



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MICHEL MONTEZOL

**"DINÂMICA GAMETOGENICA EM *Rhinella schneideri*
(Anura, Bufonidae)"**

**"GAMETOGENESE DINAMICS IN *Rhinella schneideri*
(Anura, Bufonidae)"**

Campinas, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MICHEL MONTEZOL

**“DINÂMICA GAMETOGENICA EM *Rhinella*
schneideri”**

Orientadora: Dra. Adelina Aparecida Francisca Ferreira

“GAMETOGENIC DYNAMICS IN *Rhinella schneideri*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Tecidual

Dissertation presented to the Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme in the Institute of Biology, the State University of Campinas, required for the completion of a Master degree in Cellular and Structural Biology, in the area of Tissue Biology

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno **Michel Montezol** e orientada pela Dra. Adelina Aparecida Francisca Ferreira.



Assinatura da Orientadora

Campinas, 2015

Agência de fomento: CNPq
Nº processo: 131272/2014-4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M765d Montezol, Michel, 1989-
Dinâmica gametogênica em *Rhinella schneideri* (Anura, Bufonidae) /
Michel Montezol. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Adelina Aparecida Francisca Ferreira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Contagem de células. 2. Células germinativas. 3. Reprodução. 4.
Gametogênese. 5. Histologia. I. Ferreira, Adelina Aparecida Francisca. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Gametogenic dynamics in *Rhinella schneideri* (Anura, Bufonidae)

Palavras-chave em inglês:

Cell count

Germ cells

Reproduction

Gametogenesis

Histology

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Adelina Aparecida Francisca Ferreira [Orientador]

Mary Anne Heidi Dolder

Patrícia da Luz Moreira

Data de defesa: 28-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28 de agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adelina Aparecida Francisca Ferreira (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Assinatura

Dra. Patrícia da Luz Morcira


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Dolsoni Lourenço Morandini


Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello


Assinatura

Agradecimentos

Durante esses dois anos de mestrado eu tive muitas conquistas, por exemplo, minha primeira submissão de artigo para uma revista científica, minha aprovação nas disciplinas cursadas, minha qualificação, minhas amizades construídas e reforçadas, aprendi técnicas de estudo as quais eu não conhecia e melhorei em muitos aspectos, inclusive com respeito à ansiedade. Mesmo antes de cursar o mestrado tive ajudas neste contexto e em meio a essas coisas boas também aconteceram contratempos, os quais tive ajuda para resolver.

Levando em consideração as coisas boas e os contratempos, e outras que não estão aqui por questão de espaço, acredito que devo agradecer à:

Aos meus familiares que me deram suporte até o atual momento da minha vida.

Ao meu pai por tudo.

Ao Programa de pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de formação.

À agência de fomento CNPq pela bolsa concedida.

À Adelina, minha orientadora desde a iniciação científica e também orientadora em monitorias da disciplina de histologia, pela compreensão nos momentos turbulentos, pelo carinho quando corrigia meus textos, exemplo em todas as atitudes da vida e ajuda em minha formação desde a graduação, onde num momento bastante difícil (no final do curso) se fez disponível para me ajudar e incentivar a caminhar nesta direção.

À Debora pela grande amizade e companheirismo que felizmente construímos, pelas ajudas com o photoshop, pela ajuda com algumas pranchas e por ceder uma que está nesta tese. Pela ajuda e disponibilidade durante os dias em que não saía nada da minha cabeça. Pelos cafezinhos na cantina da computação, pelas sutis chamadas de atenção, pelas caronas, conversas, incentivos.

À Mahmoud Mehanna pela ajuda com a interpretação dos dados em diversos trabalhos e pelo incentivo em continuar na academia.

Aos amigos e amigas de graduação pelo companheirismo.

À Livia pela primeira amizade que fiz em Campinas, por sempre me infernizar para ir ao shopping, pela companhia nos sábados no laboratório, pela ajuda na qualificação (e que ajuda importantíssima, heim!).

Ao pessoal da moradia da Unicamp que convivi durante esse tempo, Jurema, Afonso, Bruna, Jaque, Amizade, Luciano, por me mostrar como ser mais sensível, pelo carinho e

acreditarem no meu potencial, pelas conversas esclarecedoras em relação a diversos assuntos, pela companhia, ajuda em mudança carregando caixas, baladas, almoços de domingo.

Ao Leon pelo carinho, compreensão, dedicação, paciência, sensibilidade e demais virtudes que me mostrou ao longo do último ano.

À Michelly, minha querida amiga, por adocicar minha vida nos dias amargos com seu lindo sorriso.

Aos amigos de república *Escritúdio* pela fraternidade.

À Yohan pelo companheirismo.

A Priscilla e Vitinho por comparecerem num dia bastante especial me incentivando e estando felizes por eu estar concluindo mais esta etapa.

A Luiza pelas aulas de inglês, amizade, conversas, caronas, companhia e tudo aquilo que uma amiga faz!

A Anne, Ana e Grazi por serem da mesma turma que eu, me infernizando durante toda a graduação e também depois disso.

À Milla por discutir histologia comigo, contribuindo para que eu tenha maior propriedade nos temas.

Ao Carlos e demais técnicos do zoológico da UFMT por possibilitarem minhas coletas no período noturno.

À Liliam, secretária do programa, pela total disponibilidade em relação a assuntos e ajuda na resolução dos problemas com paciência e eficiência desde o primeiro dia de matrícula até a sua qualificação.

À professora Heidi pelo espaço do laboratório concedido nos períodos em que eu precisava permanecer na Unicamp, pelas ajudas com as disciplinas, paciência para me ensinar MET e disponibilidade em todo o momento em que eu precisava.

Resumo

A contagem de células germinativas, para machos e fêmeas, é uma forma de análise bastante eficiente para determinar períodos favoráveis à reprodução. No intuito de descobrir sobre as possíveis variações na produção de gametas de uma população de *Rhinella schneideri* (Anura, Bufonidae) em uma área urbana do município de Cuiabá, MT, Brasil, fizemos a caracterização das células germinativas e as contamos mensalmente em dois períodos (2007/2008 e 2012/2013). Machos exibem seis categorias de células germinativas, sendo elas espermatogônias primárias e secundárias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides. Fêmeas exibem cinco, sendo ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos, vitelogênicos, maduros e complexos pós-ovulatórios. A quantificação celular mostrou diferença no período de maior produtividade gamética entre ambos períodos analisados para ambos os sexos. Para machos todas as categorias de células germinativas foram vistas em todos os períodos, em 2007/2008, o período de maior produtividade gamética corresponde ao período chuvoso, já em 2012/2013 a produção de gametas em agosto foi alta, mas com a chegada do período chuvoso diminuiu, se contrapondo ao encontrado em 2007/2008. Visualizamos, apenas no segundo período, presença de ovócitos pré-vitelogênicos no interior dos túbulos seminíferos de poucos indivíduos da população. Em 2007/2008, as fêmeas apresentaram gônadas em três diferentes estágios de maturação: ovário em período de aptidão reprodutiva, o qual vai de outubro a dezembro de 2007, período de recuperação e crescimento do ovário, o qual vai de janeiro a maio de 2008 e período de repouso, o qual vai de junho a agosto de 2008. Em 2012/2013 elas apresentaram gônadas em dois diferentes estágios de maturação: fase ovário em desenvolvimento a qual ocorre de fevereiro a junho de 2013 e fase de aptidão á reprodução, na qual o ovário tem abundância de ovócitos maduros e complexos pós-ovulatório observada de agosto de 2012 a janeiro de 2013. A dinâmica gametogênica para ambos sexos difere na mesma população em momentos distintos e pode estar relacionada às ações antrópicas. Isso é um fato comum a outras espécies de anuros e pode estar relacionado à localização geográfica da população.

Palavras-chave: quantificação celular, ciclo reprodutivo, histologia, gametogênese, antropização

Abstract

The germ cell count, in both males and females, apparently, is a very efficient form of analysis to determine favorable reproductive periods. In order to discern possible variations in gamete production of a population of *Rhinella schneideri* (Anura, Bufonidae) in an urban area of Cuiabá, MT, Brazil, we characterized the germ cells and counted their production for two nonconsecutive years (2007 / 2008 and 2012/2013). Males exhibit six categories of germ cells, including primary and secondary spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. Females exhibit five, which are 8vogônia, pre-vitellogenic oocytes, vitellogenic, mature and atresic oocytes. Furthermore, we described the morphology of the seminiferous tubules demonstrating the presence or absence of cell types for the two periods. Cell quantification showed the difference in the period of greatest gametic productivity between the two periods analyzed for both sexes. For males all categories of germ cells were found in all periods, in 2007/2008, the period of greatest gametic productivity corresponds to the rainy season, a fact shown by the greater amount of spermatid differentiation, in 2012/2013, the production of gametes was high in August, subsided arrival of the rainy season, in contrast to the data found in 2007/2008. Furthermore, we visualized, during the second period, the presence of pre-vitellogenic oocytes inside the seminiferous tubules of a few individuals of the population. Females in 2007/2008 showed gonads in three different maturation stages: ovary in reproductive aptitude, which occurs from October to December 2007, recovery period and ovarian growth, which occurs from January to May 2008 and finally a resting period, which occurs from June to August 2008. In 2012/2013 they had gonads in two different stages of maturation: ovarian resting which occurred from February to June 2013, and the reproductive aptitude phase, in which the ovary has plenty of mature oocytes and atresia, and recovery occurring simultaneously, was observed from August 2012 to January 2013. The dynamics of spermatogenesis in *R. schneideri*, for both sexes, differs in the same population when viewed at different times and may be related to human activities. This fact may be common to other frog species and may also be related to the geographical location of this population.

Key-words: cell quantification, reproductive cycle, histology, gametogenesis, anthropization

Sumário

1. Introdução	10
4.2. Gametogênese em anuros	10
1.2. Ciclo reprodutivo em anuros	13
4.2. Dinâmica gametogênica em anuros	14
1.4. Formas de análise em estudos de ciclo reprodutivo de anuros	17
1.5. Caracterização da espécie	18
1.6. Caracterização e contextualização da área de estudo	19
2. Objetivos	21
3. Referencias	22
4. Artigos científicos a serem submetidos à publicação	28
4.1. Spermatogenic dynamics in <i>Rhinella schneideri</i> (Anura, Bufonidae)	29
4.2. Oogenic dynamics in <i>Rhinella schneideri</i> (Anura, Bufonidae)	59
5. Conclusões	91
6. Anexo 1	92
7. Anexo 2	94

1. Introdução

1.1. GAMETOGENESE EM ANUROS

O processo de formação de gametas é conhecido como gametogênese e envolve vários estágios de desenvolvimento. Durante a gametogênese, células diplóides (espermatogônias e ovogônias) se diferenciam para a formação do gameta masculino (espermatogênese) ou do gameta feminino (ovogênese) (Alberts *et al.*, 2009). Quando o macho torna-se sexualmente maduro, as espermatogônias começam a proliferar com rapidez, gerando uma população de células que mantêm a capacidade de continuar se dividindo indefinidamente, e outra população que depois de um número limite de divisões mitóticas, entrarão em meiose, tornando-se espermatócitos primários. Os espermatócitos primários sofrem a primeira divisão meiótica e tornam-se espermatócitos secundários. Depois de completar a divisão meiótica II, os espermatócitos secundários originam espermátides que se diferenciam em espermatozóides (Oliveira *et al.*, 2003). A espermatogênese difere da ovogênese de várias maneiras. Na ovogênese, as ovogônias se desenvolvem a partir das células germinativas primordiais que migram para as gônadas em desenvolvimento nos estágios iniciais da embriogênese. Após várias divisões mitóticas, as ovogônias iniciam a divisão meiótica I, depois da qual elas são chamadas de folículos primários, as quais contêm ovócitos primários. A partir deste ponto um pequeno número de folículos matura periodicamente sob a influência de hormônios, completando a divisão meiótica I e iniciando a meiose II para tornarem-se ovócitos maduros. O estágio no qual o ovócito é liberado do ovário e fecundado varia de espécie para espécie. Na maior parte dos vertebrados o ovócito é retido na metáfase meiótica II, completando a meiose II, rapidamente, após a fecundação (Alberts *et al.*, 2009).

No que diz respeito aos trabalhos de caracterização de células germinativas em anuros, em geral, no contexto da microscopia de luz, são poucas as diferenças encontradas em relação aos processos iniciais da espermatogênese, os quais incluem a divisão mitótica de espermatogônias e a divisão meiótica dos espermatócitos, mesmo em se tratando de grupos de espécies distantes. Já para o processo de espermiogênese, os trabalhos são realizados em nível de microscopia eletrônica de transmissão e eles trazem aspectos de maior contraste entre as espécies já estudadas.

O processo de espermatogênese, ou partes do mesmo como a espermiogênese, foi descrito para alguns anuros tropicais como para *Scinax hanki* (= *Hyla hanki*) (Taboga & Dolder 1991), *Rhinella marina* (= *Bufo marinus*) (Lee & Jamieson 1992) *Ameerega flavopicta*

(= *Epipedobates flavopictus*) (Garda *et al.*, 2002), *Physalaemus cuvieri* (Oliveira *et al.*, 2002), *Scinax fuscovarius* (Oliveira *et al.*, 2003), *Ameerega hahneli* (= *Epipedobates hahneli*) (Aguiar Jr. *et al.*, 2004), *Colostethus* spp. (Veiga-Monocello *et al.*, 2006), *Allobates marchesianus* (= *Colostethus marchesianus*) (Veiga-Menoncello *et al.*, 2007), *Pseudis limellum* (Ferreira *et al.*, 2008), *Dendropsophus minutus* (Santos & Oliveira, 2008), *Eupemphix nattereri* (Zieri *et al.*, 2008), *Leptodactylus chaquensis* (Villagra *et al.*, 2012). Algumas descrições de ovogênese foram elaboradas para *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) (Costa *et al.*, 1998), *Scinax fuscovarius* (Oliveira & Santos, 2004), *Leptodactylus labyrinthicus* (Prado *et al.*, 2004), *Eleutherodactylus* spp. (Rodriguez-Gómez *et al.*, 2010), *Leptodactylus latinasus* (Alcaíde *et al.*, 2012), *Ceratophrys cranwelli* (Villecco *et al.*, 2007). Os trabalhos que abordam uma perspectiva ecológica mencionam que conforme a época reprodutiva ocorre predominância de determinada célula germinativa (Huang *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011), e os trabalhos que abordam uma perspectiva filogenética demonstram que a análise da ultraestrutura do espermatozoide, revelam informações que reforçam o posicionamento de espécies num contexto filogenético (Lee & Jamieson, 1992; Lee & Jamieson, 1993; Aguiar Jr. *et al.*, 2004; Veiga-Menoncello *et al.*, 2006).

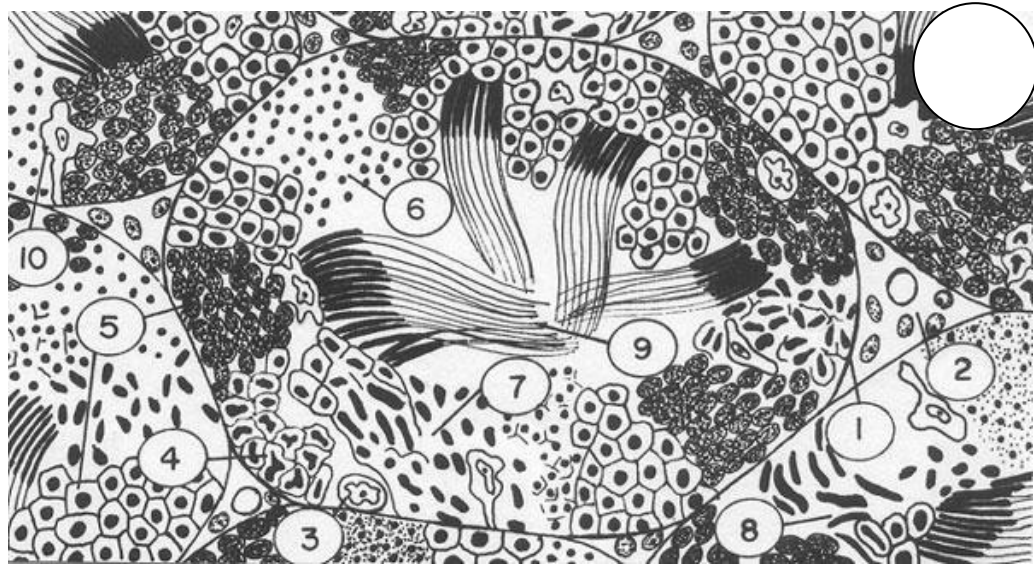


Figura 1A: Esquema da espermatogênese em *Physalaemus cuvieri*. 1 - parede locular; 2 - tecido intersticial; 3 - espermatogônia primária; 4 - espermatogônia secundária; 5 - espermatócito primário; 6 - espermatócito secundário; 7 e 8 - espermição; 9 - feixes de espermatozoides e 10 - célula de Sertoli. (Oliveira *et al.*, 2002).

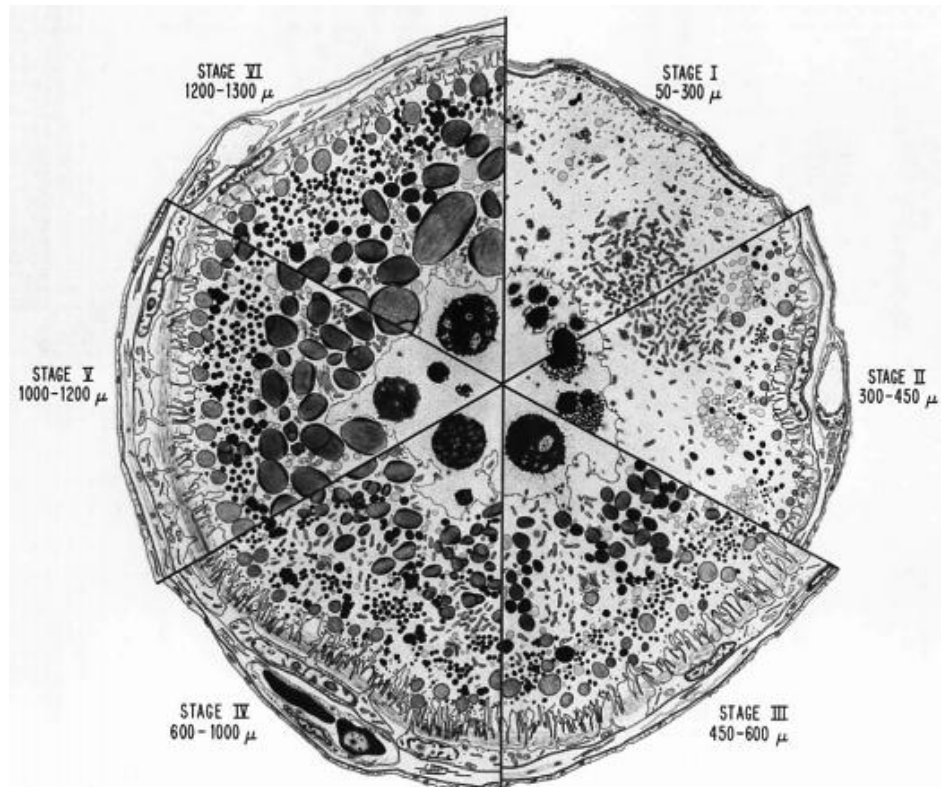


Figura 1B: Estágios de desenvolvimento da ovogênese de *Xenopus laevis* (Dumont, 1972).

A caracterização morfológica das células germinativas na família Bufonidae já foi descrita para alguns indivíduos como *Peltophryne fustiger* (*Bufo fustiger* Sanz–Ochotorena *et al.*, 2008), a ultraestrutura do espermatozóide de *Rhinella arenarum* (= *Bufo arenarum*) por Burgos & Fawcett, (1956), *Bufo japonicus* (Yoshizaki & Katagiri, 1982) e de *Rhinella marina* (= *Bufo marinus*) (Lee & Jamieson 1993). Sobre *Rhinella schneideri* foi descrito o espermatozóide (= *Bufo schneideri*) por Braz *et al.* (2004) e também para *Rhinella granulosa* (= *Bufo granulatus*).

Para a ovogênese a diferença encontrada nos trabalhos supracitados, entre as células germinativas é maior. Os aspectos mais relevantes apontados por alguns autores são o crescimento vitelogênico, a dinâmica dos corpos de balbiani, dinâmica do córtex nuclear, dinâmica dos nucléolos e pigmentação periférica do ovócito (Jørgensen, 1981; Iela *et al.*, 1986; Díaz-Paez & Ortiz, 2001; Sretarugsa *et al.*, 2001).

Neste trabalho, optamos por realizar a caracterização morfológica das células germinativas pela microscopia de luz, pois para o entendimento da dinâmica gametogênica, não era necessário, a princípio, a realização de estudo ultraestrutural das células germinativas, pois as diferenças entre as categorias de células são visíveis pela microscopia de luz.

1.2.CICLO REPRODUTIVO EM ANUROS

Anuros têm sido objetos de estudo de vários trabalhos os quais caracterizam a dinâmica reprodutiva da espécie e a classificam de acordo com sua permanência ou não na aptidão reprodutiva durante um intervalo de tempo. Esse intervalo de tempo é chamado de ciclo reprodutivo e geralmente os pesquisadores o avaliam por durante um ano (Jørgensen, 1981; Kanamadi & Saidapur, 1982; Huang *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 1998; Sasso-Cerri *et al.*, 2004; Ferreira & Mehanna, 2008; Kaptan & Murathanoglu, 2008; Santos & Oliveira, 2011; Ferreira & Mehanna, 2012; Villagra *et al.*, 2012) ou múltiplos (Medina *et al.*, 2004; Saha & Gupta, 2011; Akef, 2014).

O ciclo reprodutivo, no geral, pode ser classificado como descontínuo ou potencialmente contínuo ou contínuo. A última categoria pode apresentar variações de acordo com a interpretação do pesquisador (Huang *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 1998).

A principal característica presente em espécies que apresentam ciclo reprodutivo do tipo contínuo é a produção de espermatozóides durante todas as épocas do ano, inclusive no inverno, o qual não é tão evidente em regiões de clima temperado. No ciclo reprodutivo do tipo descontínuo a produção de espermatozóides é vista em apenas uma época do ano na qual os indivíduos investem muita energia em produção de gametas e, no geral, a época de produção de espermatozóides é no final da primavera e início do verão (Rastolgi *et al.*, 1986). Já no tipo potencialmente contínuo de ciclo reprodutivo ocorre produção de espermatozóides durante praticamente todo o ano, com exceção de um curto período.

O que tais pesquisadores supracitados acreditam é que para regiões tropicais do globo o tipo de ciclo reprodutivo encontrado para anuros é contínuo ou potencialmente contínuo, pois um fator bastante influente na reprodução de anuros é a pluviosidade, já que são indivíduos dependentes de corpos d'água para oviposição e desenvolvimento. Em contrapartida, no clima temperado são encontradas espécies que apresentam ciclo reprodutivo do tipo descontínuo, com fator ambiental limitante relacionado à temperatura, já que em boa parte do ano a temperatura dessas regiões é amena.

Embora o clima seja um fator extremamente importante para a reprodução de anuros e é normalmente relacionado em estudos de reprodução, a forma de análise empregada pelos pesquisadores nos trabalhos de ciclo reprodutivo pode transitar entre variação anual no índice gonadossomático, variação no diâmetro do túbulo seminífero, até presença/ausência de espermatozóides no interior dos túbulos seminíferos, e com isso a interpretação do

pesquisador pode ir além do que é descrito como o padrão: ciclo reprodutivo contínuo para regiões tropicais e descontínuo para regiões temperadas.

1.3.DINÂMICA GAMETOGENICA

As variações quantitativas dos tipos celulares observados ao longo de um determinado tempo na espermatogênese nós chamamos de dinâmica espermatogênica. A dinâmica gametogênica é uma das perspectivas em estudos sobre ciclo reprodutivo e dá suporte a determinações sobre períodos favoráveis à reprodução. Como exemplo desse tipo de avaliação, o trabalho de Ferreira & Mehanna. (2008), mostra aspectos reprodutivos através de características da variação no processo de espermatogênese ao longo de um ciclo anual descrito para *Dendropsophus minutus* (Hylidae, Anura). Este trabalho sugere que as variações na dinâmica espermatogênica podem estar relacionadas às variações na pluviosidade em uma área de estudo cuja ação antrópica é reduzida ou nula em uma região preservada de Chapada dos Guimarães, estado do Mato Grosso, de tal forma que períodos com maiores chuvas são os períodos de maior atividade gamética em Hylideos (Ferreira & Mehanna, 2012).

Ainda considerando espécies que vivem em condições naturais com baixa antropização, como na Serra da Bodoquena e no Pantanal Sul-matogrossense, Ferreira *et al.*, (2009) constataram que alguns anuros da família Hylidae, apresentam em todas as épocas do ano todas as células de linhagem germinativa da espermatogênese visíveis em análise histológica testicular. Já alguns anuros da família Leptodactylidae, apresentam todas as células da linhagem germinativa somente no período chuvoso. Essas variações nas características da organização dos epitélios seminíferos, assim como da evidente diferença na quantidade de espermatozóides no interior dos túbulos, demonstram que anuros podem apresentar diferenças na dinâmica espermatogênica ao longo do ano: de forma cíclica e constante para as espécies estudadas da família Hylidae, e de forma acíclica, com liberação explosiva de espermatozóides, para as espécies estudadas da família Leptodactylidae. No entanto, as regiões de Serra da Bodoquena e do Pantanal são áreas com períodos críticos de escassez e abundância de chuvas, diferentemente dos analisados na região de Chapada dos Guimarães que eram provenientes de uma área de fonte de água mineral com constante presença de água. Aparentemente, os regimes pluviométricos mais estressantes são determinantes para períodos de parada reprodutiva em espécies da família Leptodactylidae, mas não determinam outra estratégia para espécies da família Hylidae que passam a aproveitar a mínima quantidade de água como área de desova. Caso as condições de presença

de água sejam constantes e favoráveis, as espécies da família Hylidae aparentemente mudam sua estratégia e passam a ter períodos de pausa reprodutiva e um aparente “descanso” fisiológico.

Além desses dois resultados, os quais se confrontam pelo fato de ambos serem feitos com animais da região tropical e com uma diferente forma de análise, Villagra *et al.*, (2012) também mostraram diferenças em suas análises usando outra forma de análise e a espécie *Leptodactylus chaquensis*, pertencente a família Leptodactylidae. Villagra *et al.* (2012) realizaram coletas de seis indivíduos no período compreendido entre os meses de dezembro a março, período considerado como reprodutivo para a espécie, e outros seis indivíduos da mesma espécie no período compreendido entre os meses de maio a julho, período considerado como pós reprodutivo. A região de coleta foi a província de Tucumán ao norte da Argentina, região de clima subtropical. Villagra *et al.*, (2012) calcularam o índice gonadosomático dos dois grupos de indivíduos e depois, através da histologia selecionaram cem túbulos seminíferos os quais mediram o maior e o menor diâmetro. Villagra *et al.*, (2012) concluíram que *L. chaquensis* apresenta um ciclo reprodutivo potencialmente contínuo, já que todas as células da linhagem espermatogênica foram vistas nos dois períodos avaliados, vivendo em região subtropical, diferentemente do que foi encontrado para *L. chaquensis* e *L. podicipinus* que habitam região tropical (Ferreira *et al.*, 2008) o qual é do tipo descontínuo.

Outros exemplos que contradizem o fato de que anuros de regiões temperadas apresentam ciclo reprodutivo do tipo descontínuo são: *Pelophylax esculentus* (= *Rana esculenta*) (Rastolgi *et al.*, 1978), *Pelophylax perezi* (= *Rana perezi*) (Delgado *et al.*, 1989), *Pelophylax ridibundus* (= *Rana ridibunda*) (Kaptan & Murathanoglu, 2008), *Glandirana rugosa* (= *Rana rugosa*) e *Pelophylax nigromaculatus* (= *Rana nigromaculata*) (Ko *et al.*, 1998).

Rastolgi *et al.*, (1978), fizeram contagem do número de cistos das diferentes células germinativas dos túbulos seminíferos de *Lithobates catesbeianus* provenientes da Itália, e pelo fato do inverno apresentar queda na temperatura, as células finais da linhagem gametogênica não foram observadas naquele período em animais da natureza, embora tenham sido observadas em animais de laboratório, mantidos a temperaturas mais elevadas.

Delgado *et al.*, (1988), fizeram contagem de cistos dos diferentes estágios espermatogênicos de *Pelophylax perezi*, provenientes do nordeste da Espanha, e o ciclo reprodutivo foi classificado como potencialmente contínuo já que todas as células espermatogênicas foram vistas em todos os meses do ano.

Kaptan & Murathanoglu, (2008), avaliaram a variação da quantidade das células espermatogênicas dos túbulos seminíferos de *Pelophylax ridibundus* provenientes da Turquia, e estabeleceram o ciclo reprodutivo desta espécie naquela região como potencialmente contínuo, já que na estação de inverno o número de espermatozóides foi menor que o número de espermatócitos.

Ko *et al.*, (1999), analisaram túbulos seminíferos de *Glandirana rugosa* e *Pelophylax nigromaculatus* provenientes da Coreia e contataram que o ciclo reprodutivo dessas duas espécies é potencialmente contínuo, a partir do pequeno intervalo de tempo em que o índice gonadossomático apresentou ser baixo. Já para *Rana dybowskii* (Ko *et al.*, 1999), espécie que habita áreas montanhosas da Coreia, o ciclo reprodutivo é caracterizado como descontínuo.

Indivíduos de *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) (Sasso-Cerri *et al.*, 2004), provenientes do Centro de Aquacultura da Escola de Medicina Veterinária de Jaboticabal, o ciclo reprodutivo foi caracterizado como contínuo. Esses estudos corroboram a hipótese de que ciclo reprodutivo do tipo contínuo ocorre em áreas tropicais e ciclo reprodutivo descontínuo ocorre em áreas temperadas. Ko *et al.*, (1999), avaliaram o índice gonadossomático, a media de peso do testículo, variação dos níveis de testosterona e presença e ausência de células espermatogênicas ao longo do período. Sasso-Cerri *et al.*, 2004, mediram o diâmetro do lóbulo seminífero e a densidade volumétrica do tecido intersticial, dos lóbulos seminíferos e dos ductos excretores a partir de procedimentos histológicos dos testículos. Por fim, Huang *et al.*, 1996, e depois, Huang *et al.*, 1997, estudaram o ciclo reprodutivo de machos de *Bufo bankorensis* e *Duttaphrynus melanostictus* (= *Bufo melanostictus*), respectivamente, espécies da família Bufonidae encontradas na região central do Taiwan, caracterizada por apresentar um de clima tropical marinho e localizada ao sudeste da China. Huang *et al.*, 1997 caracterizaram o ciclo espermatogênico de *D. melanostictus* como contínuo flutuante, verificando a presença de espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos em todos os meses estudados entre o período de março de 1990 até março de 1991, e para *B. bankorensis* o ciclo espermatogênico foi caracterizado como potencialmente contínuo a partir da mesma forma de análise empregada, mostrando que, além da importância dos procedimentos histológicos no estudo do ciclo reprodutivo, a produção de espermatozóides pode variar em uma mesma localidade, no mesmo período entre espécies próximas.

Avaliar características da gametogênese por meio de técnicas histológicas melhora muito a qualidade dos parâmetros utilizados para determinar se um organismo está apto à reprodução ou não. A proposta de analisar variações anuais tornam-se mais interessantes ao

adicionar à forma de análise dados morfométricos e quantitativos da gametogênese determinando assim uma dinâmica que pode ter um ciclo anual ou com maior tempo de observação. A escolha do organismo vai direcionar também o tipo de variável relacionada a essa análise e os fatores que podem estar relacionados ou não.

1.4.FORMAS DE ANÁLISE EM ESTUDOS DE CICLO REPRODUTIVO DE ANUROS

A continuidade ou descontinuidade na produção de gametas é o fator que caracteriza o ciclo reprodutivo dos anuros, embora a forma de análise empregada por tais estudos varia de acordo com o trabalho e de acordo com os aspectos a serem abordados que são selecionados pelo pesquisador, e a forma de análise pode tendenciar a interpretação do pesquisador a respeito da continuidade ou descontinuidade na produção de gametas.

Uma das formas de análise mais usada por pesquisadores é a avaliação da variação do índice gonadosomático. São bastante comuns trabalhos que usam dessa forma de análise (El-Wailly, 2002; Villagra *et al.*, 2012;). Nessa forma de análise, os pesquisadores avaliam a possível variação desse índice ao longo do tempo e consiste em indicar os períodos de maior produção de gametas com base no peso das gônadas em relação ao peso total do corpo do animal.

Trabalhos que empregam como forma de análise a variação da média do diâmetro do túbulo seminífero ao longo do tempo também são realizados em análises de biologia reprodutiva em anuros (Sasso-Cerri *et al.*, 2004; Ferreira & Mehanna, 2012). Tais trabalhos indicam, com base no maior ou menor diâmetro do túbulo seminífero, os períodos nos quais os indivíduos estão aptos à reprodução.

O sistema proposto por Saidapur (1983), também é uma forma de análise empregada. Nessa forma de análise a atividade espermatogênica é avaliada de acordo com a presença ou ausência de células as quais são características já prescritas como um “tipo” de túbulo seminífero. Por exemplo, túbulos seminíferos preenchidos apenas por espermatogônias (tipo 1); túbulos seminíferos preenchidos por espermatogônias e espermatócitos (tipo 2), e assim por diante. Ao final é estabelecida a proporção relativa dos tipos de testículos os quais caracterizam um período como reprodutivo ou não para a espécie.

Outra forma de análise também usada para inferir sobre períodos favoráveis a reprodução é a simples presença ou ausência de espermatozóides nos túbulos seminíferos (Ferreira *et al.*, 2009). Os indivíduos que apresentam espermatozóides na luz dos túbulos

seminíferos são considerados como aptos a reprodução, e aqueles que não apresentam espermatozóides na luz dos túbulos são considerados inaptos à reprodução.

Ainda existem trabalhos que demonstram que a partir da média de medidas de área de cistos germinativos é possível inferir sobre períodos favoráveis a reprodução (Cassel *et al.*, 2013). Assim sendo, os indivíduos que apresentam maior área cística de espermátides e maior área de espermatozóides são considerados aptos à reprodução e aqueles que possuem menor área cística de espermátides e menor área de espermatozóides são considerados inaptos à reprodução.

Embora exista variação na forma de análise algumas podem se apresentar mais eficientes que outras no que diz respeito à confiabilidade dos dados.

Em nosso estudo decidimos quantificar a espermatogênese e a ovogênese pela contagem celular, e não cística como no caso da espermatogênese, a partir de procedimentos histológicos, mostrando que esta forma de análise é possível de ser feita abordando aspectos como: o período de recrutamento, períodos de maior produção e diferenciação de gametas, influencia dos fatores ambientais sobre a produção de gametas e ainda a influencia das ações antrópicas sobre a produção de gametas.

Do nosso ponto de vista, nossa forma de análise fornecerá maior confiabilidade na análise do que as anteriormente citadas pela eficiência em inferir sobre uma maior quantidade de aspectos sobre a biologia reprodutiva com a mesma metodologia usada pelos autores anteriormente citados.

1.5.CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

Rhinella schneideri (Anura, Bufonidae) é uma espécie bastante comum na América do Sul, de grande porte (13 a 15 cm), terrestre, de hábito noturno, encontrada em áreas abertas e peridomiciliares. De acordo com dados ecológicos (Uetanabaro *et al.*, 2008) esta espécie reproduz de forma explosiva ocorrendo esporadicamente na estação seca até o início da estação chuvosa. As fêmeas depositam cerca de 5000 ovos em cordões gelatinosos em corpos d'água permanentes ou temporários.

De acordo com a IUCN, web site acessado dia 12/06/2015, é uma espécie nativa dos países Argentina, Brasil, Paraguai Uruguai e Bolívia, possui uma ampla tolerância a habitats e o número de indivíduos das populações desta espécie tende a aumentar nos próximos anos.



Figura 2. *Rhinella schneideri*

1.6. CARACTERIZAÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Todas as abordagens sobre ciclo reprodutivo em anuros são feitas com espécies que vivem em áreas preservadas (Martins, 1988; Bastos & Haddad, 1999; Melchioris et al., 2004; Oliveira & Santos, 2008; Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2009; Peruquetti et al., 2011; Santos et al., 2011; Ferreira & Mehanna, 2012; Villagra et al., 2012). Desconhece-se a dinâmica gametogênica e os ciclos reprodutivos em áreas urbanas e altamente antropizadas. Essa variável extraespecífica pode determinar novas estratégias, as quais podem ou não estar necessariamente relacionadas às variações pluviométricas.

O córrego do barbado, o qual é a localidade de onde os espécimes são provenientes, é totalmente urbano, estando na porção centro-oeste de Cuiabá e sendo um dos afluentes do Rio Cuiabá. Devido a Copa do Mundo de Futebol no ano de 2014, estão sendo realizadas obras de mobilidade urbana desde o ano de 2011 até o momento (agosto de 2015). No período compreendido entre outubro de 2007 a setembro de 2008, referente ao primeiro ano contínuo de coleta, o córrego do barbado apresentava-se como um ambiente já antropizado, porém

ainda preservando uma mata ciliar de onde obtivemos nossos espécimes para estudo. Dentre as obras realizadas na cidade ocorreu a construção de um viaduto que cruza o córrego e a construção de uma avenida que percorre todo o perímetro do córrego onde foram coletados os espécimes. Ao longo do segundo ano de coleta, compreendido entre agosto de 2012 a julho de 2013, o córrego foi canalizado e a paisagem, bem como a composição vegetal e animal mudou, restando apenas as obras desta avenida. Permaneceu ao lado dessa área o zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso onde mantivemos as coletas após o início das obras.



Figura 3A. Área de estudo – campus Cuiabá da UFMT em 2007/2008.



Figura 3B. Área de estudo – campus Cuiabá da UFMT em 2012/2013.

2. Objetivos

1. Descrever a morfologia das células germinativas de *R. schneideri*;
2. Quantificar as células pré-gaméticas e gaméticas a cada mês do ano e durante dois anos não consecutivos;
3. Avaliar se a quantidade de células na gametogênese de *R. schneideri* variou juntamente com mudanças ambientais nos dois períodos;
4. Relacionar as possíveis diferenças no ciclo reprodutivo em *R. schneideri* entre machos e fêmeas.

3. Referências bibliográficas

- Akef, M. S. A. Reproductive Strategies of Leopard Toad and Mascarene Frog from Giza, Egypt. *Zoological Science*. 31: 37-44. 2014.
- Aguiar-Jr, O.; Lima, A. P.; Bão, S. N.; Recco-Pimentel, S. M. Sperm ultrastructure of the Brazilian Amazon poison frog *Epipedobates trivittatus* and *Epipedobates hahneli* (Anura, Dendrobatidae). *Acta Zoologica (Stockolm)*. 85: 21 – 28. 2004.
- Alberts B.; Bray, D.; Lewis, J. *Biologia molecular da célula*. 5ª edição, 1396 pag., 2009.
- Alcaíde, A. P.; Ponssa, M. L.; Alcaíde, F. J. P.; Alcaíde, M. F. Histologia de ovário em hembras vitelogénicas de *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae) *Acta Zoologica Lilloana*. 56: 44 – 53, 2012.
- Bastos, R. P.; Haddad, C. F. B. Atividade reprodutiva de *Scinax rizibilis* (Bokermann) (Anura, Hylidae) na floresta atlântica, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 16: 409 - 421, 1999.
- Burgos, M. H. & Fawcett, D. W. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum*, hensel. *J. Biophysic and Biochem. Cytol*. 2: 223 – 253, 1956.
- Coady K. K.; Murphy, M. B.; Villeneuve, D. L.; Hecker, M.; Jones, P. D.; Carr, J. A.; Solomon, K. R.; Smith, E. E.; Van Der Kraak, G.; Kendall, R. J. & Giesy J. P. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentration in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62: 160-173, 2005.
- Costa, C. L. S.; Lima, S. L.; Andrade, D. R.; Agostinho, C. A. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da Rã – touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. *R. Bras. Zootec*. 27: 642 – 650, 1998.
- Dumont, J. N. Oogenesis in *Xenopus laevis*. (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*. 136: 153 - 179. 1972.
- El-Wailly, A. J. 2002. Seasonal changes of the testes in the marsh frog *Rana ridibunda* Pallas, 1771. *Bull. Iraq nat. Hist. Mus*. 9: 13-18.
- Falconi, R., Dalpiaz, D., & Zaccanti, F. Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia, Anura) 1 . Sex Differentiation. *Anatomical Record*. 388: 378–388, 2004.

- Falconi, R., Dalpiaz, D., & Zaccanti, F. Morphological aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia, Anura): bidder's organ differentiation. *Anatomical Record*. 290: 801–813, 2007.
- Ferreira, A.; Mehanna, M.; Prado, C.A.P. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) During the reproductive cycle in the pantanal, Brazil. *Biocell*. 32: 185-194, 2008.
- Ferreira, A.; Santos, A. B. R.; Mehanna, M. Organização celular dos testículos em Hylidae E Leptodactylidae, no pantanal (estado De Mato Grosso Do Sul, Brasil) *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 31: 447-452, 2009.
- Ferreira, A. & Mehanna, M. Seasonal testicular changes in *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura, Hylidae). *Biocell*. 36: 57-62, 2012.
- Garda, A. A.; Colli, G.; R. Aguiar-Jr, O.; Recco-Pimentel, S. M.; Bão, S. N. The ultrastructure of the spermatozoa of *Epipedobates flavopictus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae), with comments on it evolutionary significance. *Tissue & Cell*. 34: 356 – 364, 2002.
- Heyes, T.; Hanston, K.; Tsui, M.; Hoang, A.; Haeffele, A. V. Feminization of male frogs in the wild. *Nature*. 419: 895-896, 2002.
- Heyes, T.; Stuart, A. A.; Mendoza, M.; Collins, A.; Noriega, N.; Vonk, A.; Johnston, R. L. & Kpodzo, D. Characterization of atrazine-induced gonadal malformation in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): support for the demasculinization/ feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives*. 114: 134-141, 2006.
- Heyes, T. B.; Khoury, V.; Narayan, A.; Nazir, M.; Park, A.; Brown, T.; Adame, L.; Chan, E.; Buchholz, D.; Stueve, T. & Gallipeau, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS*. 107: 4612-4617, 2010.
- Huang, W. S.; Lin, J. Y. & Yu, J. Y. L. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zoological Science*. 14: 497 – 503, 1997.
- Huang, W. S.; Lin, J. Y. & Yu, J. Y. L. The Male Reproductive Cycle of the Toad, *Bufo bankorensis*, in Taiwan. *Zoological Studies*. 35: 128 – 137, 1996.
- Huang, W. S. & Yu, J. Y. L. Reproductive Characteristics of *Bufo bankorensis* at Two Elevations in Taiwan. *Zoological Science* 22:111 - 117. 2005

- Jørgensen, C. B. Ovarian cycle in a temperate zone frog, *Rana temporaria*, with special references to factors determining number and size of eggs. J. Zool., Lond. 195: 449-458.
- Kanamadi, R. D. & Saidapur, S. K. Pattern of Ovarian Activity in the Indian Toad *Bufo melanotictus* (Schn.). Proc. Indian. Natn. Sci. Acad. 3: 307-316. 1982.
- Kaptan, E.; Murathanoglu, O. Annual Morphological Cycles of Testis and Thumb Pad of the Male Frog (*Rana ridibunda*). The Anatomical Record. 219: 1106-1114. 2008.
- Ko, S. K.; Kang, H. M.; Im, W.; Kwon, H. B. Testicular Cycles in Three Species of Korean Frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, and *Rana dybowslii*. General and Comparative Endocrinology. 111: 347-358. 1998.
- Krishnamurthy, S. V.; Meenakumari, H. P. & Vasudev, V. Nitrate-induced morphological anomalies in the tadpoles of *Nyctibatrachus major* and *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae). Turk. L. Zool. 32: 239-244, 2008.
- Lee, M. S. Y & Jamieson, B. G. M. The ultrastructure of the spermatozoa of Myobatrachid frogs (Anura, Amphibia) with phylogenetic considerations. Acta Zoologica (Stockolm). 73: 213 – 222, 1992.
- Lee, M. S. Y & Jamieson, B. G. M. The ultrastructure of the spermatozoa of bufonids and hylid frogs (Anura, Amphibia): implications for phylogeny and fertilization biology. Zoologica Scripta. 22: 309 – 323, 1993.
- McCoy, K. A.; Bortnick, L. J.; Campbell, C. M.; Hamlin, H. J.; Guillette-Jr, L. & Mary, C. M. St. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. Environmental Health Perspectives. 116: 1526-1532, 2008.
- Martins, M. Biologia reprodutiva de *Leptodactylus fuscus* em Boa Vista - Roraima (Amphibia: Anura). Rev. Brasileira. Biol., 48: 969 - 977, 1988.
- Melchior, J., Di-Bernardo, M., Pontes, G. M. F. Oliveira, R. B. Solé, M. E. Kwet, A. Reprodução de *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. Phyllomedusa. 3: 61-68, 2004.
- Moresco, R. M.; Margarido, V. P. & Oliveira, C. A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. 132: 6-11, 2014.
- Montero, R. & Pisanó, M. Ciclo espermatogénico de dos especies de *Telmatobius* del noroeste Argentino. Amphibia-Reptilia. 11: 97-110, 1990.
- Murphy, M. B.; Hecker, M.; Coady, K. K.; Tompsett, A. R.; Jones, P. D.; Du Preez, L. H.; Everson, G. J.; Solomon, K. R.; Carr, J. A.; Smith, E. E.; Kendal, R. J.; Van Der Kraak,

- G. & Geisy, J. P. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicologic*. 76: 230-245, 2006.
- Oka, T. Tooi, O.; Mitsui, N.; Miyahara, M. Ohnishi, Y.; Takase, M.; Kashiwagi, A. Shinkai, T.; Santo, N. & Iguchi, T. Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquatic toxicology*. 87: 215-226. 2008.
 - Oliveira, C.; Zanetoni, C.; Zieri, R. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chil. Anat*. 20: 263 – 268, 2002.
 - Oliveira, C.; Vicentini, C. A.; Taboga, S. R.. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura: Hylidae). *Caryologia* (Firenze). 56: 75-83, 2003.
 - Oliveira, C.; Santos, L. R. S. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira De Zoologia* (Impresso). 21: 919-923, 2004.
 - Oliveira, C.; Santos, L. R. S. Histological Aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*. 39: 1266-1270, 2008.
 - Orton, F.; Carr, J. A.; Handy, R. D.; Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Envirom. Toxic. And Cheminstry*. 25: 65-71, 2006.
 - Peruquetti, R. L.; Taboga, S. R.; Santos, L. R. S.; Oliveira, C.; Azeredo-Oliveira, M. T. V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)? *Micron*. 42: 87-96, 2011.
 - Prado, C. P. D. A., Abdalla, F. C., Silva, A. P. Z., & Zina, J. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. *Braz. J. morphol. Sci*. 21: 177–184, 2004.
 - Rastolgi, R.; Iela, L.; Delrio, G.; Bagnara, J. T. 1986. Reproduction in the Mexican Leaf Frog, *Pachymedusa dacnicolor* II. The Male. *General and Comparative Endocrinology*. 62: 23-35.
 - Reeder, A. L.; Foley, G. L.; Nichols, D. K.; Hansen, L.G.; Wikoff, B.; Faeh, S.; Eisold, J.; Wheeler, M.B.; Warner, R.; Murphy, J.E. & Beasley, V.R. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexuality in cricket frogs (*Acris crepitans*). *Environmental Health Perspectives*. 106: 261 – 266, 1998.

- Rodriguez – Gomez, Y.; Sanz-Ochorena, A.; Segura – Valdez, M. L.; Lara – Martinez, R.; Jimenez – García, L. F. Morfologia del ovário em ranas del renero *Eleutherodactylus* (Anura: *Leptodactylidae*). Acta Microscopica. 19: 271 – 278, 2010.
- Saha, B. K. & Gupta, B. B. P. Studies on annual activity cycle of gonads and breeding behavior of the endangered frog, *Rana leptoglossa* (Cope, 1868). International Journal Science Nature. 683- 691. 2011.
- Saidapur, S. K. Patterns of testicular activity in Indian amphibians. Indian Rev Life Sci. 3:157–184. 1983.
- Santos, L. R. S.; Oliveira, C. Histological aspects and structural characteristics of testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). Micron. 39: 1266 – 1270, 2008.
- Santos, L. R. S.; Franco-Belussi, L.; Oliveira, C. Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). Zoological Science. 28: 840 – 844, 2011.
- Sanz-Ochotorena, A.; Segura-Valdez, M. L.; Rodriguez-Gmez, Y.; Lara-Martnez, R. Y Jiménez-García, L.F. Estructura y ultraestructura de la gonada de los machos de *Bufo fustiger* (Anura: Bufonidae). Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas, 11: 81-86, 2008.
- Sasso-Cerri, E. Faria, F. P.; Freymüller, E.; Miraglia, S. M. Testicular Morphological Changes During the Seasonal Reproductive Cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. Journal of Experimental Zoology. 301A: 249-260. 2004.
- Taboga, S. R. & Dolder, M. A. H. Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae) Rev. Bras. Ciên. Morfol. 8: 66 – 71, 1991.
- Veiga-Menoncello, A. C. P.; Lima, A. P.; Recco-Pimentel, S. M. Sperm morphology of five species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) from Brazil, with phylogenetic comments. Acta Zoologica (Stockolm). 87: 174 – 157, 2006.
- Veiga-Menoncello, A. C. P.; Aguiar-Jr, O. Lima, A. P.; Recco-Pimentel, S. M. The biflagellate spermatozoa of *Colostethus marchesianus* (Melin, 1941) (Anura, Dendrobatidae) from the type locality and *Colostethus* sp. (aff. *Marchesianus*.) from different locality: A scanning and transmission eletron microscopy analysis. Zoologischer Anzeiger. 246: 49 – 59, 2007.
- Villagra, A. L. I.; Cisint, S. B.; Crespo, C. C.; Medina, M. F.; Ramos, I.; Fernandez, S. N. Spermatogenesis In *Leptodactylus Chaquensis*. Histological study. Zygote. 22: 291-299, 2012.

- Villeco, E. I.; Monaco, M. E. & Sanches, S. S. Ultrastructural changes in the follicular epithelium of *Ceratophrys cranwelli* previtellogenic oocytes. *Zygote*. 15: 273 – 283, 2007.
- Yoshizaki, N, & Katagiri, C. Acrosome Reaction in Sperm of the Toad, *Bufo bufo japonicus*. *Gamete Research*. 6: 343-352, 1982.
- Zieri, R.; Taboga, S. R.; Oliveira, C. de. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): aspectos ultra-estruturais. *Iheringia. Série Zoologia* (Impresso), Porto Alegre. 98: 193-199, 2008.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

4.1. Spermatogenic dynamics in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae)

Montezol *et al.*, 2015

Submetido ao periódico: International Journal of Morphology.

4.2. Ovogenic dynamics in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae).

Montezol *et al.*, 2015

À ser submetido ao periódico: Micron.

Authors: Montezol *et al.*

Running title: Dynamics of *Rhinella schneideri* spermatogenesis

Spermatogenic dynamics in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae)

Michel Montezol¹, Adelina Ferreira^{1,2}, Mahmoud Mehanna³

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, IB, Unicamp, Campinas, SP, Brasil¹. E-mail: michel_montezol@hotmail.com

Departamento de Biologia e Zoologia, IB, UFMT, Cuiabá, MT, Brasil². E-mail: adelina@ufmt.br

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Rondônia - UNIR – *campus* Rolim de Moura, Brasil³. E-mail: mahmoudmehanna@hotmail.com

Corresponding author: Michel Montezol - Departamento de Biologia Celular e Funcional, IB, CP 6109, Unicamp, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brasil.

Highlights: reprodução, gametogênese, estratégias reprodutivas, quantificação celular.

Resumo

Usamos as variações quantitativas observadas ao longo de dois períodos não consecutivos na produção dos espermatozóides de uma mesma população para avaliar as possíveis mudanças na dinâmica espermatogênica do anuro *Rhinella schneideri*. Os testículos dos animais foram excisados, submetidos a rotina histológica originando lâminas com cortes de 3µm de espessura nos quais as células foram contadas de acordo com sua categoria germinativa. Os resultados mostram seis categorias de células germinativas que foram descritas. Os indivíduos apresentam quatro tipos diferentes de morfologia do túbulo seminífero diferenciados conforme a presença ou ausência de células germinativas. Os aspectos morfológicos encontrados foram: túbulos com apenas as células germinativas iniciais da espermatogênese; túbulos seminíferos preenchidos com todas as células da linhagem germinativa; túbulos seminíferos preenchidos apenas por espermátides em diferenciação e túbulos seminíferos com presença de ovócitos pré-vitelogênicos em seu interior. A quantificação celular mostrou que todas as células germinativas apareceram em todos os meses dos dois períodos analisados. Também mostrou que existiu diferença entre os dois períodos analisados quanto ao período de maior produção de gametas, período nos quais havia maior número de indivíduos jovens na população e quanto o aparecimento de ovócitos pré-vitelogênicos, o qual ocorreu apenas no segundo período em análise.

Palavras-chave: gametogênese, reprodução, quantificação celular, túbulos seminíferos.

Abstract

We use quantitative variations observed during two nonconsecutive periods of the same population was evaluate possible changes in spermatogenic dynamics in *Rhinella schneideri*. The testes of the animals were excised and submitted to routine histological procedures, yielding sections with an adequate thickness, in which the cells were counted according to the germinal cell category. The results show the six categories of germ cells that have been described. Individuals have four types of seminiferous tubule morphology, differentiated according to the presence or absence of germ cells. These morphological features were: tubules with only the initial germ cells of spermatogenesis; seminiferous tubules filled with all the cell types of the germ line; seminiferous tubules filled only with differentiating spermatids and finally seminiferous tubules with the presence of pre-vitellogenic oocytes. Cell quantification shows that all the germ cell types appeared in every month of the periods analyzed. It also shows that there was a difference between the two periods analyzed, with a period of increased gamete production and a period in which there were more young individuals in the population, as well as the appearance of pre-vitellogenic oocytes, which occurred only in the second period analysed.

Keywords: gametogenesis, reproduction, cell quantification, seminiferous tubules.

1. Introdução

Spermatogenesis is the process in which stem cells proliferate and differentiate culminating in spermatozoon formation, a highly specialized cell. The quantitative variation in spermatogenesis observed over a certain period of time can be defined as dynamics of spermatogenesis.

The dynamics of spermatogenesis has been observed in studies of frog reproductive cycles, and has been evaluated according to continuity or discontinuity in the production of gametes throughout the year. Thus, gamete production for only a short period of time is called discontinuous, and has been observed in studies performed in temperate regions (Rastolgi *et al.*, 1986). On the other side, studies in tropical regions show a continuous pattern or potentially continuous production of gametes throughout the year (Huang *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2008; Kaptan & Murathanoglu, 2008; Díaz-Páez & Ortiz, 2001; Villagra *et al.*, 2012).

Regarding frogs which live in tropical regions, a study conducted by Ferreira *et al.*, (2009), with individuals of *Hylidae* and *Leptodactylidae* families, in Mato Grosso do Sul wetlands. In the *Hylidae* family all the germ cell types were found and release of sperm occurred at all times of the year. In the *Leptodactylidae* family, all the germ cells types were present only during the rainy season, featuring a discontinuous reproductive cycle with explosive release of sperm. Subjects were classified as fit to reproduce or not, considering the presence / absence of sperm in the seminiferous tubule.

Later, Ferreira & Mehanna (2012), in Chapada dos Guimarães (Mato Grosso, Brazil), conducted a study with individuals of *Dendropsophus minutus*, which belong to the *Hylidae* family, and characteristically have a reproductive cycle unlike that described by Ferreira *et al.*, (2009) but rather a discontinuous reproductive cycle. The criterion used by Ferreira & Mehanna (2012) was the difference of germ cell types, depending upon the seasonal weather (dry or rainy).

Other studies of frog reproduction were made with the species, *D. minutus*, from other locations that also show differences in the type of reproductive cycle. The work of Santos & Oliveira (2008), in São José do Rio Preto (São Paulo, Brazil) is an example. In this paper, the authors characterized the reproductive cycle of *D. minutus* as continuous, based on the GSI and diameter of the seminiferous tubules of the individuals collected.

Using the same sample collected by Santos and Oliveira (2008), further analysis was conducted by Santos *et al.*, (2011), completing the study. Santos *et al.*, (2011) calculated the average volume occupied by each cell type in the seminiferous tubule, resulting in a difference in spermatozoon count between the dry season and the rainy season. Thus, the authors found that, although the species can breed throughout the entire year, individuals exhibit a preferential breeding season, resulting in a reproductive period and another post-reproductive period.

Oliveira *et al.*, (2007) studied reproductive, ecological and morphological aspects of *D. minutus* in Viçosa, MG. One of the ecological aspects studied were the vocalizations. The *D. minutus* vocalization occurred throughout the year, most often between the months of February to August. From September to January, although climatically favorable, there was a decrease of vocalization activity and density, indicating that the species extended its reproductive season, this being a fairly common reproductive strategy in tropical regions.

Some of the morphological parameters studied by Oliveira *et al.*, (2007) for *D. minutus* were gonadal mass measurements, GSI and the presence of spermatozoa in the seminiferous tubules. From the biometric analysis of body mass and the GSI in *D. minutus*, high testicular activity was observed in October, which is hot and wet. The least testicular activity was observed in June according to both parameters.

Oliveira *et al.*, (2007), also evaluated histologically the presence or absence of spermatozoa in the seminiferous tubules. Although small gonadal mass values and GSI were found in June, there was a higher concentration of spermatozoa in the seminiferous tubules, indicating reproductive capacity in this period. Therefore, it is apparent that gonadal mass and GSI were not sufficient to assess the testicular activity in *D. minutus*.

The use of histology to evaluate gametogenic features improves the quality of the parameters used to classify an organism as fit to reproduce or not. The proposal to analyze annual variations becomes more interesting when morphometric analysis and quantitative data of gametogenesis is added, thereby determining a dynamics that can be annual or observed over a longer period. The choice of the organism will also direct the type of analysis and variable related to this analysis and the factors that may or not be related.

There are several studies on frog reproductive biology (Novak & Robinson, 1975; Quinn & Mengden, 1984; Cherry, 1992; Singer & Gutiérrez, 1997; Bastos & Haddad, 1999; Toledo & Haddad, 2005; Wogel & Pombal Jr, 2007). Some are studies focused on the ecology of the group so that only macroscopic data are sufficient to understand some reproductive aspects in certain situations and locations. Research with a morphological

approach (Huang *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997), based on histological examination of the gonads enable refined analyses which define types of reproductive cycles and reproductive ability of gamete formation. However, the exact quantification of such reproductive ability can be more accurate considering the determination of the gamete formation process and reproductive potential throughout certain periods, as well as the influence of environmental factors on this dynamics.

Based on this information, our objective is to propose a new way of analyzing gametogenesis, using a methodology for quantifying pre-gametic and gametic cells at different periods and under different environmental conditions. For this purpose, the most consistent scenario is to use as an anuran, a model easily found in the Brazilian savannah, in all seasons, such as the *R. schneideri* anuran (Anura, Bufonidae).

2. Material e Methods

48 individuals were collected from October 2007 to September 2008, which were deposited in the zoological collection of vertebrates at Federal University of Mato Grosso, and another 90 individuals, collected by us, under authorization granted by Sisbio number 35287, in the period between August 2012 to July 2013. In each month, the samples were taken at night, with an hour of active search per month. After collected, the animals they were taken to the Zoological Collection of Vertebrates of the Federal University of Mato Grosso where they were listed. The specimens were euthanized with ether according to Medina *et al.*, (2004), the testicles removed, and fixed in a 10% formaldehyde solution for one day, dehydrated in 70% ethanol for 24 hours and then 95% alcohol for 4 hours. The samples were embedded in infiltration resin type glycol methacrylate and 95% alcohol in the ratio 1: 1 during two days in open microtubes in a refrigerator. After this period the samples were embedded in pure infiltration resin for 24 hours. Finally the samples were immersed in inclusion resin. The microtomy was done semi-serially with 3 sections per sample. Each section was 3µm thick and the distance between each section collected was 30 micrometers. The sections were stained with aqueous 1% toluidine blue solution.

Subjects were classified as fit or unfit to reproduce according to the observation of histological slides. Considered suitable were those in which secondary spermatocytes and spermatids were found combined with spermatozoa in the seminiferous tubules (final germline cells), while the unfit specimens had only spermatogonia and primary spermatocytes (initial germline cells).

To estimate the number of cells in each seminiferous tubule, 10 seminiferous tubules were randomly selected in each section, and photographed with the 40X objective to count germ cells present in all tubule cysts. The software used was *Leica LAS Interactive Measurement*. 4140. Seminiferous tubules were analyzed for a total of 138 individuals.

As suggested by Huang *et al.*, (1996), environmental factors that influence the frog reproductive cycle are temperature, photoperiod and rainfall. We select only the rainfall factors in correlation with gametogenic dynamics since temperatures below 20° C are rarely observed in the region and the photoperiod is constant.

The rainfall data for the region were obtained from the National Institute of Meteorology - INMET at the internet address <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>, accessed in 17/01/2015. These data were used to correlate the gametogenic dynamics with annual rainfall conditions.

3. Results

3.1 Spermatogenic cells.

The spermatogenic cells observed are the spermatogonia A and B (G1 and G2), primary and secondary spermatocytes (C1 and C2), initial spermatids and in spermiation (T1 and T2). All the cells described have differences in morphology and location. Both germ and somatic cells were observed, such as fibroblasts which participate in the interstitial testicle, myoid cells that participate in the functional testicle dynamic and endocrine cells.

3.1.1. G1 Spermatogonia are cells that are usually located in the peripheral region of the seminiferous tubule. When viewed the testicle of an individual unfit to reproduce, the seminiferous tubule is filled exclusively with this cell type. They are identified by their large volume and their cytoplasm is abundant. They do not form cysts and their nuclei are large and lobed, often showing a nucleolus per lobe. Although not forming cysts, the G1 spermatogonia appear almost always associated with a Sertoli cell (Fig. 1A), different from G2 spermatogonia which originate by mitosis of G1 spermatogonia.

3.1.2. G2 Spermatogonia form cysts and are smaller than G1, have bilobed nuclei, with a nucleolus for each lobe. G2 Spermatogonia type has condensed chromatin granulation and the cytoplasmic limit is not evident (Fig. 1B). They exhibit an organization in the cyst, sometimes forming a ring in the cyst, while still in the beginning of their successive mitotic divisions, sometimes randomly distributed, after successive mitotic divisions (Fig. 1B). G2 type spermatogonia divide by mitosis again and produce primary spermatocytes.

3.1.3. Primary spermatocyte - Displays loose chromatin and only one nucleolus. The number of cells varies according to the cyst and the cytoplasmic boundary is poorly defined (Fig. 1C).

3.1.4. Secondary spermatocyte – With half the size of primary spermatocytes, secondary spermatocyte nuclei have chromatin with a higher degree of condensation than the primary spermatocytes and sometimes it is possible to note the cytoplasmic boundary. The cytoplasm is granular presenting some clear areas and others that are dark (Fig. 1D).

3.1.5. Spermatids - After the second meiotic division, cells called spermatids are formed, which can present various aspects. At this stage of differentiation cells are subtly smaller than secondary spermatocytes, chromatin is strongly condensed and the cells still have a rounded shape, as in previous stages. With the spermiogenesis process the cells become elongated as are also the nuclei. Spermatids in the same cyst extend in the same direction and orientation (Fig. 1E and F).

We classified individuals into two categories: mature and young. Those with the presence of the final spermatogenic cells were considered adults, whereas those with only initial spermatogenic cells and small CRC values (snout-vent length), were considered as young.

3.2. Morphological aspects of the seminiferous tubules

According to the reproductive ability of the animal, we observed different morphological features related to cell composition in the seminiferous tubules. We defined four distinct morphological arrangements in the testicles of *R. schneideri*, as described below:

3.2.1. Seminiferous tubules with only germ cells in initial spermatogenesis (Figure 2 A - E): In a few individuals (N = 6) we observed testicles formed by seminiferous tubules mainly filled by spermatogonia. The tubules of these testicles had a greatly reduced diameter and abundant interstitial tissue with somatic cells in evidence. In some tubules we found secondary G2 spermatogonia and primary spermatocytes. These tubules rarely had secondary spermatocytes and spermatids in differentiation.

3.2.2. Seminiferous tubules filled with all germline cells (Fig. 3A - B.): Although differentiating spermatids are the main feature of this category, we observed all germ cells types in these tubules. The seminiferous tubules of these animals were apparently larger than most of the tubules filled with primary spermatogonia and the interstitial tissue was minimal. Most of the frogs had this structure (Fig. 4).

3.2.3. Presence of oocytes in the seminiferous tubules (Fig. 4 A - C): In subjects observed in March, May and June 2013, we saw female germ cells (pre- vitellogenic oocytes) within the seminiferous tubules of male subjects with male external morphological features. The oocytes had a nucleus with a large nucleolus and some peripheral nucleoli, sometimes it was possible to observe lampbrush chromosomes in the nucleus, the nuclear envelope was not undulated and the oocyte showed follicular cells and part of the cell was fixed to the wall of the seminiferous tubule, which simultaneously presented other male germline cells.

3.3. Cell Quantification

3.3.1. The period of 2007-2008: In Fig. 5A, which shows the quantification of germ cells in *R. schneideri*, during the 2007-2008 period, for all months of the year we observed spermatid differentiation in the seminiferous tubules of the testicles of these individuals.

In October 2007 corresponding to the beginning of the rainy season, the proportion of initial spermatogenic lineage cells was lower compared to the final cell lineage. In November, December and January considering the proportion of the final spermatogenic cell types increased compared to October, and in January the proportion of spermatids in differentiation was over 60% of the total cell count.

In February 2008 the proportion of the spermatogenic cells in the final cell line decreased again, though the proportion of differentiating spermatids was even higher than all other cells together. These values remained in March and April, although the proportion of spermatids in differentiation was a bit lower in this period.

We can see that there are only two times during the year in which the proportion of young germ cells of the spermatogenic lineage is greater than the proportion of initial cells (August and May, with 53.5 % and 51 % respectively), still they continue to differentiate to form sperm (26% of cells counted in August and 32 % of the cells counted in May are in the spermiogenic process) .

In June 2008, the proportion of final cells of the spermatogenic lineage increased again. In July it remained at levels similar to June and then in August the final germ cells again had lower proportional values in relation to the initial germ cells. The month of September 2008 showed great similarity to the values of October.

It is possible to show that the months of February and April 2008 the seminiferous tubules of the individuals had the highest proportional amounts of spermatogonia. The month in which we find individuals with seminiferous tubules containing the lowest proportions of

the initial cells of the spermatogenic lineage was December and November 2007, followed by January 2008.

3.3.2. Period corresponding to 2012-2013: Figure 5B shows the quantification of germ cells of *R. schneideri* during the period 2012-2013.

In the first month of the period, August 2012, we found that the proportion of elongating spermatids (T2) is greater than the proportion of all other cells of the germ line together. In September and October 2012 the amount of T2 decreases while the proportion of spermatocytes 2 (C2) and initial spermatids (T1) increase, maintaining the high proportion of the final cells of the germ line .

The proportion of T2 continues to decline in November and December 2012 and January 2013. Then in February, we can see that this is the month in which the proportion of final germ cells of the spermatogenic lineage is smaller than the proportion of young germ cells, even though it is the rainy season. In this month, the amount of primary spermatocytes is higher than that of spermatids in differentiation (36 % and 26 % respectively). Also in this month, the amount of spermatogonia counted in the seminiferous tubules is greater than that of all other months.

In March 2013 the proportion of initial cells of the spermatogenic lineage was again lower than the proportion of final cells. The sum of T1 and T2 has over 50 % of the total cells in seminiferous tubules analyzed in the months of March to July 2013.

The proportion of spermatogonia I was higher in the months of November, December 2012, January and February 2013. During all other months of the year, the proportion of young germ cells was lower than the proportion of germ cells undergoing meiosis, with a larger amount of spermatids being observed in October. It is important to note that, even in dry months, more than half the cells counted in seminiferous tubules of *R. schneideri* were spermatids.

4. Discussion

4.1. Morphology of spermatogenic cells

The consensus for vertebrates and with special attention to frogs, is that spermatogonia are the largest cells of the spermatogenic lineage (Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Santos & Oliveira, 2008; Iturriaga *et al.*, 2012) and they are located along the periphery of the seminiferous tubule (King, 1907; Burgos & Fawcett , 1956; Cavicchia & Moviglia, 1982). The new feature observed here is the nuclear morphology of the G1 type spermatogonia. The schematic design submitted by Burgos & Fawcett (1956), for

R. arenarum (= *Bufo arenarum*), was the first step towards the development of this hypothesis we present.

Although this information is well known, and diagrams have already indicated this characteristic, current publications such as Oliveira *et al.*, (2003b), for *Rhinella crucifer* (= *Bufo crucifer*), do not recognize this feature.

We noticed a lobed nucleus and presence of nucleoli distributed in the nuclear lobes. This may indicate that each nuclear portion with its respective nucleolus forms a type G2 spermatogonia, it is possible that each nuclear lobe of spermatogonia G1 originates a nucleus of G2 spermatogonia. One of the early studies on spermatogenesis of a family member of the Bufonidae species was carried out by King (1907). In her study, King (1907) also drew up a diagram of all stages of spermatogenesis in *Bufo lentiginosus* in which she says that spermatogonia have a large and polymorphic nucleus.

Some reports on spermatogenesis describe two types of spermatogonia type G2, light and dark (Oliveira *et al.*, 2003), differentiated by their nuclear morphology corresponding to its name. In our analysis, we observed the two morphological types, reported for these cells, spermatogonia type G2 clear and dark. Since our analysis included a large number of individuals, part of which was found in the zoological collection and another part recently captured from nature, we have another interpretation of these two cell types. The spermatogonia type G2, called dark, did not appear in the year of collection from August 2012 to July 2013, this period being related to the study of animals collected in nature and immediately anesthetized, fixed and dissected. Individuals for the period, October 2007 to September 2008, which were deposited in the vertebrate zoological collection of UFMT and maintained in 70% alcohol until the time of dissection (in January 2014), did not show any dark type G2 spermatogonia.

According to Oliveira *et al.*, (2003) dark spermatogonia are cells with dense chromatin in a drop shape in the nucleus and with differential cytoplasm having low dye affinity. Apoptotic cells also possess these characteristics (Alberts *et al.*, 2006) and they have been found in animal testicles deposited for some time in zoological collections. A delay in the contact of the gonads, which are inserted into the abdominal cavity, with the fixative can lead to an initial process of cell death in cells that appear with increased activity of synthesis and division. For counting and inferring gametogenic dynamics, we consider clear and dark spermatogonia as the same cell type.

The primary *R. schneideri* spermatocytes show differences between individuals (Burgos & Fawcett, 1956; Cavicchia & Moviglia, 1982; Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*,

2003b; Santos & Oliveira, 2008). All these studies demonstrate that the primary spermatocytes are morphologically similar to each other, the size of this cell being slightly smaller than the B cell. Meanwhile, in our histological analyses we found that the primary spermatocytes are larger than the spermatogonia. The secondary spermatocytes were rarely seen in our analysis even using various individuals, but it is supported by all the spermatogenic studies of frogs mentioned above.

Spermatids present high morphological variety as seen in the literature (King, 1908; Burgos & Fawcett, 1956; Cavicchia and Moviglia, 1983). At first the spermatid nucleus is rounded, with compact chromatin and the cells organized in cysts. A step forward is the elongation of the cell body, where the nucleus is located, then the cell acquiring a spindle shape.

Although the pattern of spermatid elongation and of chromatin condensation are similar to other bufonidae frogs, as the spermatids differentiate into spermatozoa, some structural features differ, and so, cystic organization provides way to organize the array of these cells, as has been corroborated by the literature (Burgos & Fawcett, 1956; Cavicchia and Moviglia, 1983; Zieri *et al.*, 2008; Ferreira & Mehanna, 2012).

4.2. Morphologic aspects and spermatogenic dynamics.

Although there is some diversity in aspects of the seminiferous tubules in *Rhinella schneideri*, most of the individuals analyzed presented all cell types of the germ line. Thus, this form of analysis (presence or absence of spermatozoa in the tubule light) indicates that the animals were fit to reproduce during the whole two periods of analysis.

Therefore, the reproductive cycle of males *R. schneideri* is of the continuous type, with all adults presenting differentiating spermatids. Only in young individuals, who were few, only the initial cells of the spermatogenic lineage were observed.

We characterized the various aspects of the seminiferous tubules found in *R. schneideri* to infer the reproductive ability depending upon the presence or absence of initial or final germ cells. A small proportion of individuals of the two collection periods presented only the initial cells of the spermatogenic lineage (N = 12), and most individuals presented either all cells from spermatogonia to spermatozoa or the final cells of the spermatogenic lineage.

Of the individuals who presented only the initial cells of spermatogenic lineage, in the first analysis period, two of them were observed in February, one in March and two of them in April 2008 (N = 5). In the second collection period two of them were observed in

December 2012, two of them were observed in January and three of them in February 2013 (N = 7).

In the first study period, we noted that the recognition of young individuals in the population extends from the middle to the end of the rainy season. In the prior and following months, there was no sighting of young individuals based on histological analysis of the gonads associated with body length, therefore, the testicles related to the individuals collected before February and after April had all the cell types of the spermatogenic lineage, indicating that these individuals are able to reproduce.

In the second study period, there was a small difference compared to what we found in the first period regarding young individuals. The young specimens, in the first period, were recruited at the end of the rainy season, in the second period the young individuals were recruited only during mid-rainy season.

Also with respect to the second study period, the period of rainy season in the Brazilian savannah, according to rainfall data (Fig. 8B), corresponds to the months from November to April, in which we observed the lowest values of body length. In contrast, in the dry season, corresponding to the months from May to October of the second year under review, medium body lengths are above that observed in the rainy months.

Thus, we have evidence that there are periods in which we can find a greater number of young individuals in the population which is the rainy season. This may indicate that there is a preferential period of anuran development, apparently at the start of the rainy season, although the reproductive ability, characterized by the presence of spermatids in the seminiferous tubules is a characteristic observed throughout the whole year.

The morphology of germ cells and the arrangement of seminiferous tubules in *R. schneideri* is similar to other reproducing anuran species (Huang *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2003b). However, young individuals have not been studied regarding their seminiferous tubule morphology, since in reproductive biology studies, spermatids and spermatozoa are the cells that indicate reproductive ability.

The occasional presence of young individuals, based on histological analysis of the testicles and body length, indicates that although spermatozoa production occurs during all the year, fertilization and therefore the birth of new individuals is not simultaneous.

Recruitment is the process in which the population accepts the entry of young individuals, to be part of it (Sá *et al.*, 2014). The occasional presence of young individuals in those months may be related to the recruitment process of individuals into the population.

A justification regarding our form of analysis for the coupled use of histological analysis of gonads and body length of individuals is the fact that some probably young individuals with small body size were found which already had spermatozoa in their seminiferous tubules.

Using only body length it would not be possible to say whether these individuals were young as also occurs with only a histological analysis of the gonads. Since there may be seminiferous tubules with only the initial germline cells after their period of production and release of gametes.

Although the appearance of young individuals in the population, has been revealed by the presence of early spermatogenic cells and associated to small body length, the monthly cell proportion indicated by cell germ count displays a dynamic gamete production over time.

In the first period, we observed that from October to January there was a decrease in the proportion of early germ cells within seminiferous tubules, in relation to the proportion of final germ cells. Therefore, the amount of differentiating spermatids increased monthly and reached a peak of spermiation in January 2008, which is the month of the highest peak of rainfall observed in the annual range (2007-2008).

These data indicate that the rains associated with these months of the rainy season interfere in the reproduction of *R. schneideri* acting as the trigger, or “start” up of differentiation of spermatids into spermatozoa.

Following this observation, the months with the highest rainfall peaks were November and December. Analyzing the monthly cell ratio of the period, the months of November and December are shown to be quite similar when comparing the proportion of initial and final germline cells. That is, if we measure the proportion of cells in early November, the value would be approximately 27.7% of the total cells and in December approximately 25.5%.

In short, the proportion of final germline cells increases during the rainy season until the appearance of young individuals in our samples. This affects, as a whole, the monthly proportion of germ cells, so that in February, March and April 2008, which are months of constant rain, there is a large proportion of primary and secondary spermatogonia .

However, the rainfall data are not closely related to only the differentiation of germ cells. We can see that during the pattern of higher rainfall, the higher the proportion of spermatids is not similar than what we observed in the following period of January-March 2012/2013.

In the second period we observed that the month with the highest rainfall peak is March 2013. However a different relation is observed for this period than in the previous one.

In the months of the dry season, corresponding to August, September and October 2012, the highest proportions of spermatids over the other germ cells in seminiferous tubules are observed. The count data showed an increase of spermatids in these months and it does not resemble any of the rainy season.

However, if we add the spermatid values with the secondary spermatocyte values, the months of August, September and October acquire similar values to the final germ line cells of the following rainy months (November, December and January). In summary, the proportion of final cells present in the seminiferous tubules in August 2012 to January 2013 is over 60 %.

In the second study period, in December 2012, we observed two young individual which had high spermatogonia values. However, the sample was $N = 10$ males for this month. As a consequence, this aspect is lightly reflected in the monthly proportion of cells as a whole, as can be seen in the month of December in our chart. It is a month in which all individuals should be able to reproduce, when in fact it is a month in which we observed recruitment of young individuals to the population. Only the month of February 2013 reflects the recruiting of young individuals to the population, this month being the second highest peak of rainfall.

Then in March 2013, we saw the highest rainfall peak in the second period. However, the proportion of stem cells is similar to that seen in December, which also corresponds to the rainy season, and both resemble the months from August to October, months of the dry season, showing that in the second analysis period the rain was a factor that showed no close relationship with the production of gametes.

In the following months, between April and July 2013, the proportion of spermatids in the seminiferous tubules was greater than 50 %, and if we add to these spermatid values, the secondary spermatocytes, we obtain values greater than 60% (except April = 56.2 %), similar to the amounts found between August and January of the second period. These data reinforce the hypothesis that the rain showed no close relationship with the production of gametes in the second period studied, which indicates a contrast to the first period, in which the rain appears to be closely related to gamete production.

To summarise, based on the analysis of two periods, we can infer that the reproductive cycle of *Rhinella schneideri* is the continuous type with spermatozoa production throughout the entire year. In the first period, the differentiation of spermatids into

spermatozoa is most evident in the rainy season, with recruitment taking place from February to April while, in the second period, differentiation occurred during all months of the year and recruitment in December, January and February.

4.3. Presence of pre-vitellogenic oocytes in seminiferous tubules.

Some studies on the reproductive biology of frogs, based on morphology, describe an aspect similar to that found for *R. schneideri*, which relates to the appearance of pre-vitellogenic oocytes within the seminiferous tubules (Christensen, 1929; Montero & Pisano, 1990; Heyes *et al.*, 2002a). Recently, however, some experimental studies have shown that the contact of frogs with herbicides promotes demasculinization and feminization (Heyes *et al.*, 2002b; Orton *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2008, McCoy *et al.*, 2008; Moresco *et al.*, 2014).

Montero & Pisano (1990), in their work on the *Telmatobius pisanoi* spermatogenic cycle noted in their results the presence of a pre-vitellogenic oocyte inside the testicles of a specimen, although Christensen (1929), has already gathered information that individuals with such characteristics have been observed before. Recently, in 2002, a research group of ecotoxicology in the US, noted that atrazine, a pesticide widely used in plantations, causes feminization in individuals exposed to low concentrations (Heyes *et al.*, 2002). In 2013, Moresco *et al.*, conducted *Physalaemus cuvieri* collection and noted that organic pollutants such as dieldrin is found in some permanent microhabitats of the Atlantic Forest. The analyses show that the seminiferous tubules have pre - vitellogenic oocytes inside, as also found in *R. schneideri*.

Although these experiments show that the use of herbicides is a factor that provides such morphological changes, we do not have evidence of the use of these herbicides in our study area. However, the area where the specimens were collected is a stream that receives the discharge of sewage from scattered houses that are close to the stream until it empties into the Cuiabá River.

When the reproductive cycle is evaluated based on morphology, that is, only by establishing the presence/ absence of spermatozoa within the seminiferous tubules, the variation in the amount of spermatogenic cells during the months of analysis were not taken into account, even when the cycle is considered continuous. One way to make an efficient analysis for this purpose is through the quantification of spermatogenic cells.

4.4. Cell Quantification

The continuous reproductive cycle or the potentially continuous type is common in anuran populations in tropical regions (Sasso - Cerri *et al.*, 2004; Santos & Oliveira, 2007).

Such studies have been conducted in and outside of the Brazilian savannah (Ferreira *et al.*, 2009; & Santos Oliveira, 2008; Santos *et al.*, 2011; Ferreira & Mehanna, 2012), in other countries with different biomes (Huang *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997), and also with phylogenetically distant examples of the *Bufo* family (Ferreira & Mehanna, 2012; Ferreira *et al.*, 2009).

Although these studies characterize the reproductive cycle as continuous or discontinuous in the production of gametes, the analysis employed for such studies varies according to the study and according to the aspects to be addressed by the researcher.

Therefore, publications that employ the analysis of the variation in GSI over time are common, which is based on the relative weight of gonads to indicate the periods in which individuals are able to reproduce (Villagra *et al.*, 2012).

Studies that employ, as a means of analysis, the temporal variation of the seminiferous tubule diameter are also conducted in reproductive biology analyses in frogs (Ferreira & Mehanna, 2012). These studies indicate periods in which individuals are able to reproduce, based on the larger or smaller diameter of the seminiferous tubule.

Another form of analysis also used to infer the favorable reproduction periods is related to the simple presence or absence of spermatozoa in the seminiferous tubules from histological procedures (Ferreira *et al.*, 2009). Thus, individuals with spermatozoa in their seminiferous tubules are considered suitable for reproduction, and those which show no spermatozoa in their tubules are considered unfit.

There are studies that show that from measurements of the germ cysts area it is possible to infer the favorable reproduction periods (Cassel *et al.*, 2013). Accordingly, individuals who have a higher cystic area of spermatids and spermatozoa are considered suitable for reproduction and those with lower cystic area of spermatids and smaller area spermatozoa are considered unfit to reproduce.

Although there is variation in the analysis methods, according to the purpose of the research and the manner of analysis of the data depends on the author, some forms of analysis may provide more efficient conclusions than others, regarding the reliability of the data.

In our study we decided to quantify spermatogenesis by the cell count, not cystic measurements, using histological procedures, showing that this type of analysis can be further developed by addressing issues such as: the recruitment period, the periods of high production and differentiation of gametes, the influence of environmental factors on the production of gametes and even the influence of human activities on the production of gametes.

From our point of view, our form of analysis is more complete than those previously cited considering the efficiency of inferring a larger number of aspects of reproductive biology with the same tools used by the authors mentioned above.

Thus some advantages of our analysis in relation to those mentioned above can be reported.

It is often thought that heavier gonads have higher spermatozoa production than less heavy ones, and several studies have been conducted using this conception (El - Wailly, 2002; Saha & Gupta, 2011). However, Huang *et al.*, (1996), working with *Bufo bankorensis*, showed that there is no correlation between the change in testicles weight and spermatogenic activity in this species. This hypothesis had already been raised by studies of other anuran species like *Rana perezi* (Delgado *et al.*, 1989), *Rana catesbeiana* (Licht *et al.*, 1983), *Rana esculenta* (Rastogi *et al.*, 1976). So we decided not to perform this form of analysis because of its history of being unreliable.

The seminiferous tubules in frogs mostly consist of cysts which fill the tubule internally with germ cells grouped according to maturity stage (King *et al.*, 1907). The format of the seminiferous tubule may vary according to the sectioning plane, as in the case of a tubule, in the histological procedure where it can appear longitudinally or transverse to the sectioning plane.

Therefore, if individuals at a certain season appear to not have the final cells of the germ line, this may be associated to the histological procedures providing seminiferous tubules cut longitudinally. The results tend to show these individuals as able to reproduce, since their diameter of seminiferous tubules present high values in relation to the tubules at other seasons. In fact spermatozoa are not observed in the lumen of the tubule, nor spermatids in differentiation, which are factors that determine whether individuals are able or not to reproduce.

Only the diameter of seminiferous tubule being used as a means of analysis, from this point of view is flawed, which is the reason for not choosing this form of analysis. Such point of view could be more faulty if the season is represented by only one individual.

The simple analysis of the presence or absence of spermatozoa in the seminiferous tubules is a form of analysis that we call as biased. It is common to find morphological studies to infer about reproductive aptitude, as in our case, in which we observed seminiferous tubules with simultaneous presence or absence of spermatids in the testicle of the same animal.

If a criterious analysis is not employed, the researcher may simply choose which morphological aspect of the seminiferous tubule will be considered to represent all N of the sampling period. This would create misleading results and would be a poor way to perform an efficient and reliable analysis. To further corroborate this hypothesis, we found in our samples testicles with seminiferous tubules having spermatozoa and in the same testicle, tubules with only primary and secondary spermatogonia.

Cystic area measurements of the seminiferous tubules, however, presented reliable results although it can be difficult to understand them at first. The fact is that cyst size does not reflect testicular activity when plotted on a graph. The size of spermatogonia type A is significantly greater than a type spermatogonia B, in a ratio of 1:7. More serious is the fact that the size of a spermatogonia A can be 14 times larger than a differentiated spermatid (our data).

While the count (made by us) shows the presence and number of cells present in the cyst, the area measurement shows, reliably, only the presence. For the graph plotted may show higher values for spermatogonia than for spermatids in individuals which have the two categories of cells.

Although the germ cell count is a good way to analyze, from our point of view, we find it difficult to execute. One of the data that has not been explored by us concerns the spermatozoa count. The first difficulty with this point is the large number of cells present in the tubules, then, the fact that the spermatozoa is a cell of great length the cut may present the same cell divided into portions, which can appear as multiple cells when in fact it is only one. Therefore, if the shape analysis is cystic area measurement, the measurement of spermatozoa becomes possible to be performed in an easy and fast way, while in the count it is not easily possible.

3. Conclusion

From the analysis of the two periods, we can infer that the *R. schneideri* spermatogenic cycle is the continuous type with spermatozoa production throughout the entire year. In the first period it is more evident spermatid differentiation producing spermatozoa in the rainy season, with recruitment taking place from February to April and in the second period differentiation occurred during all months of the year and recruitment in December, January and February.

Figure Legends

Figure 1 - Spermatogenic Cells.

A - Primary spermatogonia (G1); unidentified arrow shows a Sertoli cell. **B** - secondary spermatogonia cyst (G2) with bilobed nuclei. **C** - primary spermatocyte cyst (C1). **D** - secondary spermatocyte cyst (C2); note visible cell limits. **E** - Initial spermiation of spermatids (T1). **F** - spermiation in a fan shaped arrangement of spermatids (T2).

Figure 2 - Seminiferous tubules mostly filled with the initial cells of spermatogenesis .

A - Overview of a testicle with seminiferous tubules mainly filled with primary spermatogonia (young individual). **B** - Seminiferous tubule detail filled with primary spermatogonia. **C** - Cysts of primary spermatocytes (C1) in a young testicle. **D** - Testicle mainly filled by spermatogonia and in the central area a tubule with elongating spermatids. **E** - Seminiferous tubule showing the presence of primary spermatogonia (G1) and secondary spermatogonia (G2)

Figure 3 - Seminiferous tubules with all of the spermatogenic cell lineages.

A - Overview of a seminiferous tubule of an individual able to reproduce. G1 - primary spermatogonia; C1 primary spermatocyte; C2 secondary spermatocyte; T1 - round spermatid; S1 – initial spermiation; S2 Secondary stage of spermiation; S3 - Final stage of spermiation. **B** - Overview of testicles with seminiferous tubules filled with all spermatogenic cell types.

Figure 4 - Seminiferous tubules with pre- vitellogenic oocytes.

A - General aspect of the testicles with presence of pre- vitellogenic oocytes. **B, C , D** and **E** are higher magnification images of the seminiferous tubules of 4 subjects with such a feature. Note the presence of follicular cells in B and chromosomes in E.

Figure 5 - Monthly Proportion of spermatogenic cells

A – Plotting of the monthly rate of spermatogenic cells in the period of October 2007 to September 2008. **B** – Plotting of the monthly rate of spermatogenic cells in the period between August 2012 and July 2013.

Figure 6- Seasonal rainfall variation. **A** - Rainfall during the period of October 2007 to September 2008. **B** - Precipitation in the period between August 2012 to July 2013.

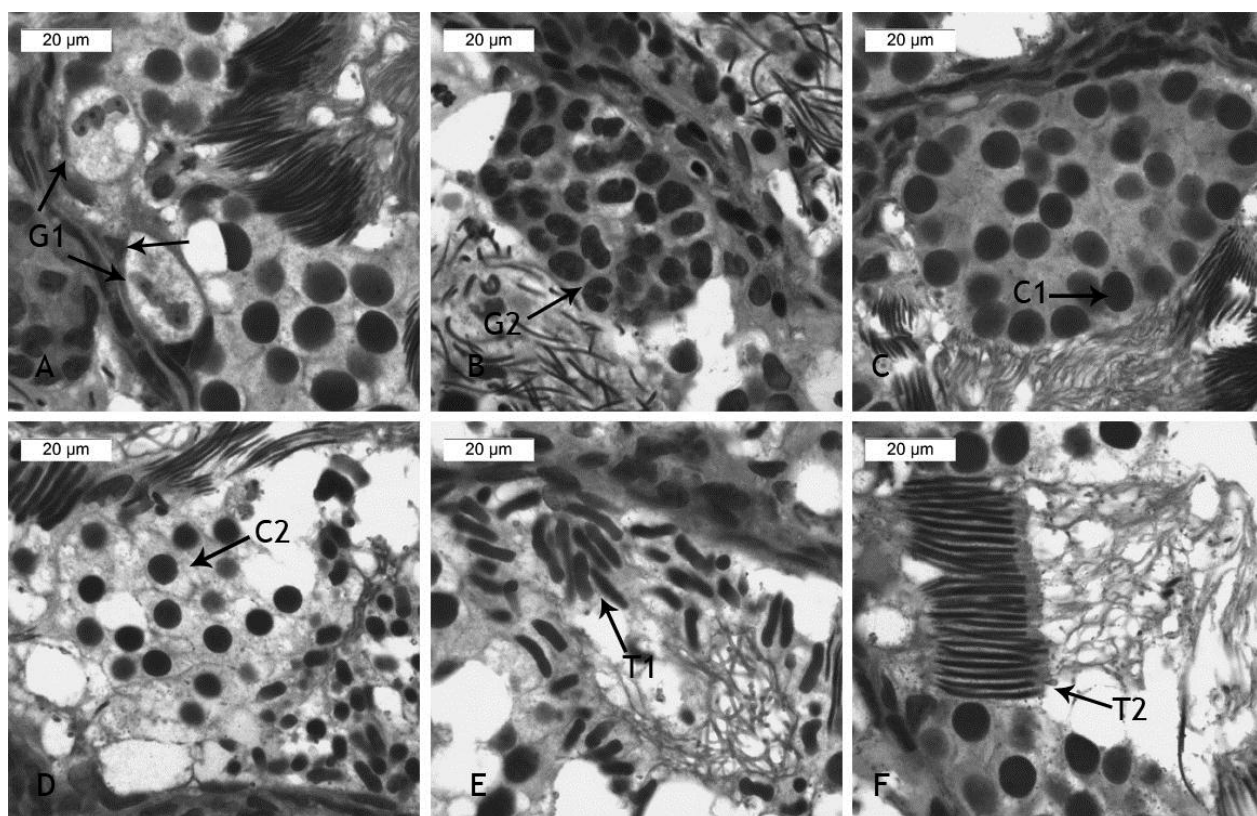


Figura 1

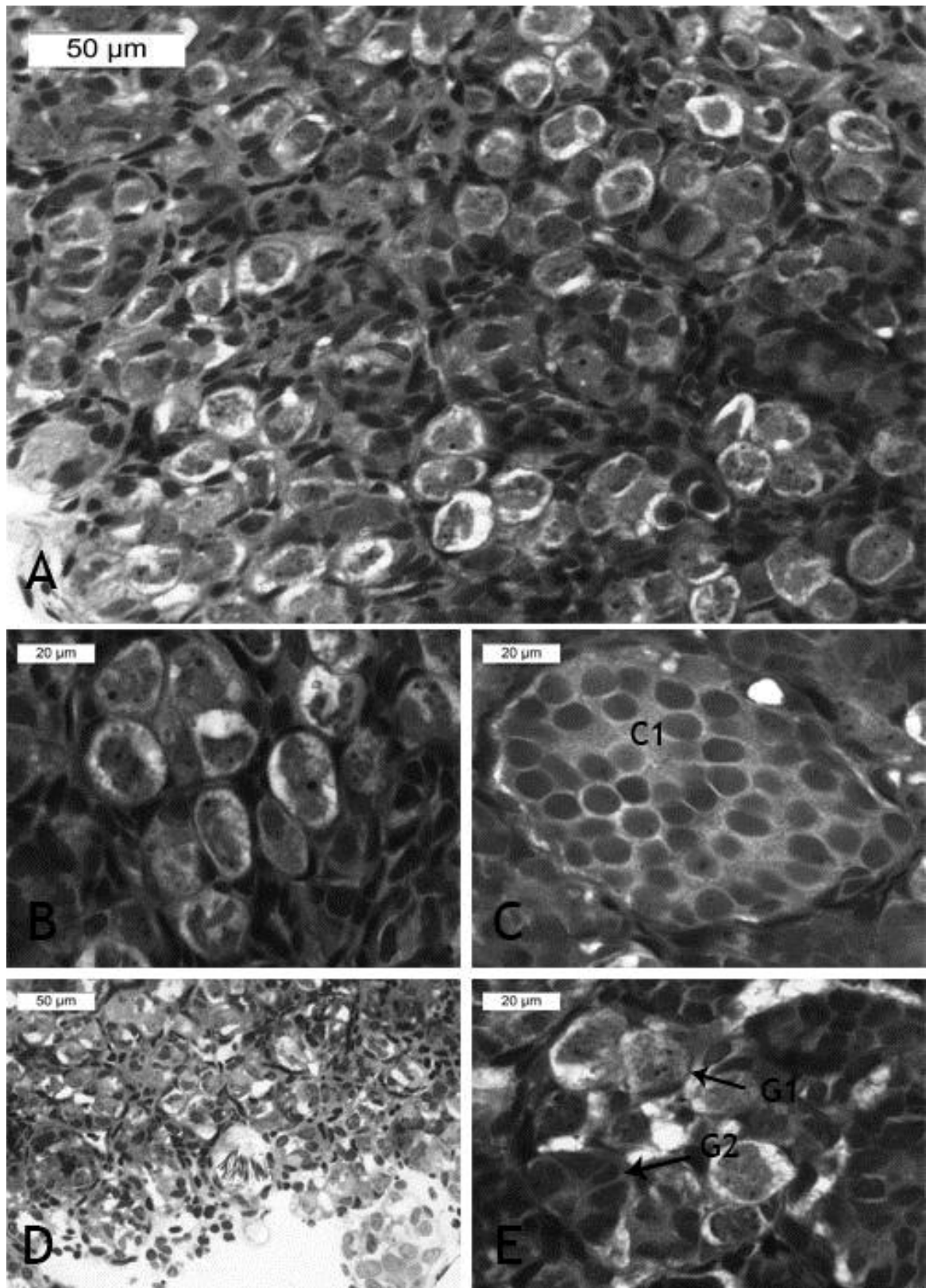


Figura 2

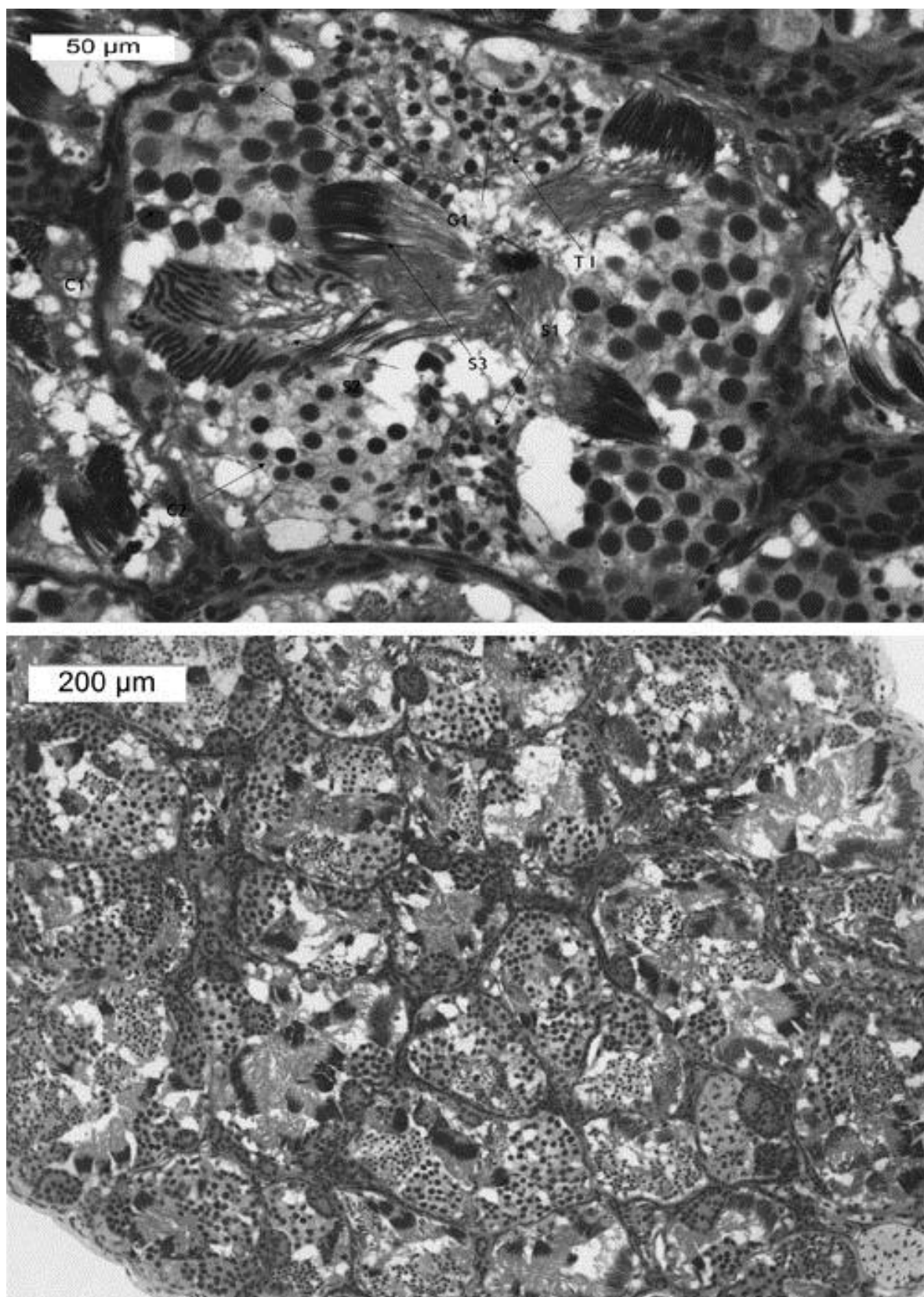


Figura 3

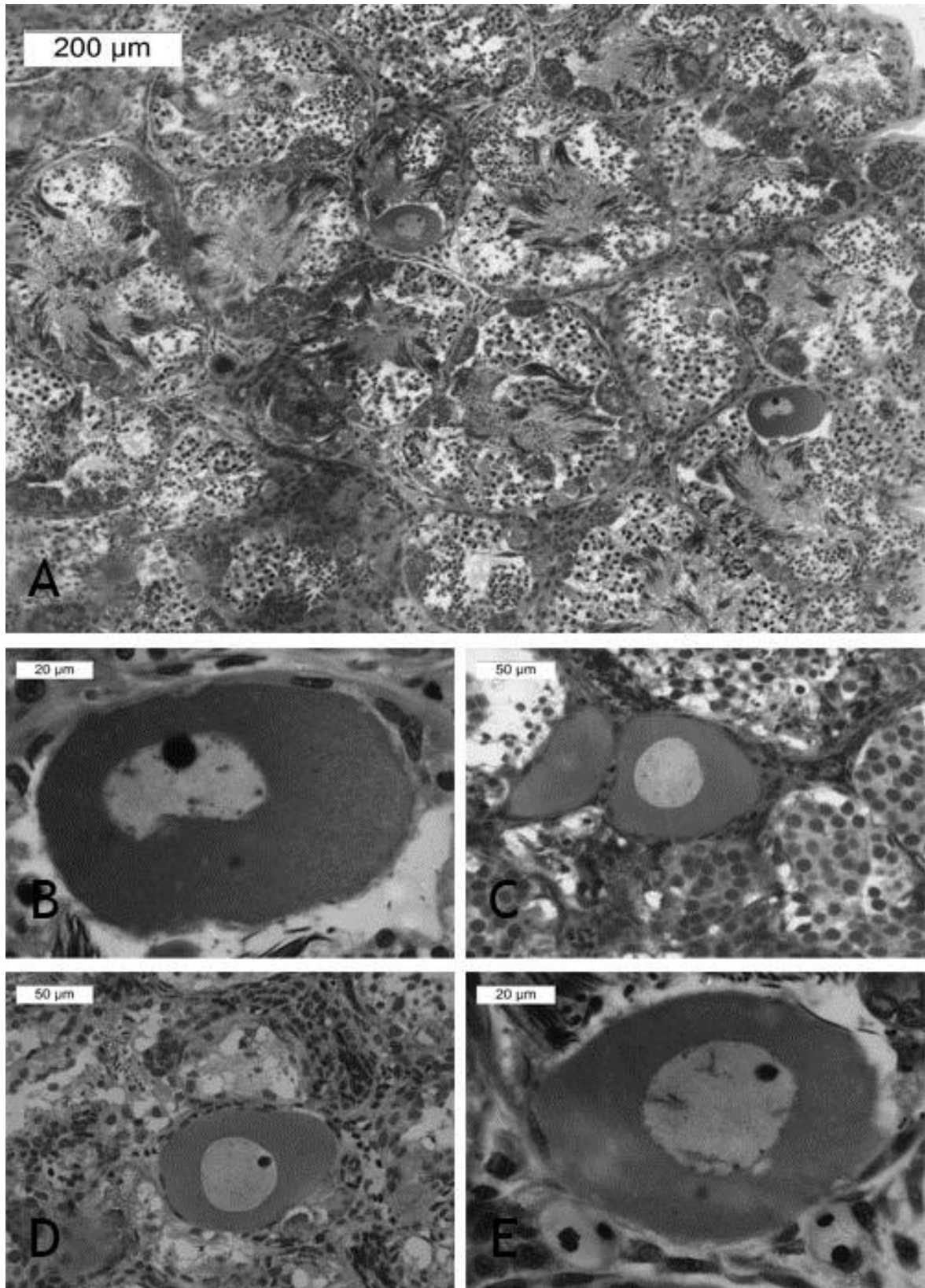


Figura 4

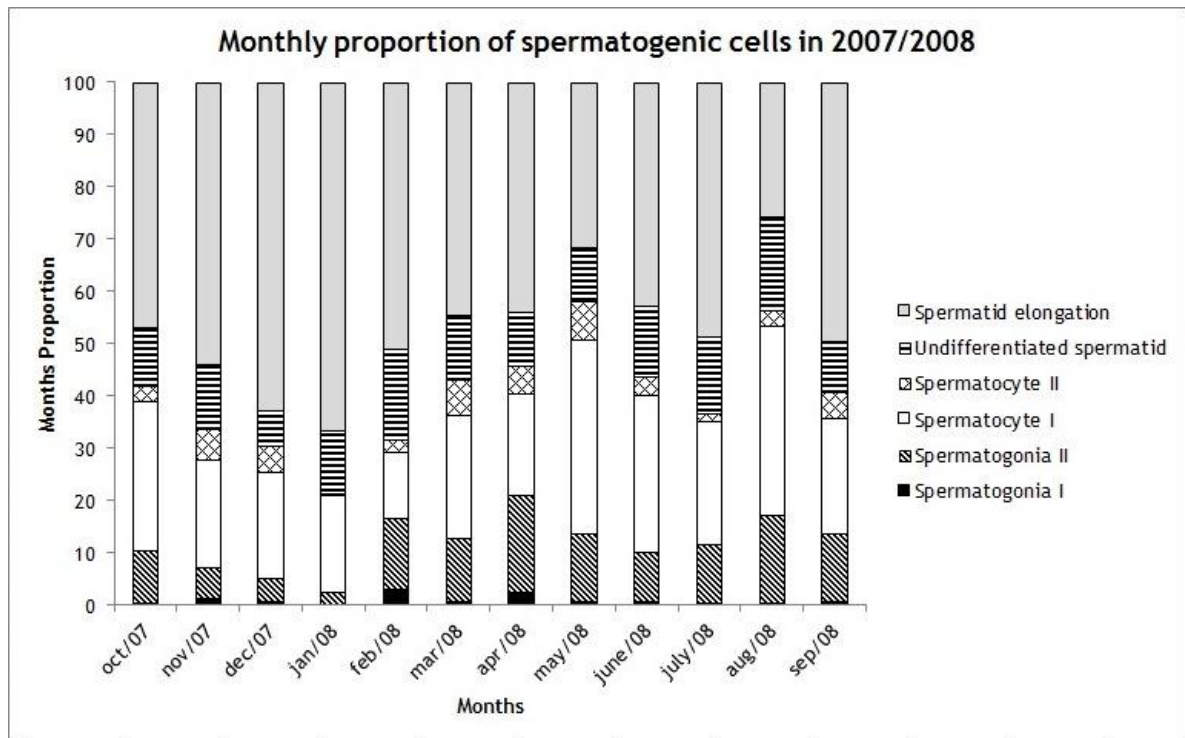


Figura 5A

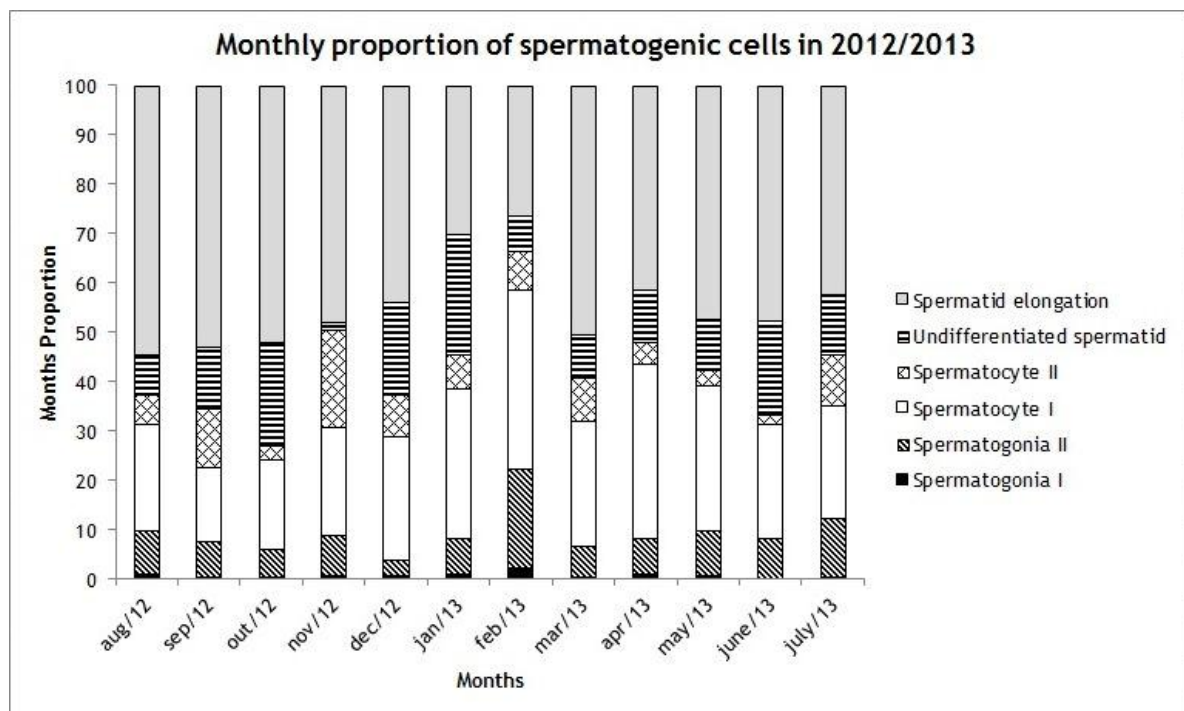


Figura 5B

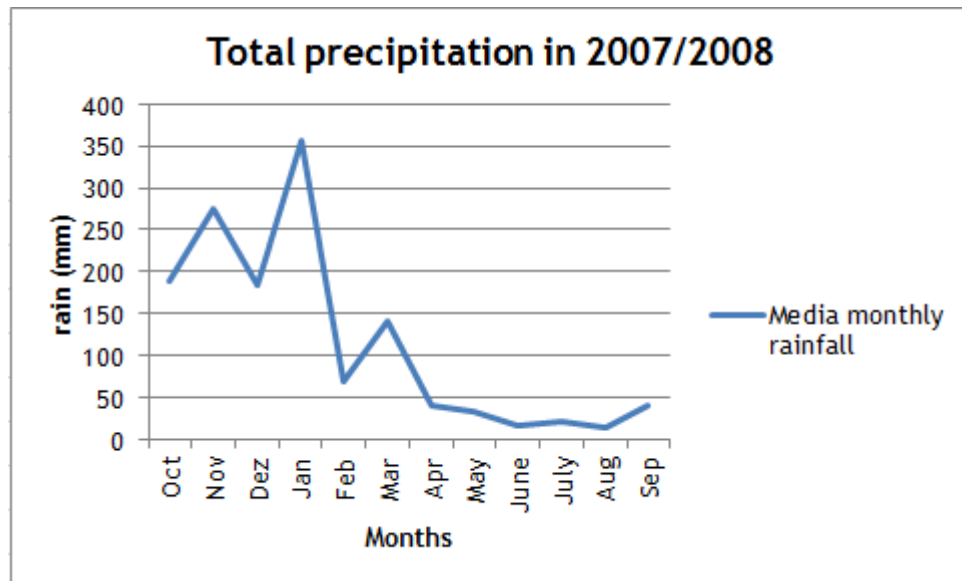


Figura 6A

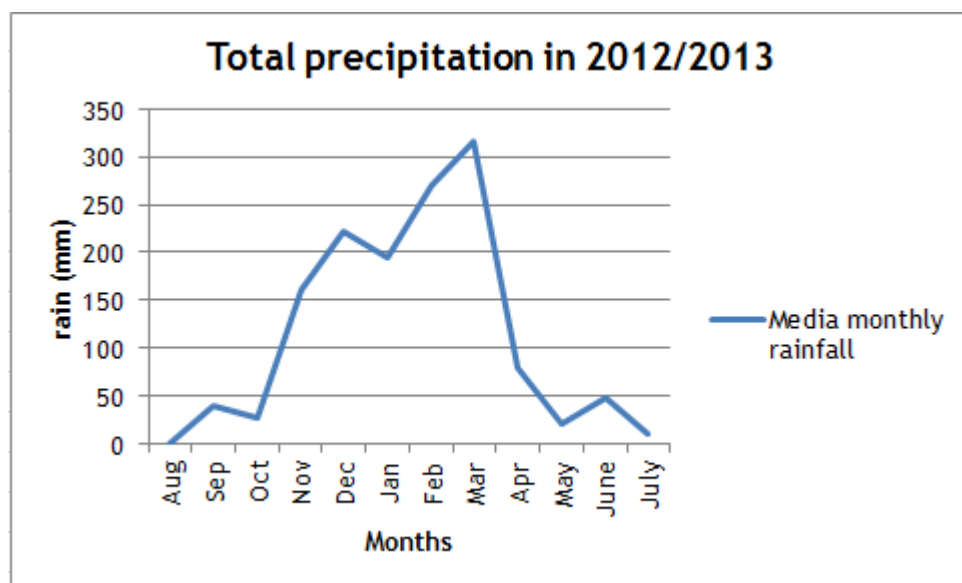


Figura 6B

Referencias Bibliográficas

- Alberts B.; Bray, D.; Lewis, J. Biologia molecular da célula. 5ª edição, 1396 pag., 2009.
- Bastos, R. P.; Haddad, C. F. B. 1999. Atividade reprodutiva de *Scinax rizibilis* (Bokermann) (Anura, Hylidae) na floresta atlântica, sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. 16: 409 – 421.
- Burgos, M. H. & Fawcett, D. W. 1956. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum*, Hensel. J. Biophysic and Biochem. Cytol. 2: 223 – 253.
- Cassel, M.; Mehanna, M.; Mateus, L. & Ferreira, A. 2013. Gametogenesis and reproductive cycle of *Melanorivulus aff. punctatus* (Boulenger, 1895) (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil. Neotrop. Ichthyol. 11: 179-192.
- Cavicchia, J. C.; Moviglia, G. A. 1982. Fine structure of the testis in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): a freeze-fracture study. Anatomical Record. 203: 463-474.
- Christensen, K. 1929. Hermaphroditism in *Rana pipiens*. The anatomical record. 43: 345 – 358.
- Delgado, M. J.; Gutiérrez, P. Alonso-Bedate, M. 1989. Seasonal Cycles in Testicular Activity in the Frog, *Rana perezi*. General and Comparative Endocrinology. 73: 1-11.
- Díaz-Páez, H. & Ortiz, J. C. 2001. The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. Amphibia-Reptilia. 22: 431-445.
- El-Wailly, A. J. 2002. Seasonal changes of the testes in the marsh frog *Rana ridibunda* Pallas, 1771. Bull. Iraq nat. Hist. Mus. 9: 13-18.
- Ferreira, A. & Mehanna, M. 2012. Seasonal testicular changes in *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura, Hylidae). Biocell. 36: 57-62,
- Ferreira, A.; Mehanna, M.; Prado, C.A.P. 2008. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) During the reproductive cycle in the pantanal, Brazil. Biocell. 32: 185-194.
- Ferreira, A.; Santos, A. B. R.; Mehanna, M. 2009. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no pantanal (estado De Mato Grosso Do Sul, Brasil) Acta Scientiarum. Biological Sciences. 31: 447-452.
- Heyes, T.; Hanston, K.; Tsui, M.; Hoang, A.; Haeffele, A. V. 2002. Feminization of male frogs in the wild. Nature. 419: 895-896,

- Huang, W. S.; Lin, J. Y. & Yu, J. Y. L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zoological Science*. 14: 497 – 503.
- Huang, W. S.; Lin, J. Y. & Yu, J. Y. L. 1996. Male reproductive cycle of the toad *Bufo bankorensis* in Taiwan. *Zoological Studies*. 35: 128-137.
- Iturriaga, M.; Rodríguez, Y. & Sanz, A. 2012. Structural and ultrastructural description of the gonads of *Eleutherodactylus planirostris* (Anura: Eleutherodactylidae). *Herpetology Notes*. 5: 281-290
- Kaptan, E.; Murathanoglu, O. 2008. Annual Morphological Cycles of Testis and Thumb Pad of the Male Frog (*Rana ridibunda*). *The Anatomical Record*. 219: 1106-1114.
- King, H. D. 1907. The spermatogenesis of *Bufo lentiginosus*. *American Journal of Anatomy*. 7: 345-387.
- Krishnamurthy, S. V.; Meenakumari, H. P. & Vasudev, V. 2008. Nitrate-induced morphological anomalies in the tadpoles of *Nyctibatrachus major* and *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae). *Turk. L. Zool.* 32: 239-244.
- Licht, P., McCreery, B.R.; Barnes, R.; Pang, R. 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Com. Endocrinol.* 50: 124-145.
- McCoy, K. A.; Bortnick, L. J.; Campbell, C. M.; Hamlin, H. J.; Guillette-Jr, L. & Mary, C. M. St. 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives*. 116: 1526-1532.
- Montero, R. & Pisanó, M. 1990. Ciclo espermatogénico de dos especies de *Telmatobius* del noroeste Argentino. *Amphibia-Reptilia*. 11: 97-110.
- Moresco, R. M.; Margarido, V. P. & Oliveira, C. 2014. A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. 132: 6-11.
- Murphy, M. B.; Hecker, M.; Coady, K. K.; Tompsett, A. R.; Jones, P. D.; Du Preez, L. H.; Everson, G. J.; Solomon, K. R.; Carr, J. A.; Smith, E. E.; Kendal, R. J.; Van Der Kraak, G. & Geisy, J. P. 2006. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicologic*. 76: 230-245.
- Novak, R. M. & Robinson, D. C. 1975. Observations on the reproduction and ecology of the tropical montane toad, *Bufo holdridgei* Taylor in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 23: 213-231.

- Oliveira, C.; Zanetoni, C.; Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chil. Anat.* 20: 263 – 268.
- Oliveira, C.; Sant'Anna, A. C.; Omena, P. M.; Santos, L. R. S.; Zieri, R. 2003b. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. *Morfologia* 11: 39 - 46.
- Oliveira, C.; Vicentini, C. A.; Taboga, S. R. 2003a. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis. *Caryologia*. 56: 75 - 83.
- Orton, F.; Carr, J. A.; Handy, R. D. 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environ. Toxic. And Cheminstry*. 25: 65-71.
- Polzonetti-Magni, A. M.; Mosconi, G.; Carnevali, O.; Yamamoto, K.; Hanoaka, Y.; Kikuyama, S. 1998. Gonadotropins and Reproductive Function in the Anuran Amphibian, *Rana esculenta*. *Biology of Reproduction*. 58:88-93.
- Rastolgi, R.; Iela, L.; Delrio, G.; Russo, A.; Chieffi, G. 1978. Environmental Influence on Testicular Activity in the Green Frog, *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.* 206: 49-64.
- Rastolgi, R.; Iela, L.; Delrio, G.; Bagnara, J. T. 1986. Reproduction in the Mexican Leaf Frog, *Pachymedusa dacnicolor* II. The Male. *Gen. Com. Endocrinol.* 62: 23-35.
- Rastogi, R.; Iela, L.; Saxna, P. K.; Chieffi, G. 1976. The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.* 196: 151-166.
- Rocha, L. A. Kondo, D. B. Oliveira, M. R. A. 2009. Estudo ambiental da situação da área do córrego barbado, município de Cuiabá – MT. *Anais X Semana de Geografia, Cáceres/MT, Brasil*.
- Sá, F. P.; Zina, J.; Haddad, C. F. B. Reproductive Dynamics of the Neotropical Treefrog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae). *J. Herpetology*. 48: 180 – 185. 2014.
- Santos, L. R. S.; Oliveira, C. 2008. Histological aspects and structural characteristics of testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*. 39: 1266 – 1270.
- Santos, L. R. S.; Franco-Belussi, L.; Oliveira, C. 2011. Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoological Science*. 28: 840 – 844.
- Saha, B. K. & Gupta, B. B. P. 2011. Studies on annual activity cycle of gonads and breeding behavior of the endangered frog, *Rana leptoglossa* (Cope, 1868). *International Journal of Science and Nature*. 2: 683- 691.

- Saidapur, S. K.; Nadkarni, V. B. 1975. The seasonal variation in the structure and function of testis and thumb pad in the frog *Ranatigrina* (Daud.). Indian Journal of Experimental Biology. 13: 432-438.
- Sasso-Cerri, E. Faria, F. P.; Freymüller, E.; Miraglia, S. M. 2004. Testicular Morphological Changes During the Seasonal Reproductive Cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. Journal of Experimental Zoology. 301A: 249-260.
- Singer, R. B. & Gutierrez, M. 1997. Reproducción y desarrollo larval del sapo enano *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyemberg, 1875) (Anura: Bufonidae). Cuadernos de Herpetología. 11: 21 – 30.
- Toledo, L. F. & Haddad, C. F. B. 2005. Reproductive biology of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae) in south-eastern Brazil. Journal of Natural History 39: 3029-3037.
- Villagra, A. L. I.; Cisint, S. B.; Crespo, C. C.; Medina, M. F.; Ramos, I.; Fernandez, S. N. 2012. Spermatogenesis In *Leptodactylus Chaquensis*. Histological study. Zygote. 22: 291-299.
- Zieri, R.; Taboga, S. R.; Oliveira, C. 2008. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): aspectos ultra-estruturais. Iheringia. Série Zoologia (Impresso), Porto Alegre. 98: 193-199.

Authors: Montezol *et al.*

Running title: Oogenic dynamics in *Rhinella schneideri*

Ovogenic dynamics in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae).

Michel Montezol^{1,4}, Adelina Ferreira^{1,2}, Mahmoud Mehanna³

¹Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, IB, Unicamp, Campinas, SP, Brasil;

²Departamento de Biologia e Zoologia, IB, UFMT, Cuiabá, MT, Brasil;

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Rondônia -
UNIR – *campus* Rolim de Moura, Brasil

⁴Corresponding author: Departamento de Biologia Celular e Funcional, IB, CP 6109,
Unicamp, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brasil. michel_montezol@hotmail.com

Resumo

Para análise da possível variação na dinâmica ovogênica, foram utilizados espécimes de *Rhinella schneideri* depositados na Coleção de Vertebrados da UFMT, coletados mensalmente em dois momentos distintos, o primeiro referente ao período de 10/2007 a 09/2008, (N=55), e o segundo corresponde ao período de 08/2012 a 07/2013, (N=59). Os animais tiveram uma porção do ovário excisado, submetido a procedimento histológico de inclusão em resina do tipo metacrilato glicol. Os blocos foram cortados a 3µm de espessura, corados com azul de toluidina e as células germinativas foram contadas. Os dois períodos foram comparados apenas pelo contraste direto entre frequência dos parâmetros reprodutivos observados. Em 2007/2008 a população mostra que houve crescimento vitelogênico em todos os meses do ano. A maior proporção de ovócitos maduros foi observada em 10/2007 (60%) e um maior número de espécimes jovens foi coletado em 01/2008. Houve uma maior frequência de complexos pós-ovulatório em 10, 11 e 12/2007 (4.5, 5.6, 7.9%, respectivamente) e em 07/2008 (9%). Em 2012/2013 encontramos outro padrão de crescimento vitelogênico, que ocorre principalmente de agosto de 2012 a janeiro de 2013. O mês no qual encontramos maior proporção de ovócitos maduros foi em setembro de 2012 e depois em julho de 2013. Outro padrão foi observado para os meses de fevereiro a junho de 2013, no qual muitos dos indivíduos mostraram baixo crescimento vitelogênico e maior proporção de ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos. A dinâmica gametogênica em *R. schneideri* é diferente entre os dois períodos estudados. O período de 2007/2008 mostra vitelogênese e produção de ovócitos maduros contínua. A desova ocorreu em diferentes momentos do período. Em contraste, o período 2012/2013 mostra crescimento vitelogênico, ovócitos maduros e desova de agosto de 2012 a janeiro de 2013. Encontramos apenas indivíduos jovens de fevereiro a junho de 2013 e muita desova em julho de 2013. A dinâmica ovogênica em *R. schneideri* não segue um padrão anual na produção de gametas, nem talvez com outro intervalo de tempo que seja maior ou menor, e a forma de análise pode estar relacionada com tal diferença em relação ao que já é descrito na literatura.

Palavras-chave: quantificação celular, ovogênese, reprodução, vitelogênese.

Abstract

To analyze the possible variation in oogenic dynamic, *R. schneideri* specimens used were those deposited in the UFMT Vertebrate Collection, collected monthly at two different times, the first for the period from 10/2007 to 09/2008, (N = 55) , in which urban mobility had not been observed in the city. The second corresponds to the period from 08/2012 to 07/2013, (N = 59). The animals had a portion of the ovary excised to undergo histological procedure for inclusion in glycol methacrylate resin. The blocks were sectioned at thickness of 3µm, stained with toluidine blue to permit germ cell count. The two periods were compared only by the direct contrast between frequencies of the reproductive parameters. In 2007/2008 the population shows that there was vitellogenic growth in all months of the year. The greater proportion of mature oocytes was observed in 10/2007 (60%) and a greater number of young specimens were collected in 01/2008. There was an increased frequency of post-ovulatory complex in the months 10, 11 and 12/2007 (4.5, 5.6, 7.9% respectively) and in 07/2008 (9%). In 2012/2013 we find another pattern of vitellogenic growth, which occurs primarily from August 2012 to January 2013. The month in which we find greater proportion of mature oocytes was in September 2012 and then in July 2013. Another pattern was observed for the months of February to June 2013, in which many of the individuals showed low vitellogenic growth and a higher proportion of oogonia and pre-vitellogenic oocytes. The dynamics oogenic of *R. schneideri* is different for the two study periods. The period of 2007/2008 shows continuous vitellogenesis and production of mature oocytes. Spawning occurred at different times of the period. In contrast, the period 2012/2013 shows vitellogenic growth, mature oocytes and spawning from August 2012 to January 2013. We found only young individuals from February to June 2013 and increases spawning in July 2013. The oogenic dynamic in *R. schneideri* does not follow a standard annual production of gametes, or perhaps a different time interval which is longer or shorter.

Keywords: cell quantification, oogenesis, reproduction, vitellogenesis.

Introdução

O estudo sobre a dinâmica gametogênica pode ser entendido como uma maneira de compreender quantitativamente a produção de gametas em indivíduos ao longo do tempo, proporcionando assim o entendimento de um aspecto importante da biologia reprodutiva. Alguns estudos têm sido realizados para algumas espécies de anuros com o objetivo de avaliar aspectos da gametogênese e características reprodutivas dos mesmos (Jørgensen, 1981; Kanamadi & Saidapur, 1982; Pancharatna & Saidapur, 1985; Iela *et al.*, 1986; Díaz-Paez & Ortiz, 2001; Saha & Gupta, 2011).

Em estudos de ovogênese é necessário a caracterização da ampla variedade morfológica de células germinativas (Jørgensen, 1981; Iela *et al.*, 1986; Díaz-Paez & Ortiz, 2001; Sretarugsa *et al.*, 2001). Assim sendo, estudos de ciclo ovogênico em anuros têm sido realizados a partir da contagem do número de ovócitos, a qual se torna uma importante metodologia para determinação de períodos favoráveis a reprodução (Jørgensen, 1981; Pancharatna & Saidapur, 1985; Jørgensen *et al.*, 1986; Díaz-Paez & Ortiz, 2001).

Os estudos de biologia reprodutiva de anuros, por sua vez, trazem uma ampla variedade de metodologias aplicadas que permitem inferir na dinâmica gametogênica dos indivíduos, além da contagem de células já mencionada. Saha & Gupta (2011) e Sretarugsa *et al.* (2001), por exemplo, estudaram a variação do índice gonadosomático ao longo do ciclo reprodutivo de *Rana leptoglossa* e *Rana tigerina*, respectivamente, Iela *et al.* (1986), mediu secreção hormonal ao longo do ciclo reprodutivo de *Pachymedusa dactylos*.

Apesar de existirem metodologias distintas para inferir sobre a reprodução dos anuros, existem padrões de classificação amplamente aceitos acerca de períodos favoráveis a reprodução em zonas temperadas e zonas tropicais. Por exemplo, para machos, a liberação de espermatozóides pode ser classificada em explosiva (descontínuo), apresentando apenas um período no ano em que há a liberação dos gametas. Este tipo de ciclo reprodutivo é observado para anuros que vivem em regiões temperadas (Rastolgi *et al.*, 1986). Pode ser classificado como contínuo quando há liberação de espermatozóides em todas as estações do ano (Huang *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2008; Kaptan & Murathanoglu, 2008; Díaz-Páez & Ortiz, 2001; Villagra *et al.*, 2012), ou potencialmente contínuo, na qual há um curto período no ano em que não há produção de gametas (Huang *et al.*, 1996). Os dois últimos referem-se a regiões tropicais. Para fêmeas, habitantes tanto de localidades temperadas quanto de localidades tropicais, o ciclo ovariano é dividido em subfases, já que a produção do gameta feminino é mais lenta e precisa de maior disponibilidade de energia, embora ainda seja possível observar

em alguns casos a produção de ovócitos durante todo o ano em algumas espécies de anuros (Kanamadi & Saidapur, 1982).

Duttaphrynus melanostictus (= *Bufo melanostictus*) (Kanamadi & Saidapur, 1982), é um anuro indiano que apresenta produção de ovócitos durante o ano todo com diferença na frequência de ovócitos conforme a estação em análise. Em seu estudo, Kanamadi & Saidapur, 1982, classificaram o ciclo ovariano de *D. melanostictus* em subfases, período pré-reprodutivo entre os meses correspondentes ao final da primavera, no qual o ovário da maioria das fêmeas apresenta ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos. No período reprodutivo correspondente aos meses do verão, eles observaram que o ovário da maioria das fêmeas apresentam ovócitos maduros cheios de vitelo, além de ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos. E por ultimo o período pós-reprodutivo, que abrange as estações de outono e inverno, no qual o ovário das fêmeas esta repleto de todos os tipos de ovócito, como ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos, em processo de vitelogênese e maduros. A forma de análise usada por Kanamadi & Saidapur, 1982, foi a obtenção do índice gonadossomático do anuro, e medida de diâmetro do montante dos ovócitos após a confecção de lâminas histológicas, que foi realizado mês a mês.

Rhinella arenarum é amplamente encontrado no Brasil e outros países, assim como na Argentina, onde seu ciclo hormonal feminino foi estudado por Medina *et al.*, 2004. No estudo, o ciclo ovariano foi classificado em duas subfases, sendo elas: o período reprodutivo, correspondente à junção do período pré-ovulatório e período ovulatório, acontecendo no primeiro período a preparação do aparelho reprodutor para a ovulação, e o segundo em que ovócitos maduros são liberados na cavidade celomática, transportados através do oviduto e lançados para a fertilização externa, normalmente nos meses de primavera; e um período pós-reprodutivo, caracterizado pela recuperação do sistema reprodutor também compreendendo duas fases: o período pós-ovulatório inicial, durante as temporadas de verão e outono, indicada pelo crescimento do número de ovócitos e no tamanho deles, e o período pós-ovulatório tardio, caracterizado pela hibernação. A forma de análise usada por Medina *et al.*, 2004 foi a mensura de hormônios durante três anos consecutivos coletados na mesma população.

Esses dois exemplos referem-se a anuros de região temperada (Medina *et al.*, 2004) e região tropical (Kanamadi & Saidapur, 1982), nos quais diferentes metodologias foram empregadas para anuros bufonóideos, chegando a um resultado compatível, isto é, o mesmo padrão do ovário nas mesmas estações do ano, com a diferença apenas de que o anuro de região temperada entra em hibernação em algum momento do ano (Medina *et al.*, 2004). Isso

nos permite concluir que não necessariamente fêmeas acompanham o ciclo reprodutivo dos machos, já que para machos de *Duttaphrynus melanostictus* (Huang *et al.*, 1997), o ciclo espermatogênico é contínuo e fêmeas apresentam o período reprodutivo no verão.

Devido à ideia amplamente aceita de que para anuros bufonóideos fêmeas o ovário segue um ciclo de reprodução (crescimento maturação e recuperação) no qual cada característica é determinada pela sazonalidade, existe um aspecto que não é abordado nos trabalhos de biologia reprodutiva de anuros. Tal aspecto é a possível diferença na dinâmica reprodutiva quando o estudo é realizado em longo prazo. Uma análise da biologia reprodutiva de uma população ao longo de um período maior que um ano, possibilitaria inferir se em regiões tropicais, como é o caso do cerrado brasileiro, no qual a sazonalidade varia entre o “seco” e o “chuvoso”, as fêmeas apresentam ciclo ovariano contínuo como os machos, podendo encontrar ovócitos maduros não apenas nos meses de chuva, mas em outras épocas do ano.

Sendo observados esses aspectos na literatura acerca da biologia reprodutiva de anuros, a proposta do nosso trabalho é analisar a dinâmica ovogênica em *Rhinella schneideri* ao longo de dois anos não consecutivos (outubro de 2007 a setembro de 2008 e agosto de 2012 a julho de 2013), numa área urbana da cidade de Cuiabá – MT – Brasil. Tal área no primeiro período não apresentava grandes sinais de atividade antrópica, sendo banhada pelo córrego do Barbado. Porém, foi amplamente modificada para a construção de um viaduto, sendo o córrego canalizado e sua mata ciliar destruída para dar lugar a uma avenida que ainda está em construção, no segundo período.

Material e Métodos

Foram coletadas 55 fêmeas de *R. schneideri* no período entre outubro de 2007 a setembro de 2008. Outras 59 fêmeas de *R. schneideri* foram coletadas no período entre agosto de 2012 a julho 2013, as quais foram depositados na coleção zoológica da UFMT *campus* Cuiabá. O número da licença concedida pelo SISBio é 35287. Após a dissecação de todos os indivíduos dos dois grupos, o material foi imerso em solução fixadora de formol 10%, posteriormente desidratados em álcool 70% por 24 horas e depois álcool 95% por 4 horas. Embebidas em resina de infiltração, do tipo metacrilato-glicol, e álcool 95% na proporção de 1:1 durante dois dias. Por último as amostras foram imersas em resina de infiltração adicionada de catalizador na proporção de 15:1 para microtomia. Os blocos foram cortados semi-seriadamente num total de 3 cortes por bloco. Cada corte foi obtido com 3µm de

espessura e a distância entre cada corte foi de 1000 μm . As lâminas foram coradas em solução aquosa de azul de toluidina a 1%.

Caracterizamos as células germinativas de acordo com o estágio de maturação, e a partir da caracterização contamos as células germinativas dos cortes de todas as lâminas para estipular a quantidade de células por mês e períodos.

Os dados de pluviosidade para a região foram obtidos através do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET, no endereço eletrônico <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>. Acessado em 17/01/2015. Esses dados foram usados para correlacionar a dinâmica gametogênica com as condições de precipitação anual.

Resultados

O ovário juntamente com ovidutos pares que ocupam grande parte do espaço ventral e frequentemente o órgão de Bidder conectado ao ovário formam o aparelho reprodutor feminino de *Rhinella schneideri*. O ovário é multilobulado com aspecto sacular situado na cavidade dorso lateral do corpo do animal, está próximo e preso aos rins pelo peritônio.

Caracterização das células ovogênicas

A análise microscópica revela principalmente dois tipos de células germinativas, as ovogônias e os ovócitos, sendo estes últimos divididos em subtipos diferentes conforme a fase do desenvolvimento.

Ovogônia (Fig. 1A e B): São células da linhagem germinativa que na maioria das vezes não são vistas individualmente, ocorrendo em ninhos. Seu núcleo possui maior afinidade com o azul de toluidina proporcionando aspecto contrastante com o citoplasma. Aparentemente a ovogônia apresenta núcleo multilobado com vários nucléolos, que em algumas situações parecem diversas ovogônias num mesmo ninho. O limite nuclear é bem definido diferentemente dos limites citoplasmáticos. O citoplasma das ovogônias é escasso. Essas células foram observadas em todas as fases de desenvolvimento dos ovários, sendo localizadas na periferia da estrutura como um todo. Em alguns locais é possível observar uma camada de células que envolvem as ovogônias. Posteriormente estas células são responsáveis pela formação dos folículos ovarianos em conjunto com os ovócitos em desenvolvimento.

Ovócito pré vitelogênico (Fig. 2A - F): São células que se originam das ovogônias e são maiores que elas. Assim como nas ovogônias o limite nucleolar é bem definido, se localizam aleatoriamente no núcleo e é evidente uma grande quantidade deles nos ovócitos pré vitelogênicos. O núcleo dos ovócitos pré vitelogênicos se apresenta de forma arredondada e o córtex nuclear inicialmente é irregular sem ondulações (Fig. 2A e B). Nos ovócitos pré-

vitelogênicos o núcleo aparece contrastante com o citoplasma de forma diferente dos ovócitos primários, em ovócitos pré-vitelogênicos o núcleo apresenta menor afinidade com azul de toluidina em relação ao citoplasma, isso gera um contraste e proporciona melhor visualização de cromossomos plumulosos (Fig. 2C). No estágio de ovócito pré-vitelogênico o citoplasma apresenta granulação referente a composição organelar, que podem ser chamadas de corpos de Balbiani, ao redor do núcleo com aparência mais clara (Fig. 2B). Os ovócitos pré-vitelogênicos, bem como de todas as outras fases de desenvolvimento da ovogênese, são envolvidos por camadas de células que circundam todo o ovócito e que podem variar em número e em natureza (Fig. 2D). A camada mais íntima é composta por células epiteliais cubóides e existe uma segunda camada que recobre essas células cubóides correspondente a células do tecido conjuntivo. Conforme ocorre desenvolvimento do ovócito, as células cubóides desenvolvem aspecto pavimentoso, assim o ovócito pré-vitelogênico apresenta duas camadas de células pavimentosas, sendo uma, a mais íntima de natureza epitelial e a segunda, mais externa, de natureza do tecido conjuntivo (Fig. 2).

Os ovócitos pré-vitelogênicos em *R. schneideri* exibem uma grande variedade de quadros morfológicos de acordo com a dinâmica dos corpos de Balbiani, ondulação do córtex nuclear e quantidade de nucléolos (Fig. 2C e E). Inicialmente ocorre a presença dos corpos de Balbiani aglomerados no citoplasma o qual conforme o desenvolvimento celular se espalha pelo citoplasma periférico. O núcleo cujo córtex nuclear não possuía ondulações começa a desenvolvê-las. No final deste estágio o núcleo do ovócito apresenta nucléolos que se voltam para a periferia do nucleoplasma (Fig. 2E). Na fase em que os nucléolos aparecem mais frequentemente, eles se organizam perifericamente no núcleo e apresentam variados tamanhos. Ainda é possível visualizar a presença de cromossomos plumulosos. As células da camada mais externa formada por tecido conjuntivo começam a produzir colágeno, assim o tecido superficial torna-se ligeiramente mais espesso pela adição de colágeno (Fig. 2F).

Ovócito vitelogênico (Fig. 3A - F): É marcado pelo processo de vitelogênese. Os nucléolos aparecem ainda mais frequentemente e às vezes notamos a associação destes com os cromossomos plumulosos e também ao córtex nuclear (Fig. 3C). O córtex nuclear apresenta grande ondulação, indicando o processo de aumento de superfície (Fig. 3F).

O citoplasma dos ovócitos vitelogênicos cora com menor afinidade pelo azul de toluidina considerando a presença de RNA, proteínas e polissacarídeos que é maior que nos estágios anteriores. Não encontramos nuages na periferia dos ovócitos vitelogênicos como nos estágios anteriores.

A camada de células foliculares parece aumentar em tamanho e na matriz celular do ovócito ocorre a formação de uma camada mais densa e homogênea que separa a camada de vitelo da camada de células foliculares, a zona pelúcida (Fig. 3D).

É notável que as células foliculares apresentem basofilias diferentes quando comparadas uma camada de células foliculares em relação à outra, e também quando comparadas a camada de células foliculares e o ovócito (Fig. 3B). A cobertura mais externa das células foliculares apresenta maior afinidade pelo corante, diferentemente da afinidade apresentada pela camada de células epiteliais que é diferente da afinidade apresentada pelo citoplasma do ovócito, pois o ultimo apresenta diferentes regiões nas quais reações diferentes estão ocorrendo, e as células foliculares possuem características fisiológicas próprias, com diferença nas reações que ocorrem no interior do ovócito.

Em alguma fase do estágio de ovócito vitelogênico o envelope vitelínico preenche toda a camada cortical do ovócito (Fig. 3B), essa camada cresce em direção ao preenchimento quase que total do citoplasma do ovócito. O vitelo aparece primeiro periféricamente no citoplasma do ovócito na forma de pequenos corpos esféricos ou de forma irregular. Observamos que eles não possuem afinidade com o azul de toluidina. Com a continuação da vitelogênese ocorre a fusão desses corpos ampliando seu tamanho e depois fusão desses corpos maiores com os menores por pinocitose. Esse processo de incorporação de vesículas começa primordialmente em vesículas depositadas inicialmente e com o acúmulo desta pigmentação as vesículas primordiais migram para o centro do ovócito. Podemos observar, em grande aumento, que quanto mais próximo ao centro do ovócito (região nuclear) maiores são as vesículas de vitelo, e quanto mais distante, próximo à periferia do ovócito, menores são as vesículas de vitelo. Os nucléolos, por sua vez, se organizam quase totalmente na periferia no nucleoplasma. Depois da fase de vitelogênese ocorre a diferenciação do pólo vegetal e pólo animal (Fig. 3E). O processo de vitelogênese também é responsável por essa diferenciação. Paralelamente à diferenciação entre polo animal e polo vegetal, a quantidade de nucléolo nos ovócitos é reduzida em relação ao que observamos na vitelogênese, os cromossomos plumulosos são observados (Fig. 3C), o córtex nuclear é irregular e as ondulações que surgiram em estágios anteriores iniciam um processo de união sem a exclusão das saliências formadas pelo córtex nuclear (Fig. 3F).

Ovócito maduro (Fig. 5A - F): As características que diferenciam o estágio de ovócito maduro são a mudança na coloração do citoplasma como um todo, grânulos escuros são vistos por todo o citoplasma do ovócito, proporcionando citoplasma a coloração marrom escura (Fig. 5A). A quantidade de nucléolo é reduzida (Fig. 5A e B). Os vasos sanguíneos são

visualizados na periferia do ovócito (Fig. 5C), é notável a diminuição das vesículas de vitelo iniciais localizadas na periferia do ovócito até que em algum momento nesta fase ocorre a parada da junção de vesículas de vitelo e concomitantemente as vesículas de vitelo primordiais desaparecem (Fig. 5D). Uma fina região entre o córtex nuclear e o citoplasma cheio de vitelo apresenta um citoplasma o qual possui grânulos de pigmento em quantidade muito reduzida em comparação com o a periferia do ovócito (Fig. 5E).

Complexos pós-ovulatórios (Fig. 6A - F): Esse é um estágio no qual as células foliculares entram em degeneração com a chegada de melanomacrófagos. Nesse estágio, o folículo ainda apresenta fibroblastos e fibras colágenas no seu contorno externo, os capilares são abundantes, os limites celulares das células glandulares são bem definidos, não há organização na distribuição das células, as massas lipídicas ainda estão presentes e o espaço no citoplasma que não é preenchido por lipídeos se contrasta com ele por apresentar grânulos escuros que não coram na presença do azul de toluidina.

Contagem das células germinativas

Período correspondente à 2007-2008 (Fig. 7A): Ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos e ovócitos vitelogênicos são observados em todos os meses deste período, porém existem diferenças na predominância proporcional a cada mês estudado. As ovogônias apresentam maior proporção em dezembro e menor proporção em setembro. Os ovócitos pré-vitelogênicos apresentam maior proporção em janeiro e menor proporção em dezembro. Os ovócitos vitelogênicos apresentam maior proporção em agosto e menor proporção em outubro.

Embora as células germinativas iniciais dos estágios de maturação dos ovócitos acima mencionados apareçam em todos os meses do ano, os ovócitos maduros não foram encontrados nos meses de janeiro, junho e agosto. Os maiores números de ovócitos maduros aparecem em outubro de 2007 e maio de 2008, e os menores em novembro de 2007 e setembro de 2008. Os complexos pós-ovulatório não apareceram nos meses de janeiro, maio, junho, julho e agosto, mas aparecem continuamente em outubro novembro e dezembro de 2007 e depois aparecem sutilmente em fevereiro, março e abril de 2008.

Assim, os indivíduos analisados apresentaram gônadas em diferentes estágios de maturação: fase ovário em desenvolvimento na qual possuía ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos (Fig. 3A) de junho a setembro (Fig. 7) e fase de aptidão à reprodução, na qual o ovário tem abundância de ovócitos maduros e complexos pós-ovulatório (Fig. 6A e B) observada de outubro a dezembro (Fig. 7).

As células iniciais da linhagem ovogênica de *R. schneideri* são abundantemente vistas nos meses de janeiro e fevereiro de 2008, nos quais apresentam maior quantidade de ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, em janeiro, e também ovócitos maduros, em fevereiro, em relação às outras células do mesmo período. Em março, abril e maio de 2008, a presença de ovócitos vitelogênicos aumenta nas fêmeas da população diminuindo a proporção das outras células germinativas em relação à essas. Contudo, em junho, julho e agosto de 2008, observamos que novamente as células iniciais assumem quase que total proporção em relação às células finais da linhagem ovogênica (Fig. 7).

Em seguida, no mês de setembro de 2008, observamos que embora ovócitos maduros não apareçam frequentemente na contagem, as complexos pós-ovulatório, o qual é um último estágio, começam a aparecer.

Período correspondente à 2012-2013 (Fig. 7B): Todas as células germinativas foram observadas em todos os meses deste período, mesmo que complexos pós-ovulatório quase imperceptíveis em fevereiro, abril, maio e junho e ovócitos maduros em maio e junho. A maior proporção de ovogônias foi observada em fevereiro e a menor proporção em julho. A maior proporção de ovócitos pré-vitelogênicos foi observada em março e a menor proporção em julho. A maior proporção de ovócitos vitelogênicos foi observada em dezembro e janeiro e a menor proporção em maio. A maior proporção de ovócitos maduros foi encontrada em setembro e a menor proporção em maio. A maior proporção de complexos pós-ovulatório foi encontrada em julho e a menor proporção em maio e junho.

Embora todas as células germinativas apareçam em todos os meses do ano, observamos uma grande diferença entre os meses quanto à predominância do tipo celular conforme o mês estudado.

Os meses de fevereiro a junho mostram a grande predominância de ovócitos pré-vitelogênicos em relação a qualquer outro tipo de ovócito, caracterizando um período onde encontramos maior quantidade de fêmeas com ovário em desenvolvimento na população.

Já o mês de setembro mostrou-se isoladamente com a maior proporção de ovócitos maduros do que todos os outros meses, seguido, também isoladamente pelo mês de julho. Contudo, um importante aspecto a observar é que em julho ocorre maior presença das células finais da linhagem ovogênica e este padrão parece seguir nos meses adiante, como mostrado pela figura 7B.

Em julho, agosto, setembro, outubro, novembro, dezembro de 2012 e janeiro de 2013, mostram maiores números das células finais da linhagem ovogênica, são elas os ovócitos maduros e as complexos pós-ovulatório, caracterizando a fase apta a reprodução. Assim, os

indivíduos analisados nesse período, também apresentaram gônadas em diferentes estágios de maturação: fase ovário em desenvolvimento na qual ocorre de fevereiro a junho de 2013 e fase de aptidão á reprodução, na qual o ovário tem abundância de ovócitos maduros e complexos pós-ovulatório (Fig. 6A e B) observada de agosto de 2012 a janeiro de 2013 (Fig. 8).

Discussão

Células ovogênicas

Em nosso trabalho caracterizamos o núcleo lobulado de ovogônia e possivelmente um nucléolo por lóbulo, considerando que outros pesquisadores se concentram nos estágios finais da ovogênese. O que é apresentado pelos outros trabalhos de ovogênese sobre a ovogônia é simplesmente sobre o grande volume do núcleo em relação ao citoplasma celular, os grumos de cromatina presente no núcleo e relatos de que o núcleo da ovogônia é oval (Oliveira & Santos, 2004).

Costa *et al.*, (1998) e Oliveira & Santos (2004) descrevem que limites citoplasmáticos não são evidentes nas ovogônias e vimos a mesma coisa. Os estágios de maturação do ovócito observados para *Rhinella schneideri* não diferem do que é encontrado na literatura, dentre eles Dumont, (1972), para *Xenopus laevis*; Sretarugsa *et al.*, (2001) para *Rana tigerina*; Costa *et al.*, (1998) para *Rana catesbeiana* (= *Lithobates catesbeianus*); Prado *et al.*, (2004) para *Leptodactylus labyrinthicus*; Oliveira & Santos, (2004) para *Scinax fuscovarius*. Observamos para *R. schneideri* que todos os componentes do ovócitos são dinamicamente organizados para seu desenvolvimento, culminando na produção do gameta maduro. Uma dinâmica observada para o folículo ovariano em *R. schneideri* é a quantidade e a organização dos nucléolos no núcleo do ovócito, na qual em estágio de ovócito pré-vitelogênico os nucléolos se localizam de forma aleatória no nucleoplasma e é observada uma quantidade reduzida de nucléolos em comparação com os estágios posteriores. Ao passo que ocorre o desenvolvimento do ovócito, a quantidade de nucléolo aumenta e ocorre uma organização diferenciada dos mesmos, assim sendo eles se organizam na periferia do núcleo em associação aos cromossomos plumulosos com finalidade de aumentar a síntese de RNA's que participarão de processos citoplasmáticos como a síntese de vitelo.

Outra dinâmica ocorre quando o processo de vitelogênese inicia, tal ovócito possui um tamanho maior do que o ovócito pré-vitelogênico, pois o citoplasma está repleto de precursores de proteínas (Aybar *et al.*, 1996). Em estágios posteriores de maturação ovariana a quantidade de precursores proteicos no citoplasma diminui dando lugar a componentes

produzidos pelos precursores, como o vitelo. Ainda é possível a visualização de uma pequena região no ovócito que ainda não é preenchido pelo vitelo em ovócitos grandes.

Uma dinâmica, a qual funciona simultaneamente ao crescimento do número de nucléolos, é a do córtex nuclear. Em ovócitos iniciais percebemos que o córtex nuclear não possui especializações evidentes em microscopia de luz, e os nucléolos não se organizam na periferia do núcleo. Com o avanço do desenvolvimento do ovócito, o núcleo deste passa a apresentar um córtex com ondulações evidentes. Ao passo que os nucléolos aumentam em número para fornecerem maior síntese de RNAr, o limite nuclear passa a também desenvolver ondulações indicando aumento de superfície. Essa especialização do córtex nuclear pode indicar que a demanda de exportação de RNAs do núcleo para o citoplasma tende a ser grande necessitando de maior quantidade de complexos de poro nucleares, justificando então tal especialização. A ondulação do córtex nuclear é pouco evidente ou quase nada no estágio de ovócito pré-vitelogênico, ganha evidência no estágio de vitelogênico e destaque no estágio de maduro, indicando que o processo de vitelogênese e a síntese/saída de RNAs do núcleo para o citoplasma são dinâmicas simultâneas e dependentes.

Um aspecto abordado em trabalhos de descrição morfológica de ovogênese é a presença dos cromossomos plumulosos (Oliveira & Santos, 2004). Por definição, os cromossomos plumulosos são os maiores cromossomos conhecidos, evidenciados em estudos de ovogênese de anfíbios e peixes, pareados na meiose na forma estendida e rígida (Alberts *et al.*, 2006), eles se organizam em uma série de grandes alças de cromatina que emanam de um eixo linear do cromossomo, no qual cada alça corresponde a uma sequência de DNA específica e permanece estendida durante todo o crescimento do ovócito que está em diplóteno da meiose. Esses cromossomos produzem grande quantidade de RNA para o ovócito provindo das alças que se associam com os nucléolos, e foram vistos durante todos os estágios de desenvolvimento dos ovócitos. Esses aspectos nos mostram que a dinâmica dos nucléolos, o aumento de superfície do córtex nuclear e presença de cromossomos plumulosos funcionam em conjunto caracterizando uma dinâmica de desenvolvimento do ovócito.

No estágio inicial de desenvolvimento dos ovócitos de *R. schneideri* observamos a dinâmica das nuages, já mencionado para outros estudos de ovogênese. Estudos de ultraestrutura mostram que são constituídas por um agregado de ribossomos e proteínas (Cassel *et al.*, 2013). As características observadas nesta dinâmica demonstram que existe uma possível explicação para sua reorganização no citoplasma.

Primeiramente observamos às nuages próximas ao núcleo do ovócito que gradativamente se afasta em direção à periferia do citoplasma, logo depois se espalha

originando granulações que ocupam boa parte do citoplasma, e por último essa estrutura se localiza por todo o citoplasma periférico. Uma informação que nos ajuda a entender o motivo deste comportamento é a ausência de vitelo nesse estágio de maturação do ovócito. Como mencionado antes, a dinâmica nucleololar, em conjunto com o córtex nuclear e os cromossomos plumulosos se mostram dinâmicos para a formação do gameta maduro, e a atividade citoplasmática justifica a dinâmica das nuages, ou seja, proteínas e ribossomos saem do núcleo para o interior do citoplasma e depois se espalham para a periferia da célula, onde serão usadas para o processo de vitelogênese (Follett *et al.*, 1968; Wallace & Dumont, 1968; Stifani *et al.*, 1990; O'Brien *et al.*, 2010), sendo nessa região o local de início da vitelogênese. A vitelogenina, por sua vez, uma lipoglicofosfoproteína que é a principal precursora do vitelo, é sintetizada no fígado transportada para o ovário pela corrente sanguínea e internalizada na periferia do citoplasma do ovócito em crescimento, onde é convertida em lipovitelininas e fosvitinas (O'Brien *et al.*, 2010).

Conforme ocorre a maturação do ovócito, mencionamos que as ondulações do córtex nuclear começam a se unir com exclusão das saliências, e nossas imagens também mostram que a associação dos nucléolos com o córtex nuclear diminui, assim como a quantidade de nucléolos. Essas características nos indicam que está ocorrendo diminuição na síntese de precursores do vitelo, pois este já preenche grande parte do citoplasma.

Sobre a produção de vitelo, nosso estudo nos mostrou que a dinâmica da migração de vitelo é semelhante à observada para *Xenopus laevis* (Danilchik & Gerhart, 1987). Em seu estudo, Danilchik & Gerhart (1987) observaram que as plaquetas de vitelo eram sintetizadas no hemisfério animal e cresciam graças a fusão de vesículas de vitelo. Estas se moviam em direção ao hemisfério vegetal porque eram empurradas pelo surgimento de novas vesículas de vitelo iniciais na região cortical do citoplasma. Para *R. schneideri*, não usamos marcadores para evidenciar o percurso do vitelo, mas de acordo com o tamanho dos grânulos e sua posição no citoplasma do ovócito acreditamos que aconteça o mesmo processo.

Em *R. schneideri* observamos a zona pelúcida, ou envelope vitelínico (EV) medindo 2,5µm de espessura no ovócito maduro. O espaço perivitelínico também foi observado. A zona pelúcida é uma grossa camada glicoproteica que envolve o ovócito e confere aos gametas femininos uma alta especificidade e possui algumas descrições elaboradas como Grey *et al.*, (1974); Hedrick & Nishihara, (1991); Barisone *et al.*, (2002); Barisone *et al.*, (2003). Ela funciona como barreira, permitindo que apenas espermatozóides da mesma espécie tenham acesso ao ovócito e é responsável por impedir a poliespermia. Já sabemos que a morfologia e fisiologia da zona pelúcida de ovócitos de *R. arenarum* (= *Bufo arenarum*)

mudam significativamente conforme os processos de maturação e fertilização (Mariano *et al.*, 1984). Já sobre o espaço perivitelínico, possui componentes que não pudemos determinar, sendo viável o emprego da microscopia eletrônica de transmissão para maiores informações sobre o porquê da manutenção desse largo espaço depois de formada uma grossa camada de envelope vitelínico e das microvilosidades, num ovócito maduro como visto para *R. arenarum* (Mariano *et al.*, 1984).

Alguns estudos apresentam complexos pós-ovulatório como uma estrutura presente no ovário de anuros em determinadas épocas do ciclo reprodutivo (Jørgensen, 1984), e por isso a difícil visualização. Os estágios de variedade morfológica das complexos pós-ovulatório já foram estudados para alguns anuros (Guraya, 1968) e a composição celular dos mesmos também já foi determinada por análises histoquímicas (Guraya, 1973). Em nossas análises ocorre frequência no aparecimento dessa estrutura, tendo relação com a dinâmica gametogênica.

Uma análise de gametogênese sob a perspectiva da microscopia de luz permite inferir vários aspectos morfológicos como caracterização da vitelogênese, ondulação do córtex nuclear, quantidade de nucléolo e corpos de Balbiani. Contudo, a caracterização das células germinativas é o passo inicial para estudos sobre dinâmica gametogênica com base na quantificação celular.

Dinâmica gametogênica

Akef, (2014) realizou um estudo no qual mostra que nem pluviosidade nem temperatura tem relação com as atividades sexuais do anuro *Bufo regularis* (= *Amietophrynus regularis*), estudados no Egito. Em contrapartida, o que observamos para *R. schneideri* é que houve diferença na relação entre a pluviosidade e a produção de gametas quando comparados um ano em relação ao outro.

No que *R. schneideri* se iguala ao encontrado por Akef, (2014) é observado quando avaliado o segundo período, no qual a chuva não mostra relação com o a dinâmica do desenvolvimento da formação do gameta. No que difere dos dados encontrados para *R. schneideri* é observado quando analisado o primeiro período. A chuva em 2007 tem início no mês de outubro e neste mês observamos os estágios finais da ovogênese, aparentando que fêmeas reprodutivas estão presentes nos meses de chuva.

Embora em algum momento a ovogênese tenha alguma relação com a pluviosidade no primeiro período para *R. schneideri*, é importante notar que os complexos pós ovulatórios e ovócitos maduros não aparecem com a mesma frequência em janeiro, o qual corresponde a um mês bastante chuvoso no cerrado brasileiro. Esse fato se repete no segundo período e é

ainda mais evidente que apenas as células ovogênicas iniciais predominam mesmo depois dos meses de chuva em fevereiro até maio e junho.

Assim, nossos resultados mostraram que nos meses finais de chuva, do segundo período, a presença de ovócitos maduros é menor em relação aos meses iniciais de chuva, e também mostram que a população se comportou de maneiras diferentes quando comparados os dois períodos de final de estação chuvosa. O primeiro em janeiro de 2008 no qual nenhum ovócito maduro nem atresia são encontrados, mas alguns ovócitos maduros e complexos pós-ovulatório aparecem em fevereiro e aumenta gradativamente até maio até que em junho não é encontrado ovócito maduro. Isso parece mostrar que o período de final de chuva funciona como uma época de recrutamento de ovócitos para a vitelogênese e nos meses finais de chuva alguns indivíduos ainda apresentam complexos pós-ovulatório. Já o período entre maio a agosto o ovário permanece em repouso sem produção de ovócitos maduros, porém com grande quantidade de ovócitos vitelogênicos.

Já no segundo período, no intervalo de fevereiro até junho, mostram pouca quantidade de ovócitos em processo de vitelogênese, maduros e complexos pós ovulatório. Aparentando que os meses finais de chuva (março e abril) funcionam como o período de repouso do ovário e na estação seca, no mês de julho, o ovário está repleto de ovócitos maduros e complexos pós-ovulatório, aproveitando apenas o pouco de chuva disponível em junho. Isso provavelmente mostra que se o estudo continuasse, observaríamos outro comportamento reprodutivo para a espécie no ano de 2013/2014.

Assim, mesmo tendo um ponto semelhante entre o início da chuva e a presença de células ovogênicas finais sendo encontradas em um mesmo período, a relação entre o aumento da pluviosidade e a produção de gametas não é dependente para as fêmeas desta espécie, sendo isso também encontrado no estudo de Akef, (2014).

Embora a pluviosidade não apresente relação clara com a produção de gametas, estudos anteriores mostram que as variações na morfologia do ovário estão relacionadas com o a aptidão ou não à reprodução, entendendo morfologia como a variação mensal da quantidade de ovócitos mostradas na figura 8. De acordo com Kanamadi & Saidapur (1982), por exemplo, *D. melanostictus*, apresenta três fases de desenvolvimento ovariano, divididas entre fase pré-reprodutiva, fase reprodutiva e pós-reprodutiva/fase preparatória. Medina *et al.*, (2004), por sua vez, dividiu o ciclo de *R. arenarum* entre fase reprodutiva e fase pós reprodutiva, a fase reprodutiva tendo o período pré ovulatório e período ovulatório, e a fase pós reprodutiva divida entre o período de produção de ovócitos e o período de hibernação.

Para *R. schneideri* não é possível caracterizar as fases do ciclo reprodutivo como feitos por Kanamadi & Saidapur (1982), ou Medina *et al.*, (2004). Isso se deve ao fato de que *R. schneideri* habita regiões de clima tropical e o desenvolvimento ovariano é diferente quando comparados os períodos correspondentes à 2012/2013 e à 2007/2008, com produção de gametas apresentando sazonalidade.

Baseado na contagem categorizada dos ovócitos, o comportamento ovariano em 2007/2008 pode ser dividido em fase de aptidão reprodutiva, onde ocorre liberação do ovócito no ambiente, o qual vai de outubro a dezembro, fase de recuperação e crescimento do ovário, onde ocorre recrutamento de ovócitos para a vitelogênese, o qual vai de janeiro a agosto.

Já no período de 2012/2013 o comportamento ovariano mostra uma dinâmica diferente. As fases podem ser mencionadas diferentemente das observadas no período correspondente a 2007/2008, pois apresentam sequências de acontecimentos diferentes. Por exemplo, enquanto que o recrutamento de ovócitos ocorre entre os meses de janeiro a agosto em 2008, de fevereiro a junho de 2013 é o intervalo de tempo marcado pela ausência proporcional das células finais da linhagem gametogênica, o qual vem depois da época de produção e liberação de gametas. O intervalo de tempo no qual há ausência das células ovogênicas finais pode ser entendido como a fase pós-reprodutiva ou de repouso, que vai de fevereiro até junho de 2013, e o intervalo de tempo anterior à fase pós-reprodutiva corresponde à fase de aptidão reprodutiva, que vai de agosto até janeiro de 2013.

Não encontramos evidências de que no segundo período ocorra o recrutamento dos ovócitos para o processo de vitelogênese nos meses que não choveram, nem de que no primeiro período a fase pós-reprodutiva dure por volta de cinco meses entre o final da estação chuvosa e o início da estação seca, e são nesses dois pontos onde diferem a produção de gametas na população. Contudo, o intervalo de tempo no qual há aparecimento das células ovogênicas finais ocorre em ambos os períodos analisados, na época chuvosa, mas também difere, pois no segundo período o mês de julho apresenta alta proporção de células ovogênicas finais, sendo um mês atípico de chuva.

De acordo com Montezol, *et al.*, (2015 em prep.), o ciclo reprodutivo dos machos de *R. schneideri* é do tipo contínuo, com produção de espermatozoides durante o ano todo. Para as fêmeas dessa espécie, notamos a presença das células ovogênicas finais apenas no início da estação chuvosa, indicando uma sincronia entre os sexos, entendida como a época de reprodução da população.

Conclusão

Baseado na contagem categorizada dos ovócitos, o comportamento ovariano em *R. Schneideri* pode ser dividido em período de aptidão reprodutiva, o qual foi de outubro a dezembro de 2007, período de recuperação e crescimento do ovário, o qual foi de janeiro a maio de 2008 e período de repouso, o qual foi de junho a agosto de 2008.

Já no período de 2012/2013 o comportamento ovariano mostra uma dinâmica diferente. O período de aptidão reprodutiva vai de agosto de 2012 a janeiro de 2013, no qual o crescimento vitelogênico ocorre simultaneamente à maturação e liberação dos ovócitos. O período pós-reprodutivo ou repouso no qual observamos a ausência de células em crescimento vitelogênico vai de fevereiro a junho de 2013.

A plasticidade na dinâmica gametogênica de *R. schneideri*, quando observada em dois períodos não consecutivos, pode ser explicada por haver ação antrópica na região do estudo, já que o microambiente foi alterado e a disponibilidade de recursos foi afetada.

Legendas das figuras

Imagem 1 – Ovogônias

A – Ninho de ovogônias (seta) em aumento total de 400X. **B** – Aumento total de 1000X do ninho de ovogônias.

Imagem 2 – Ovócitos pré-vitelogênicos

A – Panorama geral de um ovário apenas com ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos. Aumento total de 100X. **B** - Aumento total de 1000X de ovócito pré-vitelogênico. Nc – nucléolos; N – nuages; EM – córtex nuclear. Na parte inferior da imagem note uma ovogônia e seu tamanho menor em relação ao ovócito pré-vitelogênico. **C** - Aumento total de 400X de um ovócito pré-vitelogênico e seu núcleo com nucléolos associados a cromossomos plumulosos – CP. **D** - Detalhe das células foliculares de ovócitos pré-vitelogênicos. TE – tecido epitelial; TC – tecido conjuntivo. Aumento total de 1000X. **E** - Aumento total de 1000X do córtex nuclear em início de ondulação nos ovócitos pré-vitelogênicos e nucléolos associados ao córtex nuclear. **F** – Detalhe das células foliculares estreita camada de colágeno (seta). Aumento total de 1000X.

Imagem 3 – Ovócitos vitelogênicos

A – Ovário mostrando panorama geral de ovócitos vitelogênicos. Aumento total de 100X. **B** – aumento de 400X de ovócito vitelogênico. **C** – aumento de 1000X do núcleo de ovócitos vitelogênicos detalhando cromossomos plumulosos (setas). **D** – aumento total de 1000X de citoplasma de ovócitos vitelogênicos. Setas indicando presença de envelope vitelínico. **E** – aumento de 400X de ovócito vitelogênico e seus polos animal e vegetal. **F** – Aumento de 1000X de ovócito vitelogênico detalhando a invaginação do córtex nuclear (setas).

Imagem 4 – Vitelogênese

A – Setas indicando os primeiros indícios de acumulação de vitelo na periferia do citoplasma do ovócito. Aumento total de 400X. **B** – Setas indicando os poucos intervalos que restam no citoplasma periférico do ovócito que ainda não acumularam vitelo. Aumento total de 400X. **C** – Todo o citoplasma periférico do ovócito preenchido por vitelo. Aumento total de 400X. **D** – O crescimento da camada de vitelo ocorre preenchendo o citoplasma uniformemente. Aumento total de 400X. **E** – Ovócito vitelogênico com grande quantidade de vitelo no citoplasma. Estrela indicando citoplasma que ainda não foi preenchido pelos grânulos de

vitelo. Aumento total de 400X. **F** - Panorama geral de um ovário em desenvolvimento com vários ovócitos em estágio de vitelogênese distintos.

Imagem 5 – Ovócito maduro

A – Panorama geral de ovócito maduro. Aumento total de 100X. **B** - Aumento de 400X do núcleo do ovócito maduro, setas indicando a quantidade reduzida de nucléolos. **C** – Citoplasma periférico do ovócito maduro. Seta indicando capilar externo as células foliculares. Envelope vitelínico espesso. Nota grânulos de pigmentação no citoplasma do ovócito maduro. Aumento total de 1000X. **D** - Aumento de 400X do citoplasma periférico do ovócito maduro. Note células foliculares e envelope vitelínico espesso. Grânulos de vitelo com tamanho semelhante em todo o citoplasma. **E** – Aumento de 1000X do citoplasma próximo ao córtex nuclear. Estrela indicando citoplasma com ausência de vitelo e presença de grânulos de pigmentação. **F** – Ovário com presença de ovócito maduro. Aumento total de 100X.

Imagem 6 – Complexos pós-ovulatório

A – Panorama geral de um ovário com células germinativas em diferentes estágios e complexos pós-ovulatório (setas). Aumento total de 100X. **B** - Setas indicando presença de duas complexos pós-ovulatório num ovário. Aumento total de 100X. **C** – aumento de 100X de uma atresia inicial. Note a região medular ainda com pouca presença de células absortivas. **D** – Aumento de 100X de atresia em estágio avançado. Região medular reduzida. **E** – Aumento de 400X da periferia de atresia inicial. Setas superiores indicando presença de células foliculares e setas inferiores indicando presença de grânulos de vitelo. **F** – Complexo pós ovulatório em aumento de 400X.

Imagem 7 – Proporção mensal das células germinativas

A – Plotagem da proporção mensal de células germinativas no período entre outubro de 2007 a setembro de 2008. **B** – plotagem da proporção mensal de células germinativas no período entre agosto de 2012 e julho de 2013.

Figure 8 - Seasonal rainfall variation. **A** - Rainfall during the period of October 2007 to September 2008. **B** - Precipitation in the period of August 2012 to July 2013.

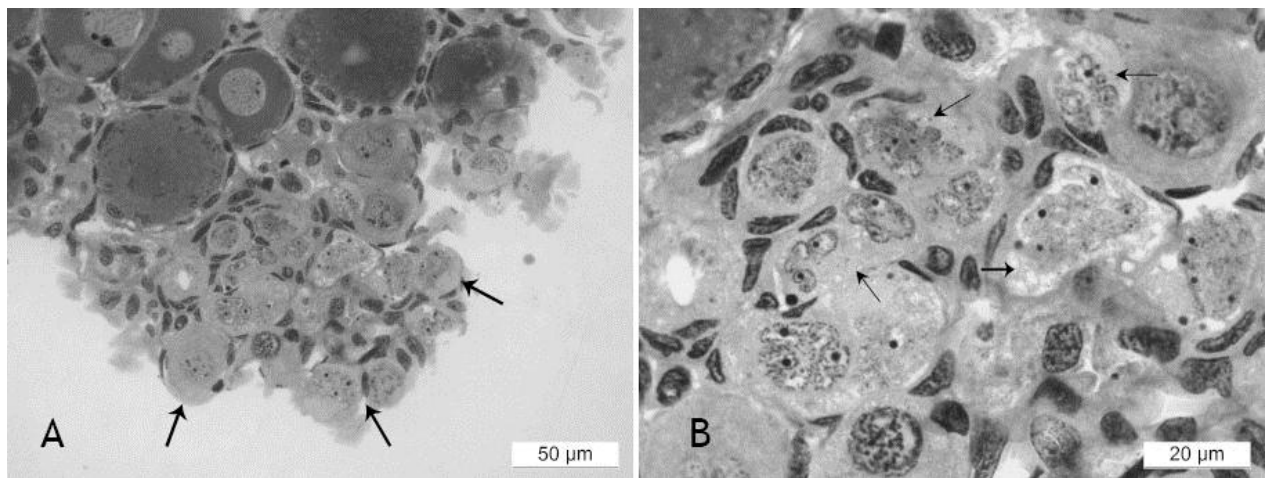


Figura 1

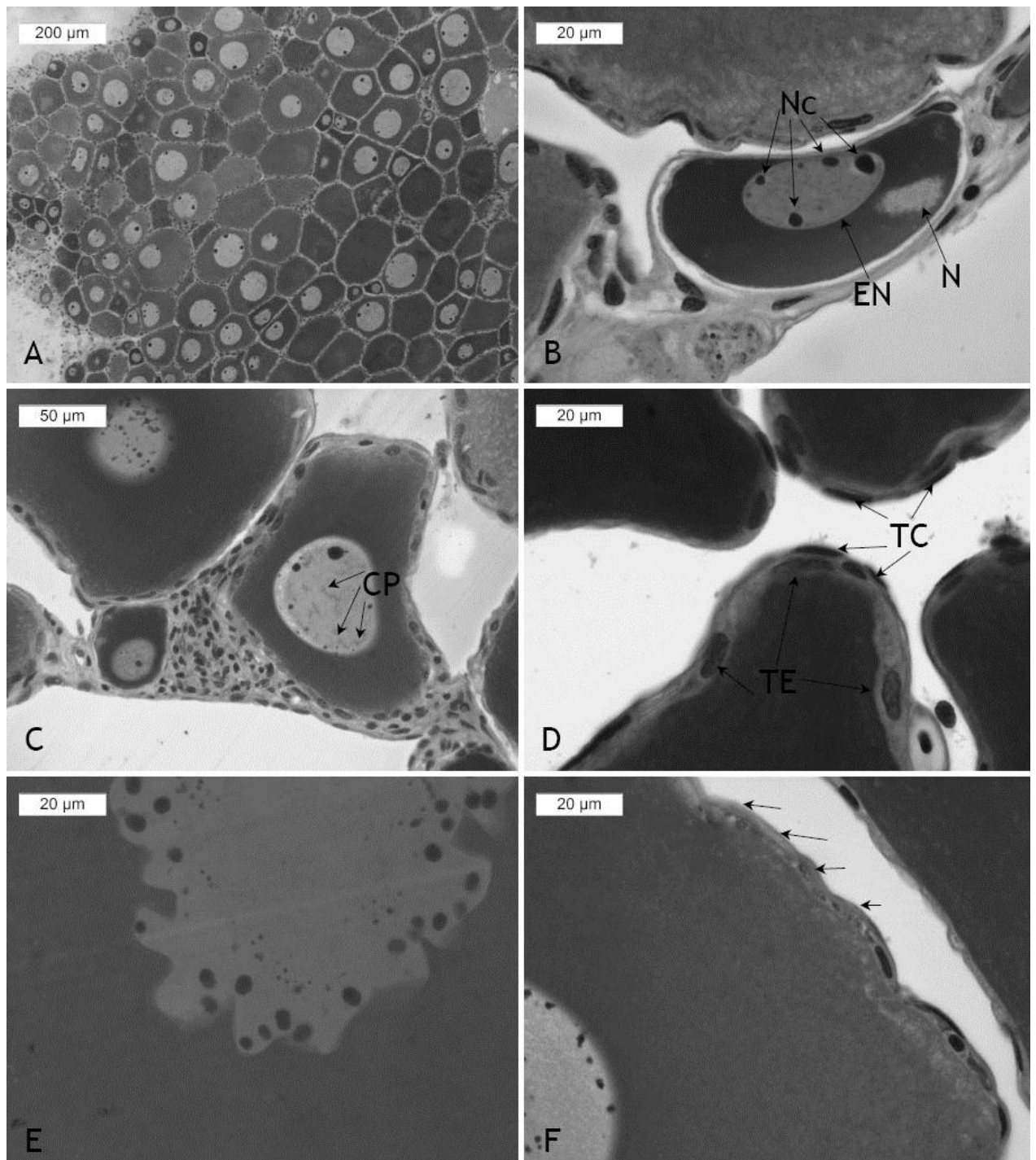


Figura 2

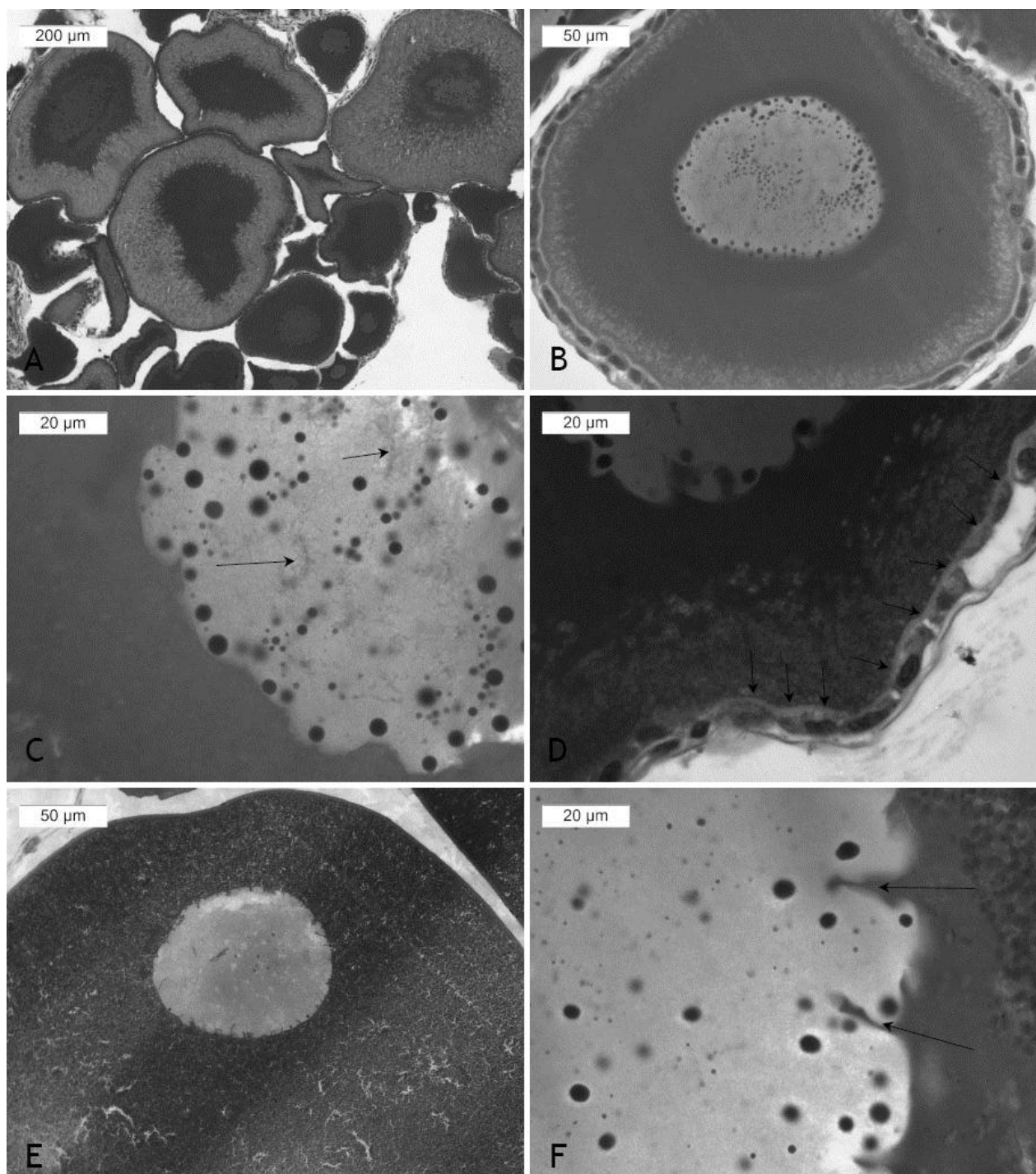


Figura 3

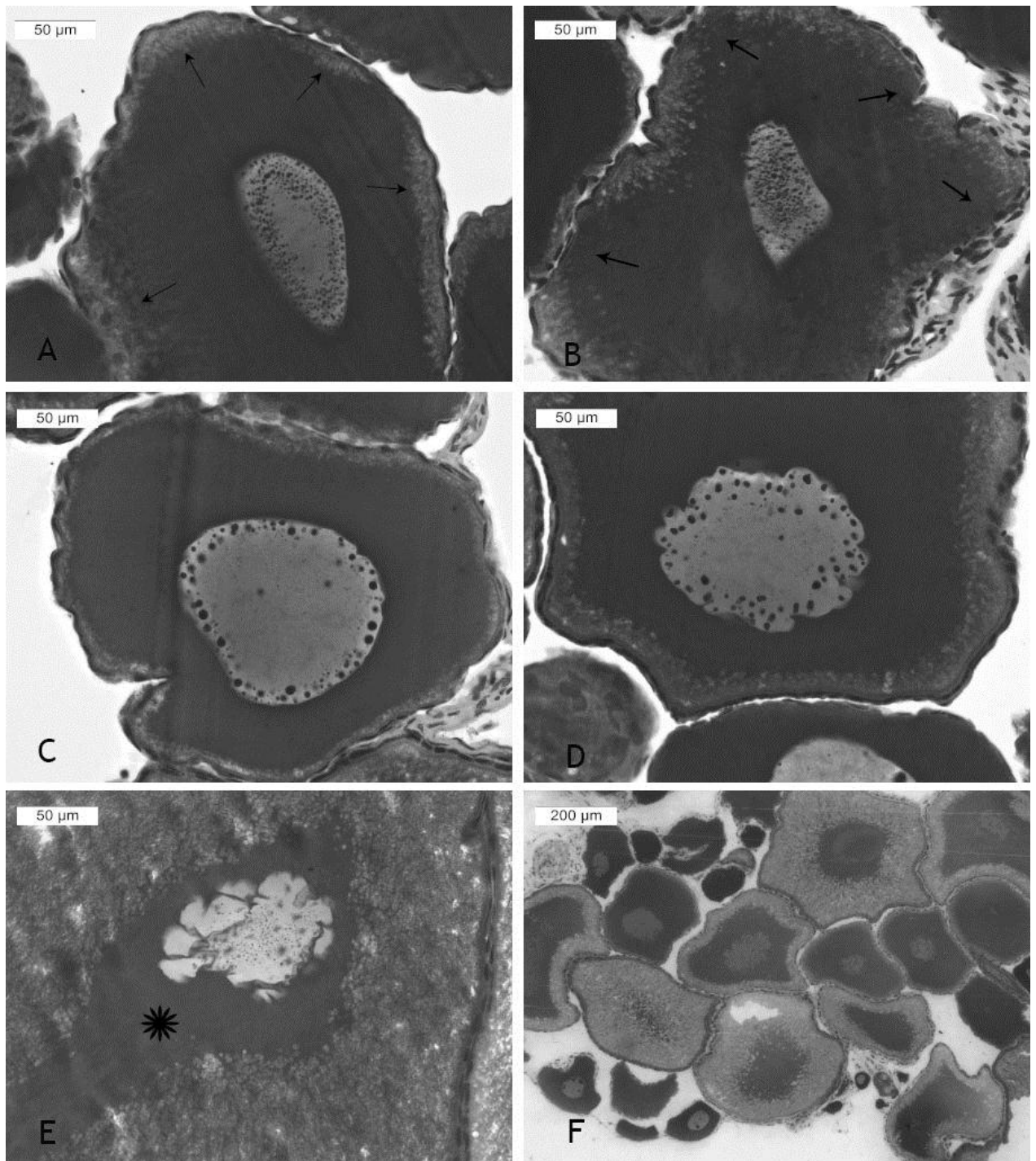


Figura 4

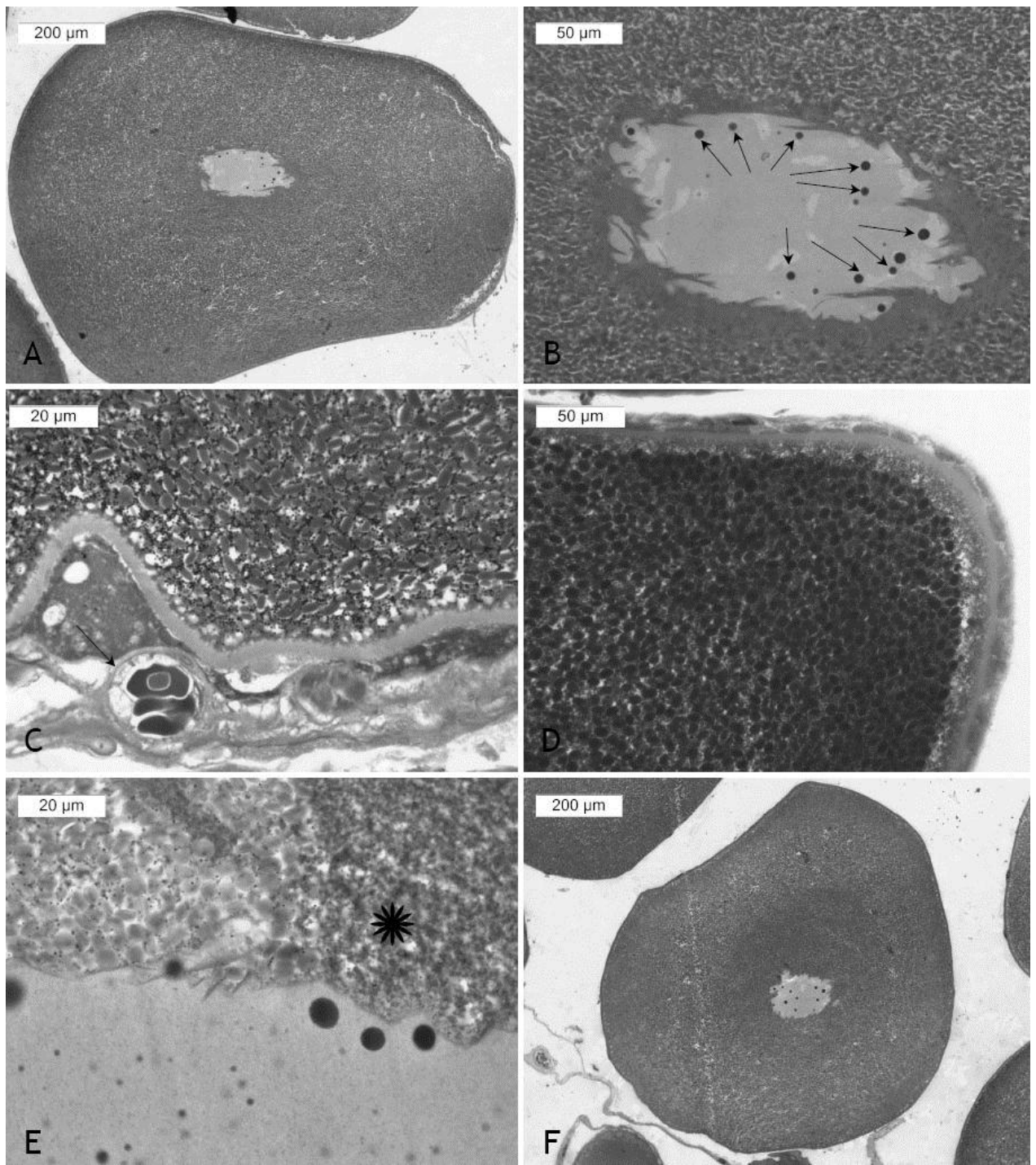


Figura 5

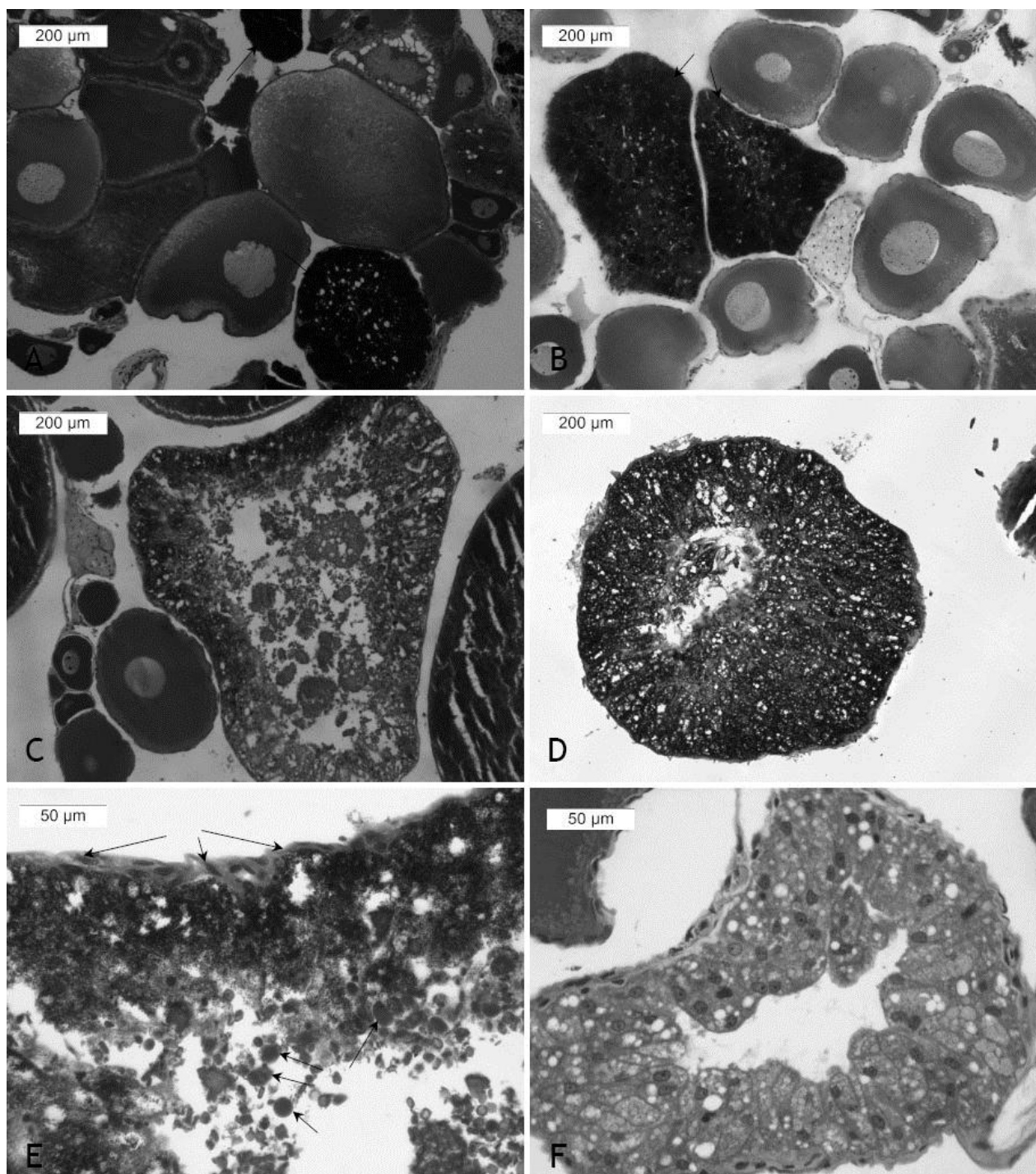


Figura 6

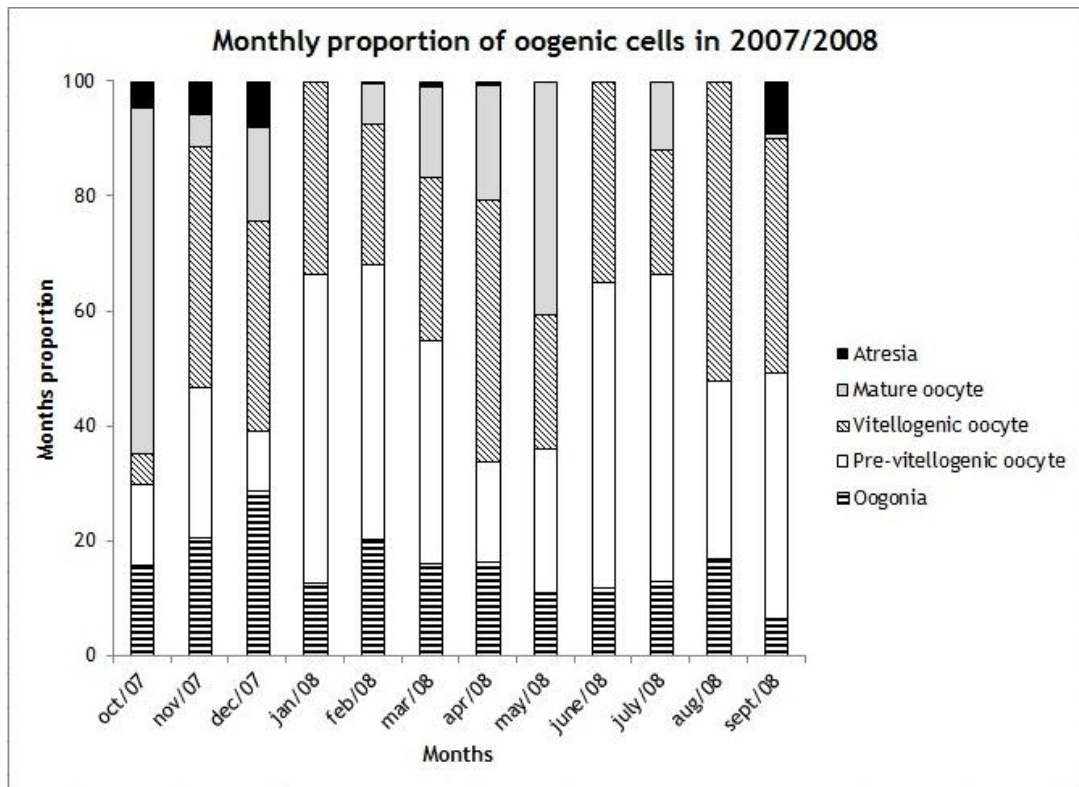


Figura 7A

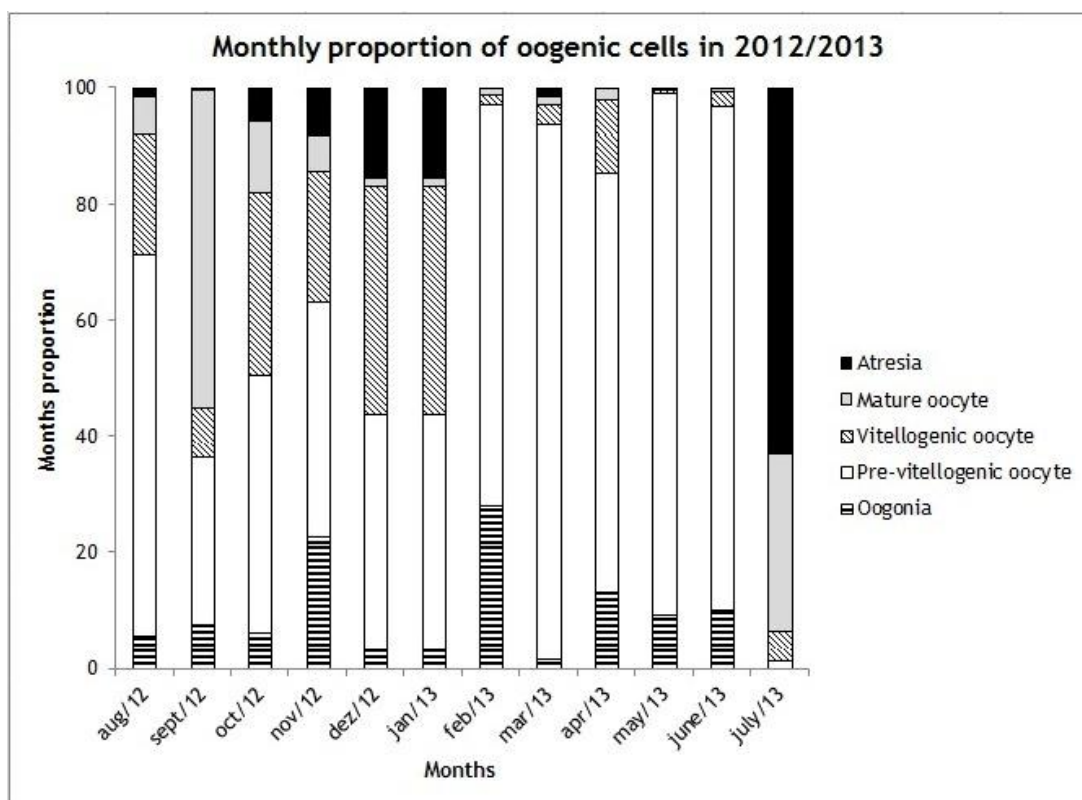


Figura 7B

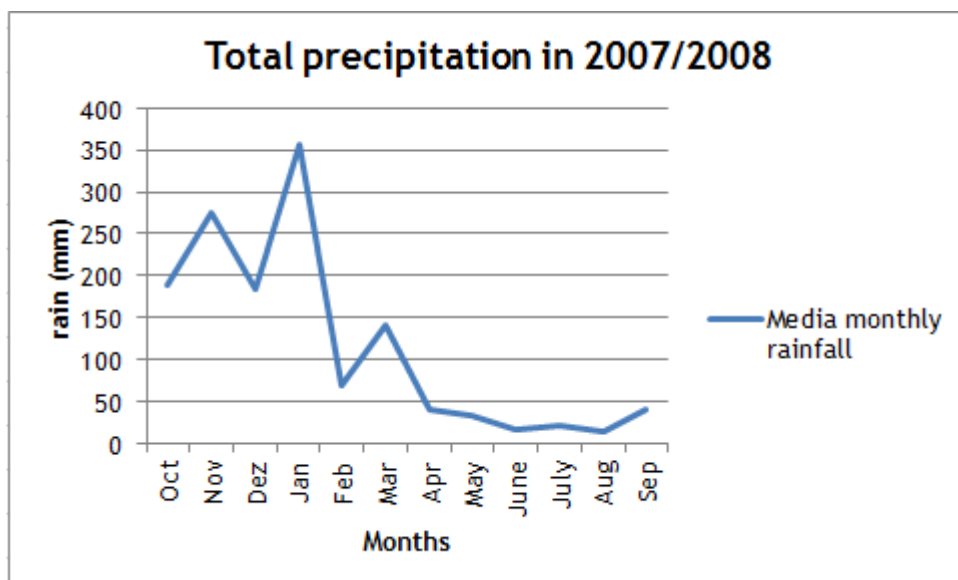


Figura 8A

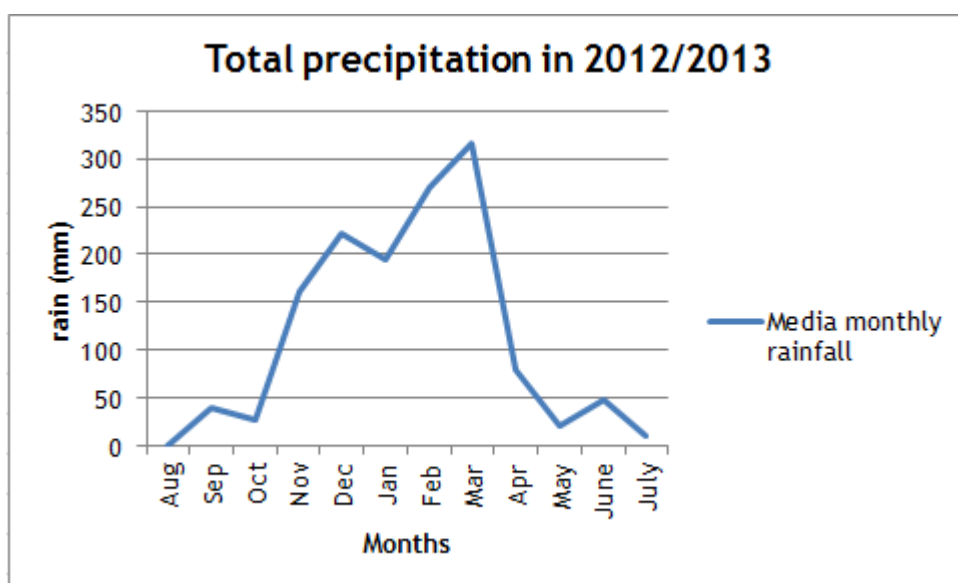


Figura 8B

Referências bibliográficas

- Akef, M. S. A. Reproductive Strategies of Leopard Toad and Mascarene Frog from Giza, Egypt. Zoological science. 31: 37-44. 2014.
- Alberts B.; Bray, D.; Lewis, J. Biologia molecular da célula. 5ª edição, 1396 pag., 2006.
- Aybar, M. J.;Genta, S. B.; Villecco, E. I.; Riera; A. N. S.; Sanchez S. S. Amphibian *Bufo Arenarum* vitronectin-like protein: its localization during oogenesis. Biology of Reproduction 66: 1203–1209, 2002
- Azevedo, C. Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuages) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorui helleri*). Cell Tissue Res. 238: 121-128, 1984.
- Barisone, G. A.; Hedrick, J. L.; Cabada, M. O. Vitelline envelope of *Bufo arenarum*: biochemical and biological characterization. Biol. Reprod. 66: 1203-1209, 2002.
- Barisone, G. A.; Albertali, I. E.; Sánchez, M.; Cabada, M. O. The envelopes of amphibian oocytes: physiological modifications in *Bufo arenarum*. Reprod. Biol. Endocrinol. 11; 1:18, 2003.
- Chang. P.; Torres, J.; Lewis, R. A.; Mowry, K. L.; Houliston, E.; King, M. L. Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus oocytes* through entrapment and association with endoplasmic reticulum. Molecular Biology Cell. 5: 4669 – 4681, 2004.
- Costa, C. L. S.; Lima, S. L.; Andrade, D. R.; Agostinho, C. A. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da Rã – touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. R. Bras. Zootec. 27: 642 – 650, 1998.
- Danilchik, M.V. & Gerhart, J.C. Differentiation of the animal-vegetal axis in *Xenopus laevis* oocytes. I. Polarized intracellular translocation of platelets establishes the yolk gradient. Developmental Biology. 122: 101-112, 1987.
- Díaz-Páez, H.; Ortiz, J. C. The reproductive cycle of *Pleurothema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile. Amphibia-Reptilia. 22: 431 – 445. 2001.
- Dumont, J. N. Oogenesis in *Xenopus laevis*. (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. Journal of Morphology. 136: 153 – 179. 1972.

- Ferreira, A.; Mehanna, M.; Prado, C.A.P. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the pantanal, Brazil. *Biocell*. 32: 185-194, 2008.
- Follett, B. K.; Nicholls, T. J.; Redshaw, M. R. The vitellogenic response in the South African clawed toad (*Xenopus laevis*, Daudin). *Journal Cell. Physiology*. 72: 91 – 102. 1968.
- Iela, I.; Rastogi, R. K.; Delrio, G.; Bagnara, J. T. Reproduction in the mexican leaf Frog, *Pachymedusa dacnicolor* III. The Female. *General and Comparative Endocrinology*. 63: 381 – 392. 1986.
- Grey, R.D., Wolf, D.P., and Hedrick, J.L. (1974) Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis* eggs. *Dev. Biol.*, 36:44 – 61.
- Guraya, S. S. Histochemical study of granulosa (follicular) cells in the preovulatory and postovulatory follicles of amphibian ovary. *Gen. Comp. Endocrinol*. 10: 138 -146. 1968.
- Guraya, S. S. Morphology, histochemistry and biochemistry of follicular growth and atresia. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys*. 13: 229-245, 1973.
- Hedrick, J. L. & Nishihara, T. Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. *J. Electron. Microsc. Tech*. 17: 319-35, 1991.
- Huang, W. S.; Lin, J. Y. & Yu, J. Y. L. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zoological Science*. 14: 497 – 503, 1997.
- Jørgensen, C. B. Ovarian cycle in a temperate zone frog, *Rana temporária*, with special reference to factors determining number and size of eggs. *J. Zool. Lond*. 195: 449-458. 1981.
- Jørgensen, C. B. Dynamics of Oogenesis in a Lower Vertebrate, the Toad *Bufo bufo*. *Acta Zoologica*. 65: 179–185, 1984.
- Jørgensen, C. B.; Shakuntala, K.; Vijayakumar, S. Body Size, Reproduction and Growth in a Tropical Toad, *Bufo melanostictus*, with a Comparison of Ovarian Cycles in Tropical and Temperate Zone Anurans. 46: 379-389. 1986.
- Kanamadi, R. D. & Saidapur, S. K. Pattern of Ovarian Activity in the Indian Toad *Bufo melanotictus* (Schn.). *Proc. Indian. Natn. Sci. Acad*. 3: 307-316. 1982.
- Kaptan, E.; Murathanoglu, O. Annual Morphological Cycles of Testis and Thumb Pad of the Male Frog (*Rana ridibunda*). *The Anatomical Record*. 219: 1106-1114. 2008.

- Mariano, M. I.; Martin, M. G.; Pisano, A. Morphological Modifications of Oocyte Vitelline Envelope from *Bufo arenarum* during Different Functional States. 26: 33–42, 1984.
- Medina, M. F.; Ramos, I. Crespo, C. A.; González-Calvar, S.; Fernández, S. N. Changes in serum sex steroid levels throughout the reproductive cycle of *Bufo arenarum* females. General and Comparative Endocrinology. 136: 143-151. 2004.
- Montezol, M.; Ferreira, A.; Mehanna, M. Spermatogenic dynamics in *Rhinella schneideri* (Anura, Bufonidae). Submetido a International Journal of Morphology em 09/07/2015.
- O'Brien, E.D.; Salicioni, A.M.; Cabada, M. O.; Arranz, S.E. Vitellogenesis in *Bufo arenarum*: identification, characterization and immunolocalization of high molecular mass lipovitellin during oogenesis. Comp. Biochem. Physiol. 155: 256 – 265, 2010.
- Oliveira, C.; Santos, L. R. S. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). Revista Brasileira De Zoologia (Impresso). 21: 919-923, 2004.
- Pancharatna, M. & Saidapur, S. K. Ovarian cycle in the frog *Rana cyanophlyctis*: A quantitative study of follicular kinetics in relation to body mass, oviduct, and fat body cycles. Journal of Morphology. 186: 135-147. 1985.
- Prado, C. P. D. A., Abdalla, F. C., Silva, A. P. Z., & Zina, J. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia , Anura , Leptodactylidae) and some ecological considerations. Braz. J. morphol. Sci. 21: 177–184, 2004.
- Rastolgi, R.; Iela, L.; Delrio, G.; Bagnara, J. T. Reproduction in the Mexican Leaf Frog, *Pachymedusa dacnicolor* II. The Male. General and Comparative Endocrinology. 62: 23-35. 1986.
- Saha, B. K. & Gupta, B. B. P. Studies on annual activity cycle of gonads and breeding behavior of the endangered frog, *Rana leptoglossa* (Cope, 1868). International Journal Science Nature. 2: 683- 691. 2011.
- Sretarugsa, P.; Weerachatanukul, W.; Chavadej, J.; Kruatrachue, M.; Sobhon, P. Classification of Developing Oocytes, Ovarian Development and Seasonal Variation in *Rana tigerina*. Science Asia. 27:1-14. 2001.
- Stifani, S.; Nimpf, J.; Schneider, W.J. Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken: cognate ligands and oocyte receptors. The binding site for vitellogenin is located on lipovitellin I. J. Biol. Chem. 265: 882-888, 1990.

- Villagra, A. L. I.; Cisint, S. B.; Crespo, C. C.; Medina, M. F.; Ramos, I.; Fernandez, S. N. Spermatogenesis In *Leptodactylus Chaquensis*. Histological study. Zygote. 22: 291-299, 2012.
- Wallace, R.A. & Dumont, J.N. The induced synthesis and transport of yolk protein and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis*. Journal Cell Comparative Physiology 72: 73–89, 1968.

5. Conclusões

- A partir da análise dos dois períodos, podemos inferir que o ciclo espermatogênico de *Rhinella schneideri* é do tipo contínuo, com produção de espermatozóides durante o ano todo, no primeiro período é mais evidente a diferenciação das espermátides em espermatozóides na estação chuvosa, com recrutamento ocorrendo de fevereiro a abril e no segundo período a diferenciação ocorrendo durante todos os meses do ano e recrutamento em dezembro, janeiro e fevereiro.
- Baseado na contagem categorizada dos ovócitos, o comportamento ovariano em 2007/2008 pode ser dividido em período de aptidão reprodutiva, o qual vai de outubro a dezembro de 2007, período de recuperação e crescimento do ovário, o qual vai de janeiro a maio de 2008 e período de repouso, o qual vai de junho a agosto de 2008. Já no período de 2012/2013 o comportamento ovariano mostra uma dinâmica diferente. O período de aptidão reprodutiva vai de agosto de 2012 a janeiro de 2013, no qual o crescimento vitelogênico ocorre simultaneamente à maturação e liberação dos ovócitos. O período pós-reprodutivo ou repouso no qual observamos a ausência de células em crescimento vitelogênico vai de fevereiro a junho de 2013.
- As formas de análise empregadas pelos estudos de ciclo reprodutivo em anuros, assim como artefatos de técnica podem ser tendenciosas. Lâminas confeccionadas a partir de material mal fixado ou não obedecendo às regras dos procedimentos histológicos podem originar interpretações equivocadas. Já as formas de análise ainda podem refletir os erros ocasionados pelos artefatos de técnicas originando equivoco novamente.
- O aparecimento de ovócitos pré-vitelogenicos no interior dos túbulos seminíferos de anuros podem aparecer quando os animais estão expostos a contaminantes, mas também ao acaso na natureza.

Anexo 1


Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidenta
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**Dinâmica gametogênica em *Rhinella schneideri***", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de julho de 2015

Michel Montezol

Autor: Michel Montezol
RG nº 1866058-4



Orientadora: Profa. Dra. Adelina Aparecida Francisca Ferreira
RG nº 772312

Anexo 2

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "**Dinâmica gametogênica em *Rhinella schneideri***":

(X) não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

- () CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto nº _____, Instituição:
 () CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto nº _____, Instituição:
 () CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Assinatura:


 Nome do aluno: **Michel Montezol**

Assinatura:


 Nome da orientadora: Prof. Dra. Adelina Aparecida Francisca Ferreira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
 () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
 () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura