Mitchell JC, Brown REJ, Bartholomew B. (eds). *Urban Herpetology*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Emerson SB (1997) Testis size variation in frogs: Testing the alternatives. *Behav Ecol Sociobiol.* <https://doi.org/10.1007/s002650050383>
- Eterovick PC, Souza AM, Sazima I (2020) Anfíbios Anuros da Serra do Cipó. *Bios Consultoria e Réplicas*.
- Ferreira A, Rosa ABDS, Mehanna M (2009) Organização celular dos testículos em Hyllidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). *Acta Sci - Biol Sci.* <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v31i4.3332>
- Franco-Belussi L, Leite GB, Freitas JS, Oliveira C (2014) Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anim Biol.* <https://doi.org/10.1163/15707563-00002445>
- França IR, Russell ID (1998) The testis of domestic animals. In: Martínez-García F, Regadera J. (eds). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. Churchill Communications.
- Frost, Darrel R (2020) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (14/10/2020). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001
- Gregorio LS, Franco-Belussi L, Gomes FR, Oliveira C (2016) Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquat Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.022>
- Haddad C, Prado CPA (2005) Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *Bioscience.* [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0207:RMIFAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2)
- Haider SG (2004) Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. *Int Rev Cytol.* [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)33005-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)33005-6)

- Harvey LA, Propper CR, Woodley SK, Moore MC (1997) Reproductive endocrinology of the explosively breeding desert spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. Gen Comp Endocrinol. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.6805>
- Heyer WR (1994) Variation within the *Leptodactylus podicipinus-wagneri* complex of frogs (Amphibia: Leptodactylidae). Smithson Contrib to Zool. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.546.i>
- Heyer WR (1969) The Adaptive Ecology of the Species Groups of the Genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). Evolution. <https://doi.org/10.2307/2406697>
- Hayes TB, Khoury V, Narayan A, et al (2010) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proc Natl Acad Sci. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>
- Lambert MR, Giller GSJ, Barber LB, Fitzgerald KC, Skelly DK (2015) Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. Proc Natl Acad Sci <https://doi.org/10.1073/pnas.1501065112>
- Leite GB, Franco-Belussi L, Provete DB, de Oliveira C (2015) Comparative testis morphology of Neotropical anurans. Zool Anz. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.04.005>
- McCallum ML (2007) Amphibian Decline or Extinction? Current declines dwarf background extinction rate. J Herpetol. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2)
- Nóbrega RH, Batlouni SR, França LR (2009) An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. Fish Physiol Biochem. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9252-z>
- Oielska M (2009) Reproduction of Amphibians. Reprod Amphib. <https://doi.org/10.1201/9781482280135>
- Oliveira C, Franco-Belussi L (2012) Comparative morphology of anuran testes. In: Nemoto Y, Inaba N. (eds). Testis: Anatomy, physiology and pathology. Nova Science Publishers.
- Oliveira C, Taboga SR, Taboga SR, Vicentini CA (2003) Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). Caryologia G Citol Citosistemica Citogenet. <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589310>
- Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Palmiero C, Fienga G, Minucci S, Fasano S (2002) The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00543-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00543-7)
- Plassmann S, Urwyler H (2001) Improved risk assessment by screening sperm parameters. Toxicol Lett. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(00\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00314-3)

- Ponssa ML, Brusquetti F, Souza FL (2011) Osteology and intraspecific variation of *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae), with comments on the relationship between osteology and reproductive modes. *J Herpetol.* <https://doi.org/10.1670/09-190.1>
- Prado CPA, Haddad CFB (2003) Testes size in Leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. *Society.* [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2003\)037\[0354:TSILFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037[0354:TSILFA]2.0.CO;2)
- Prado CPDA, Uetanabaro M, Haddad CFB (2002) Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of the reproductive specialization toward terrestriality in the genus. *Copeia.* [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[1128:doanrm\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[1128:doanrm]2.0.co;2)
- Prado CPA, Uetanabaro M, Lopes FS (2000) Reproductive Strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brazil. *J Herpetol.* <https://doi.org/10.2307/1565249>
- Pudney J (1996) Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). *The Leydig Cell.* Cache River Press.
- Rodrigues D, Uetanabaro M, Prado C (2004) Seasonal and ontogenetic variation in diet composition of *Leptodactylus podicipinus* (Anura, Leptodactylidae) in the southern Pantanal, Brazil. *Rev española Herpetol.*
- Salles NME, Zara FJ, Prado CPA (2017) Differences in sperm morphology in foam-nesting Leptodactylid frogs (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zool.* <https://doi.org/10.1111/azo.12144>
- Santos LRS, Franco-Belussi L, Oliveira C (2011) Germ Cell Dynamics during the Annual Reproductive Cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoolog Sci.* <https://doi.org/10.2108/zsj.28.840>
- Santos LRS, Oliveira C (2008) Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron.* <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.006>
- Sasso-cerri E, Freymuller E, Miraglia SM (2005) Testosterone-immunopositive primordial Germ cells in the testis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J Anat.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00419.x>
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França IR, Vilela DAR, Godinho H (2005) Sertoli cell Proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod.* <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039891>
- Schulz RW, Nóbrega RH (2011) The reproductive organs and processes | Anatomy and Histology of Fish Testis. In: Farrell AP. (ed). *Encyclopedia of Fish Physiology.* Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00246-X>
- Segalla M V, Caramaschi U, Cruz CAG, Garcia PCA, Grant T, Haddad CFB, Santana DJ, Toledo LF, Langone JA (2019) Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira.*

- Shan LX, Bardin CW, Hardy MP (1997) Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing leydig and Sertoli cells. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4973>
- Sharpe RMM, Skakkebaek NEE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-E](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E)
- Skelly DK, Bolden SR, Dion KB (2010) Intersex frogs concentrated in suburban and urban landscapes. *Ecohealth*. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0348-4>
- Smits AP, Skelly DK, Bolden SR (2014) Amphibian intersex in suburban landscapes. *Ecosphere*. <https://doi.org/10.1890/ES13-00353.1>
- Souza FL, Prado CPA, Sugai JLMM, et al (2017) Diversidade de anfíbios do estado de mato Grosso Do Sul, Brasil. *Iheringia - Ser Zool*. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2017152>
- Todd BD, Scott DE, Pechmann JHK, Whitfield Gibbons J (2011) Climate change correlates with rapid delays and advancements in reproductive timing in an amphibian community. *Proc R Soc B Biol Sci*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1768>
- Toledo LF, Garey M V, Costa TRN, Lourenço-de-Moraes R, Hartmann MT, Haddad CFB (2012) Alternative reproductive modes of Atlantic forest frogs. *J Ethol*. <https://doi.org/10.1007/s10164-011-0322-9>
- Thambirajah AA, Koide EM, Imbery JJ, Helbing CC (2019) Contaminant and environmental influences on Thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Front Endocrinol*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00276>
- Vitt LJ, Caldwell JP (2014) *Herpetology An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press.
- Çakici Ö (2013) Carbaryl-induced histopathologic alterations on testes of levantine frog, *Pelophylax bedriagae* (anura: Ranidae). *Bull Environ Contam Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1010-y>
- Zamudio KR, Bell RC, Nali RC, Haddad CFB, Prado CPA (2016) Polyandry, predation, and the evolution of frog reproductive modes. *Am Nat*. <https://doi.org/10.1086/687547>
- Zeng Y, Lou SL, Liao WB, Jehle R (2014) Evolution of sperm morphology in anurans: Insights into the roles of mating system and spawning location. *BMC Evol Biol*. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-104>
- Zhou CQ, Mao M, Liao WB, Mi ZP, Liu YH (2011) Testis asymmetry in the dark-spotted frog *Rana nigromaculata*. *Herpetol J*.

Artigo

Morfologia espermática e organização celular do testículo de *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) em ambiente urbano

Artigo a ser submetido a revista *Reproductive Biology*
Qualis B2 - Biodiversidade

Morfologia espermática e organização celular do testículo de *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) em ambiente urbano

Sperm morphology and testes cellular organization of *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) in urban environment

Rafael Oliveira Bordin Programa de pós graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. rafaoliverbordin@gmail.com

Carlos Eurico dos Santos Fernandes Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil. carlos.fernandes@ufms.br

Diego José Santana Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Brasil. santanadiegojose@yahoo.com

Lilian Franco-Belussi Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil. lilian.belussi@gmail.com

Marciana Sanabria Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Brasil. marcisanabria@gmail.com

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Cidade Universitária, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil

Resumo

Os anuros possuem diversas estratégias reprodutivas associadas intimamente à dinâmica germinativa do testículo e a produção espermática. *Leptodactylus podicipinus* apresenta alta plasticidade reprodutiva e ampla distribuição geográfica, comumente encontrados em ambientes antropizados. Embora seja capaz de se reproduzir o ano todo, o conhecimento acerca da sua estrutura testicular nesses habitats é escasso. O presente estudo avaliou a organização celular do testículo, características morfológicas dos espermatozoides desta espécie em um ambiente urbano. Neste estudo foram utilizados 11 machos sexualmente maduros. As coletas foram realizadas por meio de excursões noturnas durante os períodos de abril e setembro, o período coincidiu com a pós-estação chuvosa. Dados biométricos, tais como massa testicular, comprimento rostro-cloacal e massa corporal absoluta foram associados com as variáveis de parâmetros espermáticos (tamanho da cabeça e cauda dos espermatozoides). Foram realizadas avaliações da morfologia espermática e cálculos estereológicos do testículo. Os resultados apresentaram correlações entre a massa testicular e o tamanho dos espermatozoides, sendo positiva em relação ao tamanho da cabeça e negativa em relação ao tamanho da cauda. A área de lóculo e o tamanho da cauda dos espermatozoides também apresentou correlação negativa. Houve cabeças e caudas dos espermatozoides com morfologia distinta do padrão descrito para a espécie. A estrutura germinativa apresentou mais de 50% da área locular composta por espermatozoides, 17% de espermátides, 16% de espermatócitos e 1% de espermátogônias. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento dos aspectos relacionados à biologia reprodutiva do *Leptodactylus podicipinus* em ambiente urbano.

Palavras-chave: Anfíbios, morfologia testicular, espermatozoide, gônada masculina.

Abstract

Anurans have multiple reproductive strategies, which are intimately associated with the testes germinative dynamics and sperm production. *Leptodactylus podicipinus* presents a high level of reproductive plasticity and wide geographical distribution, being commonly found in anthropized environments. Although the species has the capacity to reproduce throughout the year, the knowledge about their testes structure in urban habitats is scarce. The present study evaluated the morphological characteristics of the species testes and sperm in an urban environment. Were used 11 males sexually mature from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The sampling were trough night excursions during the months of April and September, the period occurred in the post rainy season. The biometric data of testes mass, snout-vent length and absolute body mass were associated with sperm parameters variables (length of spermatozoids head and tail). Were performed sperm morphology evaluation and testes stereological calculations. The results presented correlations between testes mass and spermatozoids length, being positive related to the head length and negative related to the tail length. The locular area and the tail length also presented a negative correlation. There were heads and tails of sperm with a morphology different from the pattern described for the species. The germinative structure presented more than 50% of the locular area composed of spermatozoids, 17% spermatids, 16% spermatocytes and 1% spermatogonia. The data contributes to the knowledge of the aspects related to the reproductive biology of *Leptodactylus podicipinus* from urban environment.

Keywords: Amphibians, testicular morphology, sperm, male gonad.

1. Introdução

Dentre os anfíbios, os anuros são os integrantes com grande variedade de modos e estratégias reprodutivas que consistem em vários processos fisiológicos e comportamentais, intimamente ligados a fatores externos e internos aos quais esses indivíduos estão sujeitos [1,2]. Dessa maneira, algo tão vital como a reprodução de uma espécie pode ser modulado por diversas características como clima, temperatura, umidade e até mesmo relações comportamentais entre machos-fêmeas e machos-machos [1, 2, 3, 4, 5]. Além dos fatores naturais, a presença de atividades humanas em ambientes reprodutivos ou seus arredores pode resultar em vários impactos no desenvolvimento desses animais [6,7,8,9,10,11,12].

Estudos apontam que a pressão sexual sofrida por indivíduos de espécies com poliandria pode influenciar o tamanho dos testículos, assim como a produção e a morfologia dos espermatozoides [13,14,15]. Portanto, o estudo da espermatogênese em anuros permite melhorar a compreensão dos processos de controles internos e externos durante o ciclo reprodutivo desses animais, o que pode contribuir para o esclarecimento das diversificadas características e modos de vida das espécies. Os fatores ambientais e comportamentais dos anuros podem influenciar o processo espermatogênico, tanto na variação de determinados tipos celulares durante o ano, como na variação da organização germinativa no testículo entre as espécies [16,17,18].

A maioria das espécies de anuros, vivem em águas rasas nos estágios larvais, período em que as suas gônadas se diferenciam e podem ser negativamente influenciadas por contaminantes que persistem no ambiente [19,20].

Contudo, o conhecimento acerca da estrutura e fisiologia testicular em locais urbanos ainda é escasso. Neste sentido, o presente estudo realizou uma investigação para descrever as características da morfologia testicular e dos espermatozoides de *Leptodactylus podicipinus* (Cope, 1862), de um ambiente urbano.

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

Foram utilizados machos adultos e sexualmente maduros *L. podicipinus* (n=11), com aproximadamente 37mm de comprimento rostro-cloacal, provenientes de um ambiente urbano - o "Lago do Amor" - localizado dentro da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no Campus de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (20°30'12.11"S 54°37'1.65"O). As coletas foram realizadas por meio de excursões noturnas, utilizando o método de busca ativa em sítio de vocalização [21]. As excursões foram nos períodos de abril e setembro de 2020, que coincide com o período pós-

estação chuvosa. Desta maneira, as coletas puderam acometer a variação na dinâmica do epitélio germinativo, mesmo a espécie sendo classificada com possuindo reprodução “contínua” [2]. Os animais utilizados neste experimento foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal (protocolo UFMS # 997/2018). As coletas foram realizadas com a licença de coleta e manutenção de anfíbios em laboratório (SISBIO/ICMBio #45889-1).

2.2. Biometria

Os espécimes foram eutanasiados por aplicação de benzocaína (5%) tópica nas regiões ventral e inguinal. Posteriormente, foram determinados o comprimento rostro-cloacal (mm) e massa corpórea (mg). As gônadas foram extraídas e pesadas para calcular o índice gonadossomático (IGS) ($\text{massa das gônadas (g) / massa corpórea (g) X100}$) [22].

2.3. Análises histológicas

Após a eutanásia, as gônadas esquerdas foram destinadas para análises histológicas, sendo então fixadas durante 3 horas por imersão em Metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) em temperatura ambiente [23]. Após a fixação foram submetidas ao processamento de rotina para microscopia de luz convencional.

As gônadas foram incluídas em Paraplast (Sigma - Aldrich®) e feitas 3 secções longitudinais não consecutivas por animal (3 μm de espessura, 50 μm de distância entre as secções). Os cortes histológicos foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE) e posteriormente analisados em Microscópio ZEISS modelo Primo Star do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX)- INBIO-UFMS.

As análises histológicas qualitativas foram realizadas com o intuito de avaliar a arquitetura do testículo dos *L. podicipinus*. Para tanto, utilizou-se aumento de 100x e 400x vezes em microscopia de luz para a análise de área de lóculo e células germinativas, respectivamente. Estas análises abrangeram a identificação morfológica dos principais tipos celulares de diferentes gerações de células germinativas (espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozoides), através de parâmetros já estabelecidos [18,24].

2.4. Morfometria do Testículo

Para as análises morfométricas os cortes testiculares longitudinais foram observados em microscópio de luz ZEISS modelo Primo Star em 400X, acoplado ao sistema digitalizador de imagens Opticom modelo LOPT14003, analisadas no software Image-Pro Plus v. 6.0. Para isso, a análise da dinâmica das células germinativas foi determinada de acordo com o volume locular ocupado pelas células, no qual foram medidos o volume de 10 lóculos de cada indivíduo avaliado (10 lóculos x 11 indivíduos), sendo obtida uma média do volume desses lóculos. A média da área de ocupação dos cistos de células germinativas foi obtida através do método de diagrama graticulado de Weibel [25], através do qual pontos de cada tipo de cisto foi identificado. Dessa maneira foi obtida a área ocupada por cada cisto nos lóculos, tendo como base 252 pontos, que representam a área locular.

2.5. Morfologia espermática

As gônadas direitas foram coletadas e separadas para a análise da morfologia espermática e utilizadas preparações a fresco seguindo as diretrizes já descritas [26] com as adaptações apontadas a seguir: com uma agulha de insulina foram injetadas 0,1 mL de formol salina a 10% dentro das gônadas; posteriormente essa solução foi aspirada e utilizada para fazer alíquotas; em seguida foram colocadas uma ou duas gotas dessa suspensão sob lâminas histológicas e, após 30 minutos, foram observadas em microscopia de contraste de fase (400X) em que 200 espermatozoides por indivíduo foram avaliados quanto a sua morfologia de cabeça e cauda, seguindo parâmetros já descritos para a espécie (presença de cabeça alongada e membrana da cauda ondulante) [27].

Foram realizadas medições lineares do tamanho da cabeça e cauda dos espermatozoides [15]. Para essas medidas foram preparadas lâminas histológicas com gotas da alíquota de espermatozoides e então adicionado corante eosina. Posteriormente as lâminas foram observadas sob microscópio de luz ZEISS modelo Primo Star (aumento de 400X) com câmera acoplada Opticom modelo LOPT14003, para obtenção das imagens de 100 espermatozoides por indivíduo para retirada das medidas de cabeça e cauda utilizando o software Image-Pro Plus v. 6.0.

2.6. Análises Estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas de correlação linear entre os parâmetros de morfometria testicular, valores biométricos do animal e o tamanho dos espermatozoides. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para as análises foi utilizado o software GraphPad InStat ® versão 3.06.

3. Resultados

3.1. Biometria

Os valores médios encontrados para a massa corpórea e o IGS dos indivíduos de *L. podicipinus* investigados foram, respectivamente, $4,82 \pm 0,26$ e $1,56 \pm 0,19$. A massa testicular apresentou média de $0,07 \pm 0,01$ e o CRC de $37,05 \text{mm} \pm 0,87$.

3.2. Análises histológicas

Os túbulos seminíferos estavam envoltos pelos componentes do compartimento intersticial ou intertubular, onde ficam localizados os vasos sanguíneos e linfáticos e as células de Leydig (Fig. 2A). A maioria dos indivíduos apresentaram os diferentes tipos de células germinativas (Fig. 2).

Durante a espermiogênese em *L. podicipinus*, assim como nos demais anuros, os cistos espermatogênicos se abrem e as células germinativas (espermátides) estão em contato direto com a membrana plasmática apical das células de Sertoli (Fig. 2A).

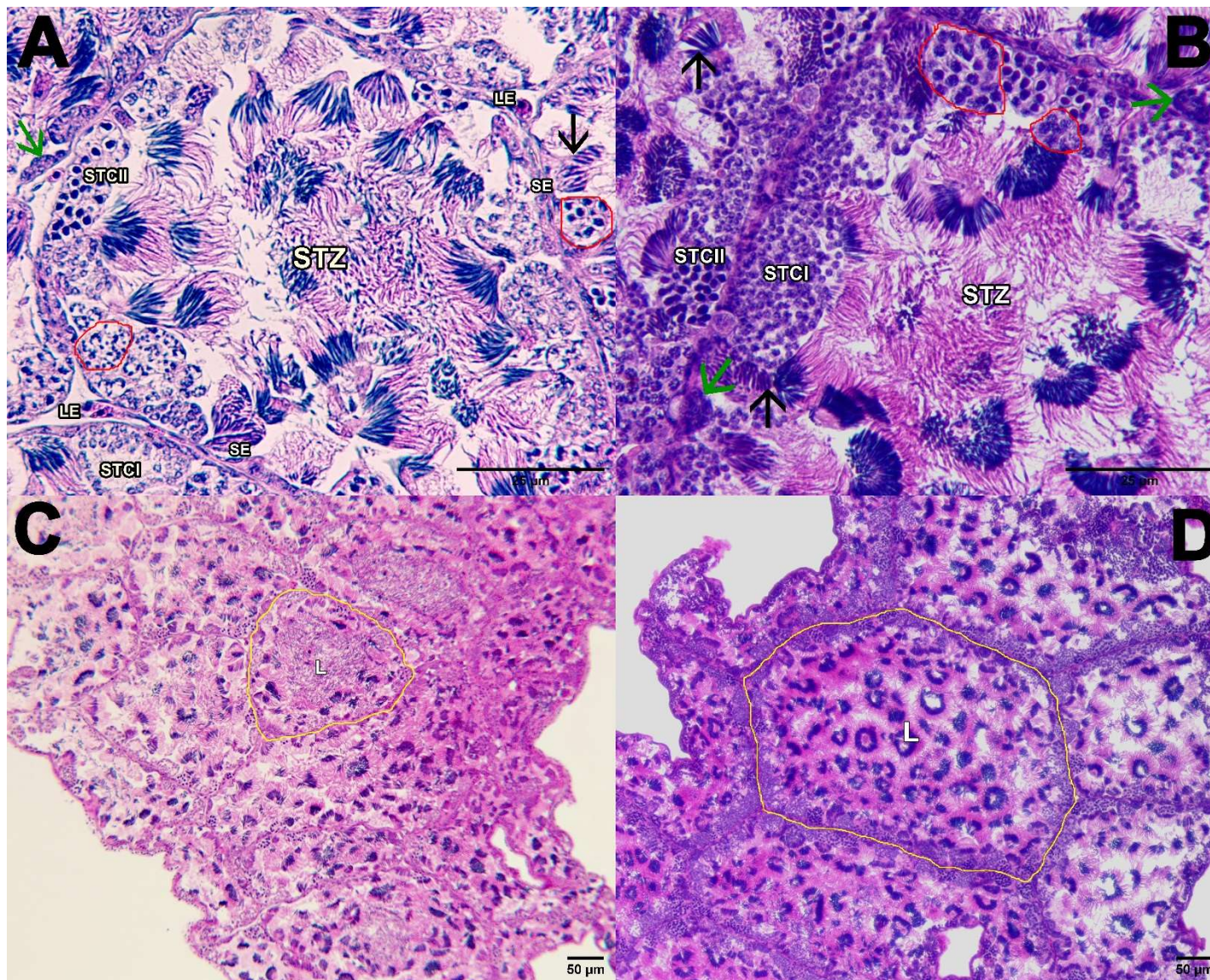


Figura 2. Histologia do testículo de *L. podicipinus*. A e B – Lóculo com cistos germinativos (Linha vermelha), observa-se grande quantidade de espermatozoides (STZ) no lúmen do lóculo, enquanto na periferia temos espermatócitos primários (STCI), secundários (STCII), espermatogônias (setas verdes), espermátides (setas pretas) e células de Leydig (LE) e Sertoli (SE). C e D – Delimitação de lóculos (Linha amarela); observa-se cistos organizados na periferia e lúmen (L) contendo espermatozoides soltos ou em feixes. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400X (A e B) e 100X (C e D).

3.3. Morfometria do Testículo

A média da área total do lóculo na espécie foi de $61344,36 \pm 10888,00 \mu\text{m}^2$. O volume das células germinativas na área locular foi de 85%, sendo 51,36% de espermatozoides (STZ). Os valores para os volumes de espermatídes (STE), espermatócito primário (STCI), espermatócito secundário (STCII) e espermatogônia (STG) foram, respectivamente, 16,72%, 11,36%, 4,45% e 1,30%, sendo os 15% restantes compostos por área citoplasmática, tecido intersticial e espaço locular (Fig. 3). Estes dados indicam que as células germinativas ocuparam a maior parte da área locular.

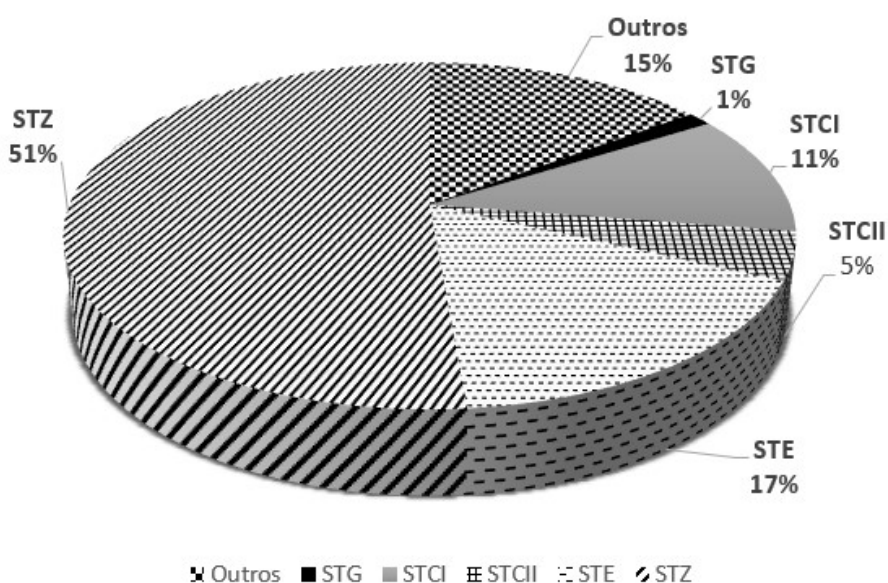


Figura 3. Gráfico do Volume Médio ocupado por cada tipo de célula germinativa na área locular ($61344,36 \pm 10888,00 \mu\text{m}^2$). STZ – Espermatozoides; STE – Espermatídes; STCI – Espermatócito primário; STCII – Espermatócito secundário; STG – Espermatogônia.

3.4. Morfologia espermática

Os espermatozoides analisados apresentaram, de modo geral, a morfologia padrão para a espécie (cabeça alongada e cauda ondulante). Entretanto, alguns espermatozoides apresentaram morfologia distinta do reportado na literatura (Tabela 1).

Tabela 1. Morfologia espermática de *L. podicipinus* em ambiente urbano. Número de machos analisados (N=11) e número de espermatozoides descritos (Nsptz).

Cabeça	Nsptz	Cauda	Nsptz
<i>Alongada</i>	2174	<i>Ondulante</i>	2162
<i>Alfinete</i>	8	<i>Enrolada</i>	38
<i>Curva</i>	18		

Os valores médios do tamanho dos espermatozoides dos indivíduos foi de $21,40\mu\text{m}\pm 0,33$ para o comprimento da cabeça e de $31,12\mu\text{m}\pm 0,31$ para o comprimento da cauda.

3.5. Correlações dos parâmetros biométricos e morfometria testicular/espermática

As variáveis apresentaram correlação negativa e moderada ($r=-0,72$, $p=0,01$) (Fig. 4) ou seja, a relação entre a área locular dos testículos e o comprimento da cauda dos espermatozoides é inversamente proporcional, portanto, quanto maior é a área locular menor a cauda dos espermatozoides.

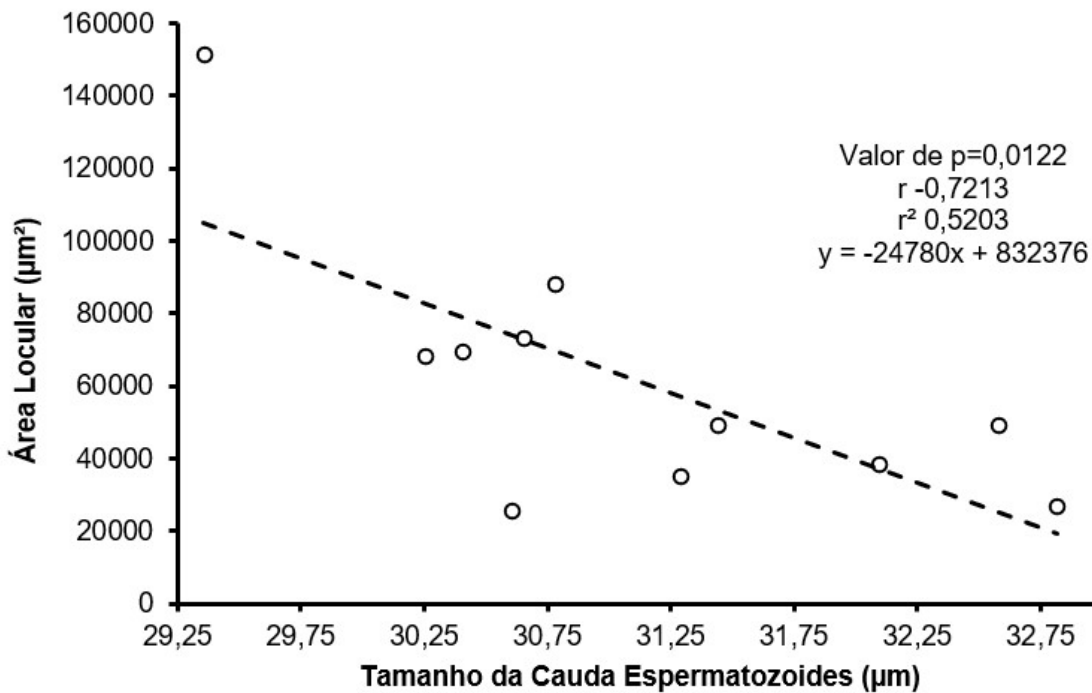


Figura 4. Gráfico de dispersão apresentando a regressão linear entre a área locular dos testículos e o comprimento da cauda dos espermatozoides analisados. Cada símbolo representa um valor de ambas as variáveis para um único indivíduo. Valor de p no teste de regressão linear de Pearson. r =coeficiente de correlação linear. A linha representa a regressão linear.

Foram obtidos resultados diferentes para a correlação entre a massa testicular e o tamanho da cauda e cabeça dos espermatozoides (Fig. 5 e Fig. 6), respectivamente. Na correlação linear entre a massa testicular e o comprimento da cauda dos espermatozoides dos indivíduos, houve diferença significativa ($p=0,02$) sendo negativa e moderada ($r=-0,66$, $r^2=0,44$) ou seja, a relação entre a massa testicular e o comprimento da cauda dos espermatozoides é inversamente proporcional.

O resultado da correlação entre a massa testicular e o tamanho da cabeça dos espermatozoides dos indivíduos foi inverso (Fig. 6). Também houve diferença significativa ($p=0,03$), no entanto, a correlação foi positiva e moderada ($r=0,62$ $r^2=0,39$). Sendo assim, a relação é diretamente proporcional, ou seja, quanto maior a cabeça dos espermatozoides, maior também é a massa testicular.

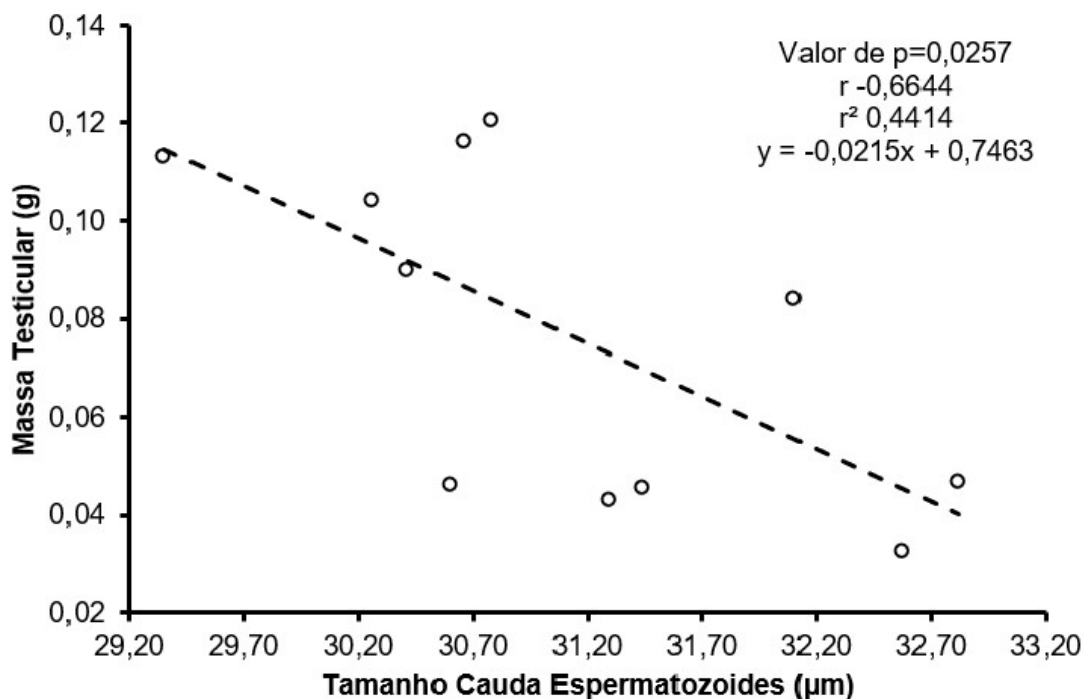


Figura 5. Gráfico de dispersão apresentando a regressão linear entre a massa testicular e o comprimento da cauda dos espermatozoides dos indivíduos analisados. Cada símbolo representa um valor de ambas as variáveis para um único indivíduo. Valor de p no teste de regressão linear de Pearson. r=coeficiente de correlação linear. A linha representa a linha de regressão linear.

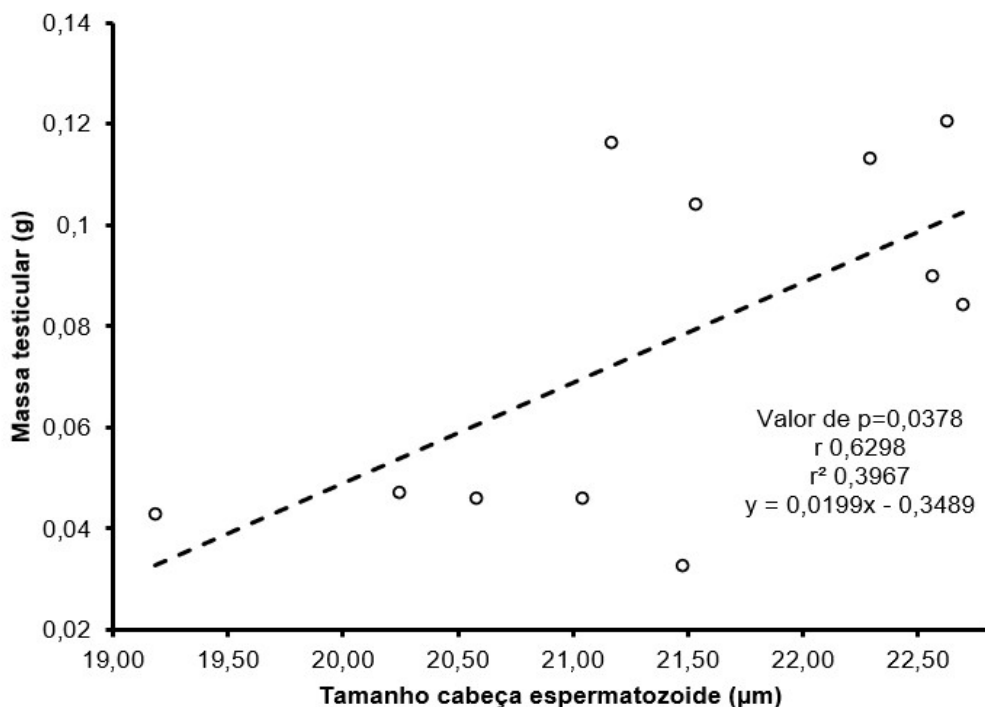


Figura 6. Gráfico de dispersão apresentando a regressão linear entre a massa testicular e o comprimento da cabeça dos espermatozoides dos indivíduos analisados. Cada símbolo representa um valor de ambas as variáveis para um único indivíduo. Valor de p no teste de regressão linear de Pearson. r=coeficiente de correlação linear. A linha representa a linha de regressão linear.

Não houve associação entre as demais variáveis biométricas (CRC, IGS, massa corpórea) e o tamanho dos espermatozoides.

4. Discussão

L. podicipinus possui uma estratégia reprodutiva plástica, tendo fácil adaptação às variações ambientais [2]. Os resultados do presente trabalho descrevem características histomorfológicas do testículo e a morfologia espermática da espécie em um ambiente urbano. A estrutura germinativa testicular dos indivíduos de *L. podicipinus* apresentou tipos celulares germinativos predominantes (espermátides e espermatozoides), o que pode ser um reforço para a descrição de sua reprodução contínua [2].

Os resultados acerca da área locular de *L. podicipinus* em ambiente urbano são inéditos. Nossos resultados apontam que os indivíduos de *L. podicipinus* possuem uma área média locular maior que aqueles de *L. macrosternum* [28], *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus* e *Boana albopunctata* [29], o que sugere uma variação interespecífica dos parâmetros testiculares. Entretanto, todas essas espécies foram estudadas em ambiente com estresse hídrico [28] ou com interferência humana [29]. Tal achado também pode ser devido ao fato de *L. podicipinus* apresentar poliandria, visto que há uma possível relação entre o tamanho do testículo e a intensidade de competição espermática em anuros [5,30].

A estrutura germinativa do testículo dos indivíduos de *L. podicipinus* apresenta padrão comum registrado para os anuros e a espécie em questão [16,17]. Possui células de todos os estágios germinativos dentro dos lóculos, porém com predominância de espermatozoides, o que corrobora com a característica reprodutiva da espécie [2], pois os indivíduos demonstraram grandes quantidades de espermatozoides no lúmen mesmo na estação pós-reprodutiva.

Os cistos de espermatócitos apresentaram uma frequência bem menor que os cistos de células em estágios finais, como espermátides alongadas e espermatozoides. Tais resultados estão de acordo com o padrão já descrito para *L. podicipinus* [16], no qual os cistos de espermatócitos foram esporádicos e raros, o que pode estar relacionado com a característica da reprodução acíclica da espécie. Esses resultados sugerem que a frequência das células germinativas de *L. podicipinus* não foi alterada pelo ambiente urbano, pois está de acordo com o que já foi observado em ambientes menos influenciados como o Pantanal [16], clarificando a sua plasticidade reprodutiva e larga distribuição.

A morfologia espermática é um parâmetro importante na avaliação da fertilidade de machos [31]. Vários estudos relataram a ocorrência de poliandria associada à competição espermática e, desse modo, influenciam a morfologia dos espermatozoides [13,32,33]. Sendo assim, as características espermáticas observadas no presente estudo podem estar associadas ao modo reprodutivo da espécie [27, 30, 34].

O tamanho médio total dos espermatozoides do presente estudo foi de $52,51 \pm 1,25 \mu\text{m}$, corroborando com o descrito para a espécie [27], que obteve valores similares para *L. podicipinus* nas regiões Centro-oeste e Sudeste do Brasil.

No presente estudo a correlação entre a área locular e o tamanho da cauda dos espermatozoides e, massa testicular foi negativa. Isso pode ser uma forma de compensar o menor

investimento em massa testicular para uma produção de espermatozoides com caudas mais longas e mais eficientes, corroborando os resultados que descrevem a influência direta e positiva da pressão sexual para o comprimento da cauda dos espermatozoides de espécies de Myobatrachidae [32].

A massa testicular absoluta foi associada de modo significativo com o tamanho da cabeça e cauda dos espermatozoides, onde foi observado relações diferentes com os dois parâmetros, sendo positiva em relação ao tamanho da cabeça e negativa para a cauda dos espermatozoides. Este resultado está de acordo com a literatura, pois estudos de morfologia, produção e competição espermática apontam para a existência de relações tanto positivas quanto negativas, diretas e indiretas, entre a massa testicular e o comprimento dos espermatozoides [14,15,32], sendo por intensidade de competição espermática ou aumento do tamanho testicular, resultado de diferentes maneiras de investir em produção espermática [15,32]. A relação positiva entre tamanho da cauda e cabeça dos espermatozoides e o tamanho dos testículos pode resultar na produção de espermatozoides com caudas menores e cabeças mais longas quando há alto risco de competição [15], pois este influencia diretamente o tamanho da cauda [32]. Assim, alinhado com os demais estudos, os resultados das correlações entre tamanho dos espermatozoides e a massa testicular de *L. podicipinus* corroboram o argumento do papel da competição, através da poliandria, o que pode acarretar a modulação da morfologia espermática e testicular [15,30].

Em relação aos valores biométricos, uma vez que tais valores podem apresentar relações que clarificam o estado do desenvolvimento e atividades dos anuros [35], não houve resultado significativo. Dessa forma, a falta de associação entre o desenvolvimento corporal (tamanho e CRC) dos indivíduos e o desenvolvimento das gônadas (IGS e massa testicular) se alinham com a hipótese de que a seleção sexual é um fator de grande influência no investimento e desempenho das gônadas em machos [13], sugerindo que *L. podicipinus* nessa região urbana é influenciado por fatores de pressão sexual, como o risco de competição, levando ao investimento no desenvolvimento testicular. Tal argumento é corroborado por evidências de um estudo semelhante com *L. macrosternum* [36], onde os dois parâmetros também apresentaram desenvolvimento independente, o que possivelmente pode ser uma característica do grupo.

Esta relação também pode estar vinculada a característica da espécie, a qual apesar de apresentar certo nível de competição espermática, não possui uma grande proporção de massa testicular em relação a massa corporal, sendo a massa das gônadas apenas 0,75% da massa corporal, o que é pouco se comparado a outras espécies próximas (e.g. *L. macrosternum*) que apresenta o peso das gônadas com 4% do total da massa corporal [5,28].

5. Conclusão

Em suma, conclui-se que *L. podicipinus* mantém o padrão das características de estrutura germinativa do testículo descrito para anuros, visto em outras espécies da família, o que é coerente com a descrição da reprodução contínua da espécie. Por fim, os resultados obtidos suportam o argumento da influência que os fatores de pressão sexual exercem sobre o desenvolvimento testicular e espermático.

Referências bibliográficas

- [1] Emerson SB. Testis size variation in frogs: Testing the alternatives. *Behav Ecol Sociobiol* 1997; 41:227–235. <https://doi.org/10.1007/s002650050383>.
- [2] Prado CPA, Uetanabaro M, Lopes FS. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brazil. *J Herpetol* 2000; 34:135-139. <https://doi.org/10.2307/1565249>.
- [3] Haddad C, Prado CPA. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *Bioscience* 2005; 207-217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0207:RMIFAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2).
- [4] Leite GB, Franco-Belussi L, Provete DB, Oliveira C. Comparative testis morphology of Neotropical anurans. *Zool Anz* 2015; 257:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.04.005>.
- [5] Zamudio KR, Bell RC, Nali RC, Haddad CFB, Prado CPA. Polyandry, predation, and the evolution of frog reproductive modes. *Am Nat* 2016; 188:S41. <https://doi.org/10.1086/687547>.
- [6] Thambirajah AA, Koide EM, Imbery JJ, Helbing CC. Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Front Endocrinol* 2019; 10:276. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00276>.
- [7] Brodeur JC, Vera Candiotti J. Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: Potential biomonitor/bioindicator species for the Pampa region of Argentina. In: Larramendy ML, editor. *Ecotoxicology and Genotoxicology - Non-traditional Terrestrial Models*, The Royal Society of Chemistry; 2017, p. 163–194. <https://doi.org/10.1039/9781788010573-00163>.
- [8] Collins JP. Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Dis Aquat Organ* 2010; 92:93–99. <https://doi.org/10.3354/dao02307>.
- [9] Mccallum MC. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *J Herpetol* 2007; 41:483–491. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2)
- [10] Borges RE, Santos LRS, Assis RA, Benvindo-Souza M, Franco-Belussi L, Oliveira C. Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26:23–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3779-z>.

- [11] Lambert MR, Giller GSJ, Barber LB, Fitzgerald KC, Skelly DK. Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 112:11881–11886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501065112>.
- [12] Skelly DK, Bolden SR, Dion KB. Intersex frogs concentrated in suburban and urban landscapes. *Ecohealth* 2010; 7:374–379. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0348-4>.
- [13] Byrne PG, Roberts JD, Simmons LW. Sperm competition selects for increased testes mass in Australian frogs. *J Evol Biol* 2002; 15:347–355. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00409.x>.
- [14] Ball MA, Parker GA. Sperm competition games: Inter- and intra-species results of a continuous external fertilization model. *J Theor Biol* 1997; 186:459–466. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0406>.
- [15] Zeng Y, Lou SL, Liao WB, Jehle R. Evolution of sperm morphology in anurans: Insights into the roles of mating system and spawning location. *BMC Evol Biol* 2014; 14:1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-104>.
- [16] Ferreira A, Rosa ABDS, Mehanna M. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). *Acta Sci Biol Sci* 2009; 31:447–452. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v31i4.3332>.
- [17] Santos LR de S, Franco-Belussi L, Oliveira C de. Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoolog Sci* 2011; 28:840–844. <https://doi.org/10.2108/zsj.28.840>.
- [18] Oliveira C, Franco-Belussi L. Comparative morphology of anuran testes. In: Nemoto Y, Inaba N, editors. *Testis: Anatomy, physiology and pathology*, Nova Science Publishers; 2012, p. 111–126.
- [19] Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, et al. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:4612–4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>.
- [20] Smits AP, Skelly DK, Bolden SR. Amphibian intersex in suburban landscapes. *Ecosphere* 2014; 5:1–9. <https://doi.org/10.1890/ES13-00353.1>.
- [21] Heyer WR, Donnelly MA, McDiarmid RW, Hayek LC, Foster MS. *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians*. 1st ed. Smithsonian Institution Press; 1994.
- [22] Vazzoler AEAM. *Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: Reprodução e crescimento*. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico 1982; p. 106
- [23] Carson FL, Hladik C. *Histotechnology: A self-instructional text*. 3rd ed. American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- [24] Oliveira C, Taboga SR, Taboga SR, Vicentini CA. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). *Caryologia* 2003; 56:75–83. <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589310>.

- [25] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1963; 12:131–155.
- [26] Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hu RME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reprod Toxicol* 1996; 10:237–244. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00028-7](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00028-7).
- [27] Salles NME, Zara FJ, Prado CPA. Differences in sperm morphology in foam-nesting Leptodactylinae frogs (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zool* 2017; 98:1–12. <https://doi.org/10.1111/azo.12144>.
- [28] Chaves MF, Moura GJB, Tenório FCMA, Baptista JS, Neto CJCL, Texeira VW, et al. Influence of rainfall and temperature on the spermatogenesis of *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae). *Zoologia* 2017; 34:1–7. <https://doi.org/10.3897/zoologia.34.e20782>.
- [29] Rezende WR, Santos LRS, Franco-Belussi L, Oliveira C. Testicular morphometric changes in Neotropical anurans from agroecosystems. *Environ Pollut* 2021; 271:116–265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116265>.
- [30] Prado CPA, Haddad CFB. Testes Size in Leptodactylid frogs and occurrence of multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. *Society* 2003; 37:126–31. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2003\)037](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037).
- [31] Plassmann S, Urwyler H. Improved risk assessment by screening sperm parameters. *Toxicol Lett* 2001; 119:157–171. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(00\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00314-3).
- [32] Byrne PG, Simmons LW, Roberts JD. Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs. *Proc R Soc B Biol Sci* 2003; 270:2079–2086. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2433>.
- [33] Byrne PG, Roberts J D. Evolutionary causes and consequences of sequential polyandry in anuran amphibians. *Biol Rev* 2012. 87: 209–228. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00191.x>.
- [34] Faggioni GP, Prado CPA, Souza FL, Uetanabaro M, Landgraf PF. *Leptodactylus bufonius* (Vizcacheras' White-lipped Frog) spawning behavior. *Herpetol Rev* 2011. 42:260–261.
- [35] Bionda CL, Lajmanovich RC, Salas NE, Martino AL, Di Tada IE. Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. *J Herpetol* 2011; 45:261–264. <https://doi.org/10.1670/09-238.1>.
- [36] Chaves MF, Tenório FCMA, Santos ILVL, Neto CJCL, Texeira VW, Moura GJB, et al. Correlations of condition factor and gonadosomatic, hepatosomatic and lipo-somatic relations of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae) in the Brazilian semi-arid. *An Acad Bras Cienc* 2017; 89:1591–1599. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160221>.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format, double spaced with numbered lines. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of the published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Recommended for full title to set at max. 20 words and 6 words for the short title.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section and include them on the title page only. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Abstracts

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract should not be divided into sections, aims, methods etc. (not structured). Abstracts for **Original Articles** should not exceed 250 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Use the abbreviations sparingly: only those abbreviations that are firmly established in the field are eligible. The keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations that are unavoidable must be defined twice: (1) at their first mention in the Abstract and (2) at their first mention in the remaining part of the article. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Reference style

Format the references in compliance with the recommended style for this journal:

Last name, initial, full paper title, journal full name, year, volume (number) first and last page.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Paivio A, Jansen B, Becker LJ. Comparisons through the mind's eye. *Cognition* 1975;37(2):635-47.

[2] Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84(2-3):279-289.

Reference to a book:

[3] Letheridge S, Cannon CR, editors. *Bilingual education: teaching English as a second language*. New York: Praeger; 1980.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: MacMillan; 1979 [chapter 4].

Reference to a conference (only abstracts 2-page long may serve as references):

[5] Douglas F, Ball Th. Tracking and viewing changes on the web. In: *Proc. 1996 USENIX technical conference*; 1996.

Certificação da Comissão de ética no uso de animais - CEUA



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CI - CEUA

Campo Grande, MS, 20 de maio de 2019

Do: Dra. Lilian Franco Belussi
Para: Presidente e demais membros da CEUA
Assunto: Solicitação de inclusão de membros e técnicas no projeto

Prezado Dr. Fábio e demais Membros da Comissão,

Solicito a inclusão da Profa. Dra. Marciana Sanabria, do INBIO da UFMS e do discente Rafael Bordin, aluno de pós-graduação em Biologia Animal da UFMS, na equipe técnica no projeto intitulado: **"Efeitos histopatológicos e imunológicos em anuros Neotropicais: proposição de novas ferramentas morfológicas para o monitoramento ambiental"** registrada com o nº **997/2018**, com vigência de 1º/07/2018 a 31/05/2020, aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 10ª reunião ordinária do dia 08/11/2018. Ambos irão participar das coletas, eutanásia e análises dos materiais e possuem experiência prévia de 8 e 4 anos, respectivamente.

Como descrito na proposta nº **997/2018**, serão realizadas coletas de *Leptodactylus podicipinus* também em área antropizada, onde são conhecidas as interferências das atividades humanas como industriais, agrícolas e hospitalares, localizados na cidade de Campo Grande/MS. A Profa. Dra. Marciana Sanabria e seu orientado e sob minha coorientação, Rafael Bordin, propõem em seu projeto de Mestrado avaliar os efeitos de desreguladores endócrinos sobre o sistema genital e parâmetros espermáticos em *Leptodactylus podicipinus* em ambiente antropizado.

Baseando-se no princípio dos 3 Rs: Reduzir, substituir e refinar, propomos utilizar os mesmos animais (n=10) de área antropizada para inclusão de técnicas de avaliação reprodutiva, ou seja, serão feitas análises histológicas e espermáticas das gônadas que não foram incluídos na proposta inicial, descritas a seguir: após a eutanásia dos animais, as gônadas serão retiradas e pesadas em balança analítica de precisão, e posteriormente congelados a -20°C para posterior determinação do número de células germinativas. Os testículos destinados para análises histológicas serão retirados e pesados em balança de precisão e fixados por imersão em Methacarn durante 24h em temperatura ambiente. As amostras do tecido serão lavadas durante 24h em água, desidratados numa série graduada de etanol e embebidos em Paraplast™ (Sigma, St. Louis, MO, EUA), à temperatura ambiente. Serão obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura corados com hematoxilina e eosina para análises histológicas que serão realizadas com auxílio de um microscópio de luz, seguindo as diretrizes para estudos toxicológicos.

Vale ressaltar que não haverá mudança no planejamento, coleta, método de eutanásia e descarte da carcaça, já descritos na proposta nº **997/2018** e aprovada por essa Comissão.

Atenciosamente,

Lilian Franco Belussi



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CI nº 20/2019 - CEUA/CPER/COMIS

Campo Grande, 27 de maio de 2019.

Do: Prof. Fábio José Carvalho Faria – Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS

Para: Profª Drª Lilian Franco Belussi – INBIO

Via: Direta

Assunto: CI s/nº2019 de 20/05/2019.

Prezada Pesquisadora:

A Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS, em sua 4ª Reunião Ordinária do dia 22/05/2019, APROVOU as solicitações descritas na CI s/n (20/05/2019) de V.Sa. vinculadas ao projeto de pesquisa: **“Efeitos histopatológicos e imunológicos em anuros Neotropicais: proposição de novas ferramentas morfológicas para o monitoramento ambiental”**. – Pesquisadora responsável: **Lilian Franco Belussi** (Processo 23104.026719/2018-45) – Protocolo 997/2018.

Sendo o que se apresenta para o momento.

Atenciosamente,

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/UFMS

Licença do SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 45889-1	Data da Emissão: 13/10/2014 01:21
Dados do titular	
Nome: Diego José Santana Silva	CPF: 066.125.976-58
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	CNPJ: 15.461.510/0001-33

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	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular 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.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	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.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	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.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	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/igen .

Outras ressalvas

1	Uma LP não é válida para: I) coleta ou transporte de espécies que constem em lista oficial de espécies ameaçadas; II) manutenção temporária de espécimes em cativeiro; III) recebimento/envio de material biológico ao exterior; e IV) realização de pesquisa em UC federal ou em cavidade natural subterrânea. Parágrafo Único: Essa restrição não se aplica às categorias RPPN e APA; Uma LP tem caráter pessoal e intransferível, sendo que o pesquisador titular da LP, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no SISBIO e informar nome e CPF dos membros da equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização. Os membros da equipe, exceto auxiliares de campo e condutores de veículos, deverão estar cadastrados no SISBIO.
---	--

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	CLASSE	Amphibia
2	ORDEM	Squamata
3		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 34928718



Página 1/2