

Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae)

Lia R. de S. Santos & Classius de Oliveira

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. 15040-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. E-mail: classius@ibilce.unesp.br

ABSTRACT. Testicular morphometry during the reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). This study describes the male reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) based on testicular morphometric analysis, related to climatic conditions. Fifty individuals were collected in São José do Rio Preto, São Paulo. After macroscopic analysis, the testes were submitted to histological routine, fixed with Bouin, embedded in historesin. Sections of 2 μm were stained with 1% toluidine blue and observed to the microscope. The testes of *D. minutus* are small organs (length 1.90 ± 0.13 mm), whitish, oviform and found in the abdominal cavity. They are located in the cranial extremity of the kidneys and present asymmetry as far as position. According to statistical analyses, there is no intra-individual variation in length and weight of the testes, as well as in the area and diameter of the seminiferous locules. Concerning the testicular histology, it was possible to identify, throughout the year, in seminiferous locules, all the cellular types from the spermatogenic lineage, characterizing a continuous gametogenesis, corroborated by ecological and behavioral factors. Information about testicular morphometry and reproductive cycle has important biological value for anurans in the neotropics.

KEY WORDS. Anuran; reproduction; spermatogenesis; testis.

RESUMO. Este estudo descreve o ciclo reprodutivo de machos de *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) com base na análise da morfometria testicular e a correlação com parâmetros climáticos. Cinquenta indivíduos foram coletados em São José do Rio Preto, São Paulo. Após as análises macroscópicas, os testículos foram encaminhados à rotina histológica, fixados com Bouin e incluídos em historesina. Cortes de 2 μm foram corados com azul de toluidina 1% e observados ao microscópio. Testículos de *D. minutus* são órgãos pequenos (comprimento $1,90 \pm 0,13$ mm), esbranquiçados, com forma oval e encontrados na cavidade abdominal. Estão localizados na extremidade cranial dos rins e apresentam assimetria quanto a sua posição. Estatisticamente não há variação intra-individual no comprimento e no peso dos testículos, bem como na área e diâmetro dos lóculos seminíferos. Quanto à histologia testicular, foi possível identificar ao longo do ano nos lóculos seminíferos, todos os tipos celulares da linhagem espermatogênica, caracterizando uma gametogênese contínua, corroborada por fatores ecológicos e comportamentais. Informações sobre a morfometria testicular e ciclo reprodutivo tem importante valor biológico para anuros de regiões neotropicais.

PALAVRAS-CHAVE. Anuro; espermatogênese; reprodução; testículo.

O sucesso da dispersão dos vertebrados depende, entre outras, da adaptação de seus órgãos e ciclos reprodutivos ao ambiente no qual eles estão envolvidos. O controle dos ciclos reprodutivos requer que os organismos sejam capazes de detectar as mudanças no ambiente e ajustar os parâmetros fisiológicos de acordo com as condições necessárias, isto é realizado através de modulação do sistema neuroendócrino (CALLARD *et al.* 1978). De modo geral, a atividade reprodutiva de anuros de regiões tropicais sazonais é associada ao período úmido (HOOGMOED & GORZULA 1979). Nestes locais, os processos ecológicos anuais tais como pluviosidade e temperatura são vitais

para assegurar a reprodução da maioria das espécies (HOOGMOED & GORZULA 1979, AICHINGER 1987). Estas variáveis determinam a época favorável do ano e a duração em que os anuros se mantêm ativos, determinando sua distribuição estacional (DUELLMAN & TRUEB 1994, HUANG *et al.* 1997).

Tem sido sugerido que o controle da espermatogênese é mantido pela interação entre ritmos endógenos e fatores externos (PANIAGUA *et al.* 1990, SASSO-CERRI *et al.* 2004). A temperatura e o fotoperíodo são os principais fatores ambientais controladores de ciclos reprodutivos sazonais em anfíbios (LOFTS 1974, RASTOGI *et al.* 1976, PANIAGUA *et al.* 1990). Mudanças ambientais

nesses fatores podem interferir na espermatogênese e estabelecer ciclos gametogênicos do tipo contínuo, descontínuo ou potencialmente contínuo (LOFTS 1974, HUANG *et al.* 1997).

Os tipos descontínuos são comumente encontrados em espécies de zonas temperadas e geralmente têm um discreto período de reprodução com pronunciadas mudanças no tamanho das gônadas, na produção de gametas e nas estruturas sexuais acessórias. No tipo potencialmente contínuo ocorre uma interrupção parcial na atividade espermatogênica durante algumas estações no ano, mas espermatogônias primárias permanecem sensíveis à estimulação gonadotrófica. Espécies que habitam regiões tropicais, normalmente apresentam o tipo contínuo de ciclo reprodutivo.

De modo geral, os estudos sobre aspectos reprodutivos dos anuros hilídeos descrevem principalmente o comportamento reprodutivo (HADDAD & SAWAYA 2000, BASTOS & HADDAD 2002), sendo poucos os estudos anatômicos descrevendo o sistema reprodutor (OLIVEIRA & VICENTINI 1998, OLIVEIRA & SANTOS 2004, OLIVEIRA & ZIERI 2005) com ênfase na morfologia gonadal. Entretanto, os trabalhos com *Scinax ranki* (Andrade & Cardoso, 1987) de TABOGA & DOLDER (1991) e com *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) de OLIVEIRA *et al.* (2003) descrevem características histológicas dos testículos. Estudos contendo informações sobre os ciclos reprodutivos com ênfase em análise morfológica foram realizados em espécies de outras famílias, como em *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (SASSO-CERRI *et al.* 2004).

Este trabalho descreve o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* com base em análises morfológicas e morfométricas. Utilizando-se estas evidências como indicativas de atividade do epitélio germinativo foi avaliado se o tipo de ciclo gametogênico contínuo descrito para esta espécie com base em fatores ecológicos e comportamentais (HADDAD & CARDOSO 1992), também está fundamentado pela morfologia testicular.

Este estudo teve como objetivos específicos: 1) descrever a anatomia das gônadas dos machos de *D. minutus* através de análises biométricas macroscópicas, 2) descrever a organização histológica geral e 3) caracterizar o tipo de ciclo gametogênico da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta exemplares de *D. minutus* foram capturados mensalmente durante o período de abril de 2004 a março de 2005 (exceto agosto e setembro de 2004, pois os indivíduos não foram observados em campo, impossibilitando a coleta), por meio de excursões noturnas no Município de São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil (20°45'47,5"S, 49°19'38,8"W). Os animais foram mortos e abertos por laparotomia, onde tiveram seus órgãos expostos para as análises. Os testículos foram removidos e medidos em seus maiores eixos com a utilização de paquímetro de metal e, pesados (g) em balança analítica de precisão (0,001 g). Após este procedimento foram fixados em solução Bouin por 24 horas e desidratados em série crescentes de álcool (HOPWOOD 1990). Os testículos foram incluídos em resina do tipo Methacri-

lato glicol (Historesin Leica®) seccionados em 2,0 µm e corados com Azul de Toluidina 1% (ROBINSON & GRAY 1990). Foram observados ao microscópio Olympus BX 60 e analisados através do programa Image Pró-plus e Image Tool 3.000. Para a análise da área dos lóculos seminíferos, um total de nove lóculos foi aleatorizado de três animais (três lóculos/animal/mês), totalizando, portanto 90 medidas de área. Quanto ao diâmetro, cinco lóculos foram aleatorizados de cada um dos cinco animais coletados em cada mês (n = 250).

Os dados meteorológicos mensais da temperatura do ar (°C) e pluviosidade (mm) foram concedidos pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI de São José do Rio Preto, e o fotoperíodo obtido através do *site* <http://www.apollo11.com/index.php> (Fig. 1).

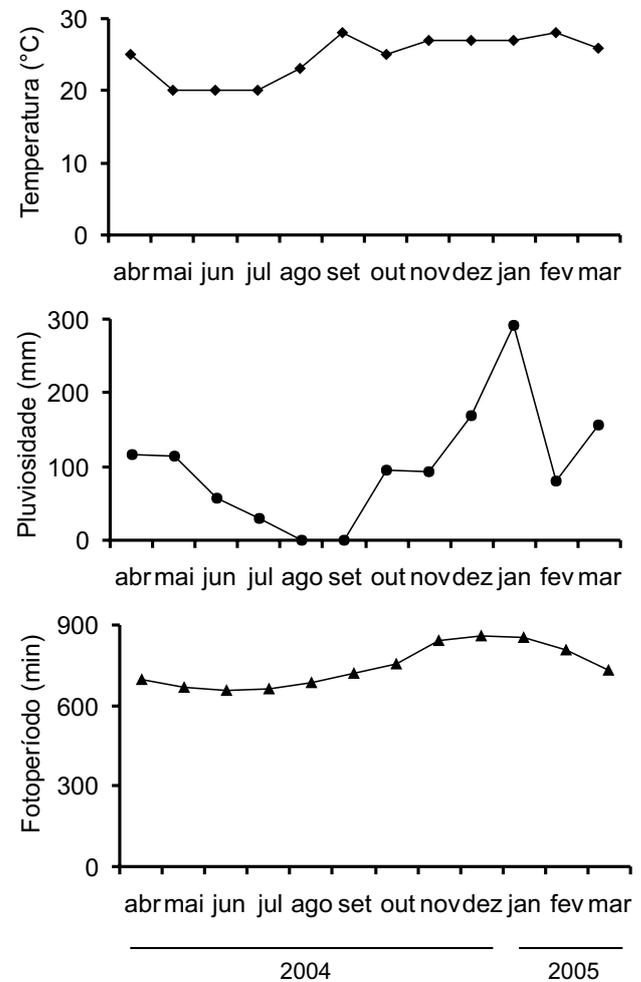


Figura 1. Variação anual na temperatura média (°C), pluviosidade total (mm) e fotoperíodo (minutos) para a área de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Fonte: CATI e *site* <http://www.apollo11.com/index.php>.

Para a análise de dados foi verificada a existência de valores discrepantes (*outliers*), em seguida, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk, e quando necessários, foram submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$ (LEHNER 1996). O comprimento e o peso das gônadas foram analisados entre os meses pelo teste Kruskal-Wallis. Para cada mês, esses parâmetros foram analisados entre a gônada direita e esquerda através do teste Wilcoxon. Para constatar se houve variação dos parâmetros climáticos ao longo do ano foi aplicado o teste Kruskal-Wallis e quando necessário completados pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. A área e o diâmetro locular foram analisados pelo teste One-Way ANOVA. A dependência dos parâmetros analisados e as variáveis climáticas foram verificadas por meio do teste de Regressão Linear Múltipla. Foi considerado $p = 0,05$ para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em ZAR (1999).

Os exemplares analisados foram depositados na Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia e Botânica (DZB-SJRP), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

RESULTADOS

Machos de *D. minutus* são animais de pequeno tamanho corporal alcançando em média $2,31 \pm 0,07$ cm de comprimento rostro-cloacal. Os testículos estão localizados na cavidade abdominal, em posição ventral aos rins e apresentam assimetria quanto sua localização. Os rins se encontram em posição imediatamente ventral à parede dorsal desta cavidade e estão intimamente associados aos testículos através do mesentério gonadal ou mesórquio. Os testículos apresentam uma coloração branco-leitosa, possuem forma ovalada, peso médio de $0,002 \pm 0$ g e comprimento médio de $1,90 \pm 0,13$ mm (Fig. 2) Externamente, os testículos são revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo constituída basicamente por fibras colágenas, que pela sua delgada espessura e transparência, possibilita verificar que os testículos são formados por unidades esféricas, de aspecto granuloso, denominadas lóculos seminíferos (Fig. 3). Estas estruturas abrigam em seu interior as células da linhagem germinativa, com as quais estão associadas às células foliculares ou de Sertoli. Neste epitélio, verificou-se que os machos de *D. minutus* apresentam diferentes tipos celulares germinativos em seus lóculos seminíferos; as espermatogônias primárias e secundárias normalmente na base do epitélio, os espermatócitos primários e secundários, espermatídes iniciais e tardias e os espermatozóides geralmente no lume locular. Ainda quanto à arquitetura histológica testicular, na acomodação dos lóculos seminíferos delimita-se uma área preenchida por tecido intersticial, com vasos sanguíneos e células de Leydig (Fig. 4).

A área e o diâmetro médio do lóculo seminífero são respectivamente de $36012,57 \pm 2128,66 \mu\text{m}^2$ e 221 ± 13 mm. Uma unidade locular seminífera muito similar a estas dimensões obtidas para a espécie esta representada na figura 5.

O comprimento e o peso, entre as gônadas direita ($n = 50$) e esquerda ($n = 50$), para cada mês analisado, não apresentou diferença significativa (Wilcoxon, $Z = 1,04$; $p = 0,29$), o que nos permitiu aleatorizar qualquer uma das gônadas para as análises morfométricas da área e diâmetro locular. Adicionalmente foi calculado o índice gonadossomático ($0,07 \pm 0,02\%$) o qual estatisticamente não variou ao longo do ciclo ($H = 4,86$; $p = 0,84$). O comprimento e o peso das gônadas ($n = 100$) não apresentaram variação entre os meses analisados ($H = 11,24$; $p = 0,25$ e $H = 3,71$; $p = 0,92$, respectivamente) (Fig. 6), mas foram positivamente correlacionadas entre si, independentemente do mês (Correlação de Spearman, $r = 0,30$; $p = 0,03$). Estes parâmetros testiculares não manifestaram qualquer relação com as variáveis climáticas analisadas (Regressão linear múltipla, $F = 1,32$; $p = 0,27$ e $F = 0,60$; $p = 0,61$, respectivamente) bem como quanto ao comprimento do animal (Correlação de Spearman, $r = -0,01$; $p = 0,93$ e $r = -0,02$; $p = 0,85$).

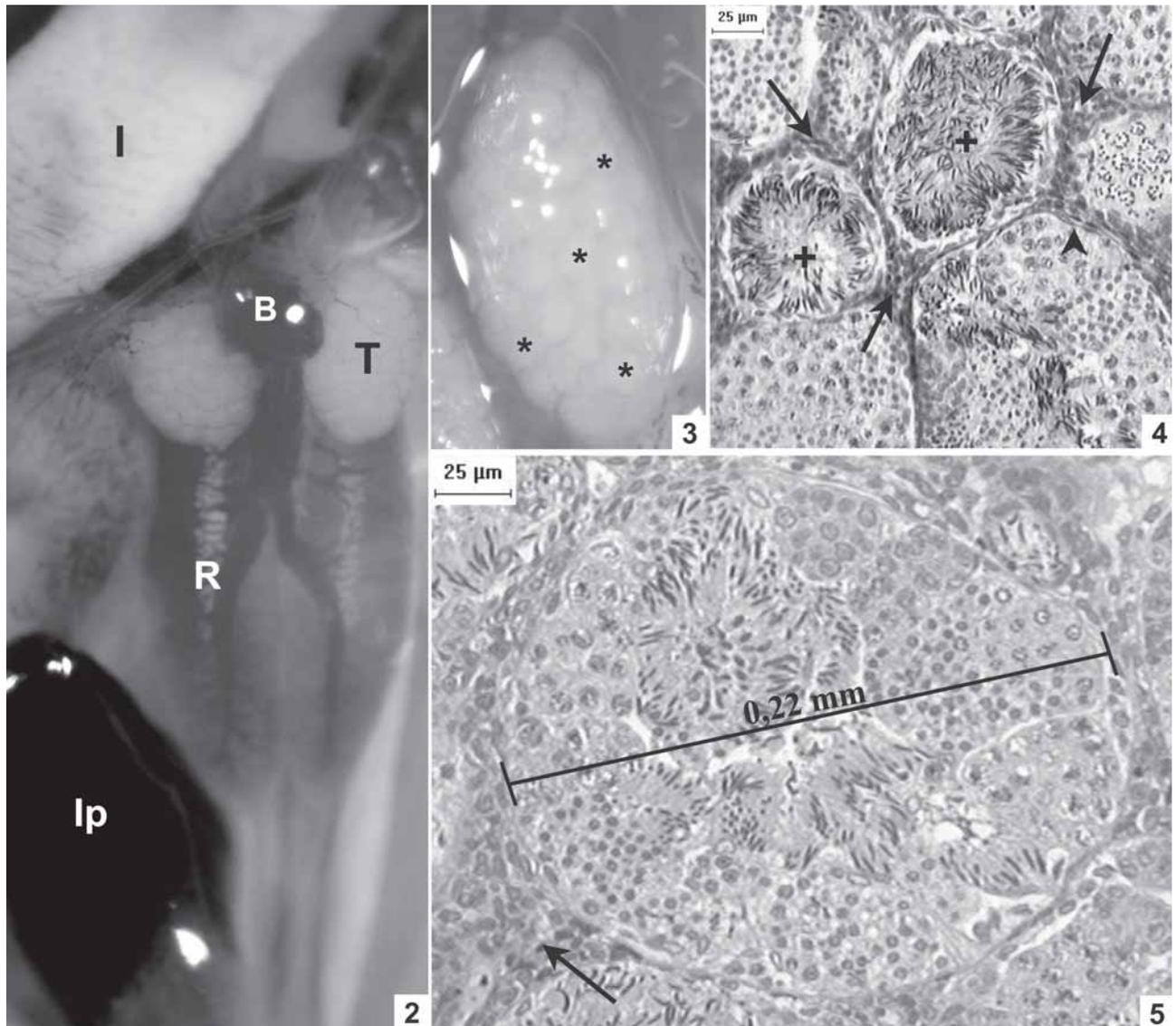
Quanto a arquitetura histológica, tanto a área (One-Way ANOVA, $F = 0,76$; $p = 0,65$) quanto o diâmetro locular (One-Way ANOVA, $F = 0,67$; $p = 0,72$) não apresentaram variação significativa ao longo do ciclo reprodutivo e não manifestaram qualquer outra associação aos demais parâmetros analisados (Fig. 6).

DISCUSSÃO

Em vertebrados os testículos têm duas importantes funções: produção de hormônios e a produção de espermatozóides (HILDEBRAND 1995). DUELLMAN & TRUEB (1994) descrevem os testículos dos anfíbios anuros como estruturas pares, esféricas ou ovais, localizadas numa posição ventral ao nível da metade anterior dos rins, podendo em algumas espécies ser longos e se estenderem até a extremidade posterior dos rins. Segundo GOIN & GOIN (1962) estas estruturas são compactas e de coloração geralmente amarelada.

Os testículos de *D. minutus* apresentam as mesmas características anatomofisiológicas relatadas para outras espécies de anfíbios anuros: *Caudiverbera caudiverbera* (Linnaeus, 1758) (HERMOSILLA *et al.* 1983), *Scinax fuscovarius* (OLIVEIRA & VICENTINI 1998), *Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863) (OLIVEIRA & ZIERI 2005). Entretanto, a forma, o pequeno tamanho e o peso dos testículos pode refletir uma característica anatômica associada ao pequeno porte e biótipo do animal. A propriedade de assimetria quanto à localização observada nas gônadas de *D. minutus*, permite que esta estrutura possa ser deslocada em diferentes alturas, profundidades e orientações de seus eixos longitudinal e transversal. Esta mobilidade ocorre em função dos estados fisiológicos das vísceras adjacentes o que pode representar uma característica protetora para a gametogênese (OLIVEIRA & VICENTINI 1998).

Entretanto no decorrer do ciclo reprodutivo de *D. minutus* os testículos não manifestaram variação anatômica de tamanho entre os antímeros, ou seja, não há variação intra-individual significativa entre os pares gonadais durante o ciclo. Quan-



Figuras 2-5. (2) Observação macroscópica dos testículos de *Dendropsophus minutus*: (B) baço, (I) intestino, (Ip) porção final do intestino com incomum pigmentação conferida por melanócitos viscerais, (R) rim, (T) testículo; (3) detalhe macroscópico dos lóculos seminíferos (*); (4) lóculo seminífero delimitado pela parede locular (seta), ductos eferentes intratesticulares (+) e tecido interlocular (setas); (5) dimensão da estrutura locular que representa a área e o diâmetro médio dos lóculos seminíferos; e o tecido interlocular (setas).

do os indivíduos foram agrupados mensalmente e agrupados ao longo do ciclo, também não houve variação nos parâmetros biométricos, ou seja, o peso e o comprimento não expressam diferenças anatômicas relacionadas a qualquer um dos fatores (fotoperíodo, temperatura e pluviosidade). EMERSON (1997), trabalhando com 90 espécies de anuros, das quais 25 eram representantes da família Hylidae, comparou o peso dos testículos com diferentes sistemas de reprodução, tais como: tamanho da desova, níveis de andrógenos e diferentes graus de comporta-

mento mediado por andrógenos e verificou que há diferenças anatômicas dos testículos destes animais. Afirma ainda que esta variação anatômica relaciona-se principalmente à variação na produção de espermatozoides e tamanho da desova em detrimento de comportamentos agonísticos correlacionados com andrógenos. As características anatômicas do testículo de *D. minutus* são semelhantes às propriedades anatômicas, para outros Hílideos com biótipo e tamanho corporal semelhante, relatadas por EMERSON (1997).

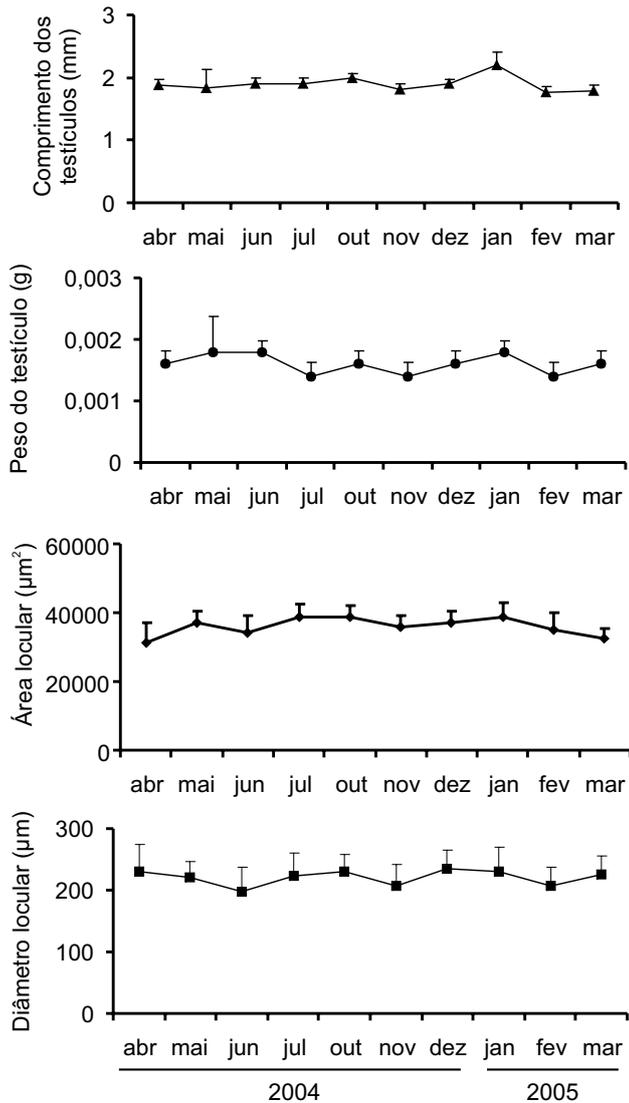


Figura 6. Parâmetros morfométricos: variação do comprimento e peso dos testículos; área e diâmetro dos lóculos seminíferos de *Dendropsophus minutus* durante o período de abril de 2004 a março de 2005, em São José do Rio Preto, São Paulo. As barras representam o período do estudo.

Segundo LOFTS (1974) e HUANG *et al.* (1997) os ciclos gametogênicos dos anuros, são classificados em tipos descontínuos, potencialmente contínuos e contínuos. Os tipos descontínuos são comumente encontrados em espécies de zonas temperadas e geralmente têm um discreto período de reprodução com pronunciadas mudanças na produção de gametas, no tamanho das gônadas e das estruturas sexuais acessórias, como descrito para *Rana dybowskii* Günther, 1876 (KO *et al.* 1998). O tipo potencialmente contínuo exibe uma parada parcial na atividade espermatogênica durante algumas estações no ano, mas esper-

matogônias primárias permanecem sensíveis à estimulação gonadotrófica, como documentado para *Pelophylax nigromaculatus* (Hallowell, 1861) e *Glandirana rugosa* (Temminck & Schlegel, 1838) (KO *et al.* 1998). Espécies que habitam regiões tropicais, onde as condições climáticas não mostram apreciáveis flutuações, têm um tipo contínuo de ciclo espermatogênico. CALLARD *et al.* (1978), reporta que no tipo contínuo, ocorrem ondas espermatogênicas sucessivas, portanto sem interrupção na produção de espermatozoides. Com base nestas considerações e nas análises histológicas dos lóculos seminíferos verificou-se que os machos de *D. minutus* apresentam tipos celulares diferentes que variam desde espermatogônias primárias aos espermatozoides maduros, em maior ou menor proporção de cada um destes e dos tipos celulares intermediários. Nossos dados corroboram a reprodução contínua ao longo do ano todo previamente descrita para a espécie por HADDAD & CARDOSO (1992) com base em fatores ecológicos e comportamentais, reforçando a ocorrência de espermatogênese contínua, típica para os anfíbios de regiões neotropicais (DUELLMAN & TRUEB 1994).

Um aspecto importante a ser salientado é que as variações climáticas não interferem no comprimento e peso dos testículos de *D. minutus* como também constatado para *Pelophylax perezii* (Seoane, 1885) (DELGADO *et al.* 1989). Além disso, em *D. minutus* não existe variação da área e diâmetro dos lóculos seminíferos nas mesmas condições. Segundo HUANG *et al.* (1996), analisando a espécie *Bufo bankorensis* Barbour, 1908, a variação sazonal na atividade testicular normalmente se reflete no peso gonadal. Tal padrão é geralmente exibido por espécies com um tipo potencialmente contínuo de ciclo espermatogênico e por aquelas com ciclo testicular do tipo descontínuo, tal como *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758), na qual o peso testicular é um índice apropriado da atividade testicular (LOFTS *et al.* 1972). Com base em nossas análises, cabe considerar, portanto, que tanto comprimento e peso testicular quanto diâmetro dos lóculos seminíferos não constituem um bom índice para se atribuir status reprodutivo da espécie em questão, o que pode se aplicar para a maioria dos anuros de regiões neotropicais. Até algumas espécies originárias de áreas temperadas e adaptadas fisiologicamente a regiões neotropicais como *Lithobates catesbeianus* cujo ciclo gametogênico é contínuo, o peso testicular também não apresentou variação significativa ao longo do ciclo reprodutivo (SASSO-CERRI *et al.* 2004). Ainda nesse estudo, SASSO-CERRI *et al.* (2004) sem detectar diferenças macroscópicas, verificaram que há variação no diâmetro do lóbulo seminífero, do tecido intersticial e do volume dos ductos excretórios, porém, a manutenção do peso testicular em anfíbios que apresentam um ciclo reprodutivo contínuo, pode estar relacionada a mudanças compensatórias no volume e densidade dos componentes testiculares durante o ciclo.

É importante ressaltar que os machos de *D. minutus* foram identificados vocalizando durante todos os meses. Porém em agosto e setembro, meses em que não choveu, não foram observados em campo, o que nos leva a inferir que esta variá-

vel climática pode ser um fator controlador da atividade reprodutiva destes animais.

Para *D. minutus* pequenas oscilações nos parâmetros climáticos locais não implicaria em conseqüentes alterações estruturais tanto em nível macroscópico quanto microscópico das gônadas. No entanto, nesta espécie e em outras com ampla distribuição geográfica, não pode ser refutada a possibilidade desses parâmetros testiculares apresentarem alterações sob condições climáticas geográficas muito adversas.

Informações sobre a biologia reprodutiva (morfologia, modos reprodutivos e aspectos comportamentais) possuem relevante valor biológico e podem ser utilizados para corroborar a filogenia da família, que nos Hylidae foi recentemente revistada (FAIVOVICH *et al.* 2005).

Em síntese, a análise da anatomia e histologia testicular de *D. minutus* ao longo da reprodução possibilita concluir que o ciclo gametogênico é contínuo.

AGRADECIMENTOS

CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processo nº 02/08016-9) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro para o desenvolvimento do trabalho. A Gisèle Manganelli Fernandes (Departamento de Letras Modernas, IBILCE) pela revisão do abstract e a Thais Billalba Carvalho pelo auxílio nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AICHINGER, M. 1987. Annual activity patterns of anurans in the seasonal neotropical environment. *Oecologia* **71** (4): 583-592.
- BASTOS, R.P. & C.F.B. HADDAD. 2002. Acoustic and aggressive interactions in *Scinax rizibilis* (Anura: Hylidae) during the reproductive activity in southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* **23** (1): 97-104.
- CALLARD, I.P.; G.V. CALLARD; V. LANCE; J.L. BOLAFFI & J.S. ROSSET. 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biology of Reproduction* **18** (1): 16-43.
- DELGADO, M.J.; P. GUTIÉRREZ & M. ALONSO-BEDATE. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. *General and Comparative Endocrinology* **73** (1): 1-11.
- DUELLMAN, W.E. & L. TRUEB. 1994. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-Hill, 670p.
- EMERSON, S.B. 1997. Testis size variation in frogs: testing the alternatives. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **41** (4): 227-235.
- FAIVOVICH, J.; C.F.B. HADDAD; P.C. GARCIA; D.R. FROST; J.A. CAMPBELL & W.C. WHEELER. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **294**: 1-240.
- GOIN, C.J. & O.B. GOIN. 1962. *Introduction to Herpetology*. San Francisco, W.H. FREEMAN, 341p.
- HADDAD, C.F.B. & A.J. CARDOSO. 1992. Elección del macho por la hembra de *Hyla minuta* (Amphibia: Anura). *Acta Zoologica Lilloana* **41**: 81-91.
- HADDAD, C.F.B. & R.J. SAWAYA. 2000. Reproductive modes of Atlantic Forest Hylid frogs: A general overview and the description of a new mode. *Biotropica* **32** (4b): 862-871.
- HERMOSILLA, B.I.; P.A. URBINA & P.J.C. CABRERA. 1983. Spermatogenesis en la Rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linnaeus, 1758) (Anura, Leptodactylidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* **54**: 103-115.
- HILDEBRAND, M. 1995. *Análise da estrutura dos vertebrados*. São Paulo, Atheneu, 700p.
- HOOGMOED, M. & S. GORZULA. 1979. Checklist of the savanna inhabiting frogs of the El Manteco region with notes on their ecology and the description of a new species of tree frogs (Hylidae, Anura), *Zoologische Mededelingen* **54** (13): 183-216.
- HOPWOOD, D. 1990. Fixation e fixatives, p. 21-42. *In*: J.D. BANCROFT & A. STEVENS. *Theory and practice of histological techniques*. New York, Churchill Livingstone, 3rd ed., 726p.
- HUANG, W.S.; J.Y. LIN & J.Y.L. YU. 1996. The male reproductive cycle of the toad *Bufo bankorensis* in Taiwan. *Zoological Studies* **35** (2): 128-137.
- HUANG, W.S.; J.Y. LIN & J.Y.L. YU. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Canadian Journal of Research: Zoological Sciences* **14**: 497-503.
- KO, S.K.; H.M. KANG; W.B. IM & H.B. KWON. 1998. Testicular cycles in three species of Korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa* and *Rana dybowskii*. *General and Comparative Endocrinology* **111**: 347-358.
- LEHNER, P.N. 1996. *Handbook of ethological methods*. Cambridge, University Press, 672p.
- LOFTS, B. 1974. Reproduction, p.107-218. *In*: B. LOFTS (Ed). *Physiology of the amphibians*. New York, Academic Press, 592p.
- LOFTS, B.; J.J. WELLEN & T.J. BENRAAD. 1972. Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, *Rana temporaria* III. The gonads and cholesterol cycles. *General Comparative Endocrinology* **18**: 344-363.
- OLIVEIRA, C. & C.A. VICENTINI. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Biociências* **6** (1): 79-88.
- OLIVEIRA, C.; C.A. VICENTINI & S.R. TABOGA. 2003. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). *Caryologia* **56** (1): 75-83.
- OLIVEIRA, C. & L.R.S. SANTOS. 2004. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **21** (4): 919-923.
- OLIVEIRA, C. & R. ZIERI. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo.

- Revista Brasileira de Zoologia** 22 (2): 454-460.
- PANIAGUA, R.; B. FRAILE & F.J. SAEZ. 1990. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. **Histology and Histopathology** 5: 365-378.
- RASTOGI, R.K.; L. IELA; P.K. SAXENA & G. CHIEFFI. 1976. The control of spermatogenesis of the green frog, *Rana esculenta*. **The Journal of Experimental Zoology** 196: 151-166.
- ROBINSON, G. & T. GRAY. 1990. Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining, p. 525-562. In: J.D. BANCROFT & A. STEVENS. **Theory and practice of histological techniques**. New York, Churchill Livingstone, 3rd ed., 726p.
- SASSO-CERRI, E.; F.P. FARIA; E. FREYMÜLLER & S.M. MIRAGLIA. 2004. Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Zoology** 301A: 249-260.
- TABOGA, S.R. & M.A.H. DOLDER. 1991. Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas** 8: 66-71.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. New Jersey, Printice Hall, 663p.

Recebido em 21.III.2006; aceito em 28.II.2007.