

Influência da estacionalidade no acúmulo de proteínas e carboidratos no fígado de *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae)

Influence of seasonality on protein and carbohydrate accumulation in the liver of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae)

José Lucas de Araújo^I, José Jailson Lima Bezerra^{II}, Márcio Frazão Chaves^{III},
 Jakeline Moreira da Silva^{IV}, Geraldo Jorge Barbosa de Moura^V

RESUMO

Leptodactylus macrosternum é considerado bioindicador ambiental, fornecendo informações sobre possíveis perturbações e status de conservação dos ecossistemas. Mediante o exposto, objetivou-se quantificar as proteínas e carboidratos presentes nas células do fígado desta espécie de acordo com as variações estacionais. Foram coletados 32 machos adultos em área de Caatinga, no Horto Florestal Olho D'água da Bica, cidade de Cuité, estado da Paraíba, nordeste do Brasil entre os meses de janeiro a dezembro de 2013. Pequenos fragmentos de fígado dos animais foram removidos, pesados, medidos e encaminhados à rotina histológica. Os carboidratos foram corados com reação de PAS e as proteínas foram coradas com xilidina. A quantificação das proteínas e dos carboidratos depositadas nos fígados dos animais foram estatisticamente analisadas pelo teste Kruskal-Wallis e quando necessário completado pelo Teste de Dunn. Os valores referentes a as proteínas tiveram destaque para os animais coletados durante os meses de agosto (140985, 9 ± 35395 , 4 pixels) e dezembro (142731.8 \pm 31865.7248). Enquanto que a quantidade de carboidratos nos fragmentos de fígado não apresentaram diferenças significativas durante os meses amostrados, permanecendo pouco acima de 150000 pixels. Em relação a pluviosidade e temperatura foram observadas diferenças significativas, $r = 0,01/p = 0,03$ e $r = 0,02/p = 0,04$ respectivamente, sobre a quantidades de carboidratos depositados, sugerindo que *L. macrosternum* atua como um importante bioindicador de variações estacionais.

Palavras-chave: Caatinga; Histoquímica; Anuros

ABSTRACT

Leptodactylus macrosternum is considered an environmental bioindicator, providing information on possible disturbances and conservation status of ecosystems. Thus, the objective was to quantify the proteins and carbohydrates present in liver cells of this species according to seasonal variations. Thirty-two adult males were collected in Caatinga area (coordinates), in the Horto Florestal Olho D'água da Bica, Cuité city, Paraíba state, northeastern Brazil, from January to December 2013. Small liver fragments of animals they were removed, weighed, measured and referred to the histological routine. Carbohydrates were stained with PAS reaction and proteins were stained with xylidine. The quantification of proteins and carbohydrates deposited in the livers of the animals were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis test and when necessary completed by the Dunn test. The values for proteins were highlighted for the animals collected during the months of August (140985, 9 ± 35395 , 4 pixels) and December (142731.8 \pm 31865.7248). While carbohydrates showed no significant differences during the months sampled, staying just above 150000 pixels. Regarding rainfall and temperature, significant differences were observed, $r = 0.01 / p = 0.03$ and $r = 0.02 / p = 0.04$ respectively, regarding the amounts of carbohydrate deposited, suggesting that *L. macrosternum* acts a important bioindicator of seasonal variations.

Keywords: Caatinga; Histochemistry; Anurans

I Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, Brasil - joselucasaraujo.biologia@gmail.com

II Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil - josejailson.bezerra@hotmail.com

III Universidade Federal de Campina Grande, PE, Brasil - marciochavesufcg@gmail.com

IV Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, Brasil - kellymoreira.bioo@gmail.com

V Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, Brasil - geraldojbmm@gmail.com



1 INTRODUÇÃO

São conhecidas 6.771 espécies de anfíbios no mundo, sendo que 5.858 equivalem à ordem Anura (FROST, 2010). Os anuros apresentam características adaptativas intrínsecas ao grupo, como membros posteriores alongados e as vértebras fundidas adaptadas para saltos. Exercem importante função ecológica no controle de insetos e outros invertebrados, que são os principais integrantes de sua dieta, além disso, são um dos grupos mais sensíveis a variação do meio ambiente, sendo assim amplamente utilizados como biomarcadores ambientais (ETEROVICK; SAZIMA, 2004).

Os anuros da família Leptodactylidae é uma das mais ameaçadas e entre as causas do declínio está a redução dos habitats e as mudanças climáticas (STUART *et al.*, 2004). Segundo LI *et al.* (2013), dentre os fatores responsáveis pelas mudanças climáticas destacam-se a umidade e a temperatura, sendo estes extremamente importantes para a sobrevivência dos anuros. Por isso, avaliar a tolerância a extremos climáticos de anuros parece uma questão fundamental para sua conservação (NAVAS *et al.*, 2007).

Neste sentido, o conhecimento dos padrões energéticos, dos diferentes fatores e suas relações com a biologia destes animais fornecem informações que podem complementar o entendimento dos princípios de estruturação das comunidades em seus ecossistemas (BIONDA *et al.*, 2011). De uma maneira geral, estes princípios baseados em informações relativas à dinâmica de populações e de comunidades, que visam entender a distribuição de grupos de espécies, suas relações internas e com o meio, é uma ferramenta primária e essencial para estudos mais aplicados, voltados para o levantamento, conservação e manejo da biodiversidade (HOCKEY; CURTIS, 2009).

Em áreas de domínio Caatinga, o padrão de distribuição de chuvas determina a atividade energética dos anuros. Durante a estiagem, as espécies de anuros que ocorrem nesta região apresentam adaptações fisiológicas e comportamentais às variações térmicas, de escassez de alimentos e água em poças temporárias (PRADO *et al.*, 2000; BERTOLUCI; RODRIGUES, 2002). Nesta perspectiva, estudos sobre a história, ecologia e evolução dos anfíbios nessas áreas, são extremamente necessários para auxiliar o entendimento dos padrões de distribuição das espécies bem como a sua conservação nesse ecossistema (RODRIGUES, 2003).

Considerando sua vulnerabilidade aos fatores antrópicos e a sua alta especificidade microambiental, várias espécies da família dos Leptodactylidae possuem um importante papel em muitos habitats sejam eles terrestres ou aquáticos, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, atuando para manutenção e controle de outras espécies (VITT; CALDWELL, 2001). Como por exemplo, o *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) considerado bioindicador ambiental, que fornece informações sobre possíveis perturbações e conservação dos ecossistemas (HEYER *et al.*, 2000).

Vale ressaltar que durante a estiagem, espécies de anuros como o *L. macrosternum* apresentam adaptações fisiológicas e comportamentais às variações térmicas, de escassez de alimentos e água em poças temporárias (SUN; NARINS, 2005; AMÉZQUITA *et al.*, 2011). A quantificação de elementos importantes como carboidrato e proteínas nesse órgão podem fornecer importantes informações sobre o estado reprodutivo e ou nutricional de indivíduos em uma população (GUIMARÃES, 2010). As atividades diárias e sazonal de anuros são reguladas por diferentes fatores no ambiente, tais como precipitação, umidade relativa do ar, temperatura e fotoperíodo (HATANO *et al.*, 2002; BOQUIMPANI-FREITAS *et al.*, 2002; XIMENEZ; TOZETTI, 2015; BOTH *et al.*, 2008; VAN SLUYS *et al.*, 2012; TOZETTI *et al.*, 2010). A baixa temperatura do ar, por exemplo, afeta diretamente os animais ectotérmicos devido a redução da atividade metabólica, podendo causar uma redução da atividade de vocalização ou forrageio (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Nesta perspectiva, sabe-se que os estudos histoquímicos dos anuros são escassos, assim como a determinação das proteínas e carboidratos presentes no fígado de *L. macrosternum*, que podem indicar como as espécies se adaptam aos variados ecossistemas e flutuações estacionais/sazonais, a partir da quantidade dos componentes químicos presentes no fígado (VIEIRA *et al.*, 2007). Mediante o exposto, objetiva-se quantificar as proteínas e carboidratos presentes no fígado de *L. macrosternum*, permitindo melhor entendimento sobre as funções metabólicas dos indivíduos analisados. Além disso, buscou-se associar a variação estacional com o acúmulo de proteínas e carboidratos nas células hepáticas de animais coletados na mesorregião do Agreste paraibano, Brasil.

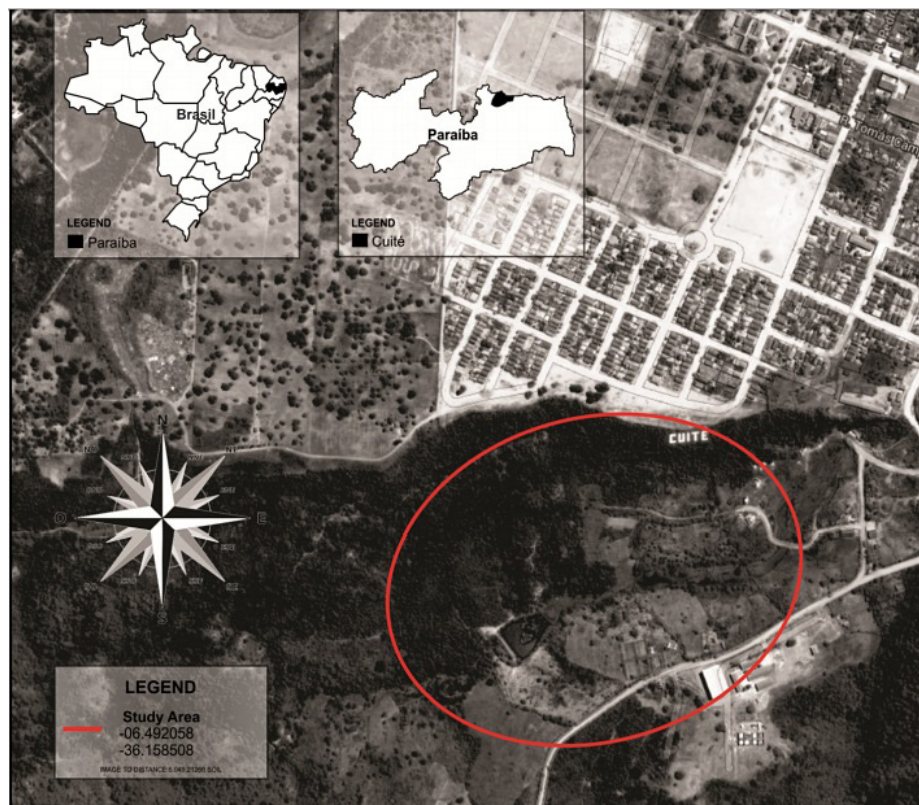
2 METODOLOGIA

2.1. Área de estudo

Os espécimes de *Leptodactylus macrosternum* foram coletados no Horto Florestal Olho D'água da Bica (HFODB) que fica localizado no município de Cuité-PB (Figura 1), na mesorregião do Agreste paraibano e na microrregião do Curimataú Ocidental (6°29'06"S/36° 9'24"O), com altitude de 667 metros acima do nível do

mar e uma área total de 758,6 km², possui clima quente e seco, com temperatura oscilando entre 17° e 28°C, pluviosidade média mensal de 76,35 mm e umidade relativa em torno de 70% (TEIXEIRA, 2003).

Figura 1 – Localização da área de coleta, Horto Florestal Olho D'água da Bica, Cuité, Paraíba



Fonte: CHAVES et al., 2017

Além disso, apresenta uma hidrografia peculiar, com rios efêmeros, açudes, além de fontes d'água naturais e dentre essas fontes, está o Olho D'água da Bica, manancial perene localizado próximo ao campus do Centro de Educação e Saúde (CES) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). A região dos arredores da nascente é área de Caatinga arbórea e arbustiva, com presença de córregos, barragens, áreas úmidas e áreas de encosta (COSTA, 2009). Mostrar o padrão histórico de precipitação.

2.2. Espécimes avaliadas

Para este trabalho foram utilizados 32 machos adultos da espécie *L. macrosternum*, coletados quinzenalmente entre os meses de janeiro a dezembro de 2013, na área do Horto Florestal Olho d'água da Bica, com autorização prévia do IBAMA/SISBIO (44134-1). A seguir apresenta-se a (Tabela 1), referente ao total de machos coletados em cada mês, nos meses entre janeiro-abril e setembro-outubro não foram avistados indivíduos de *L. macrosternum* durante as saídas de campo.

Tabela 1 – Referente à quantidade de espécimes coletados

Maio	6 exemplares
Junho	11 exemplares
Julho	7 exemplares
Agosto	3 exemplares
Novembro	3 exemplares
Dezembro	2 exemplares

2.3. Preparação das Lâminas

Após a realização das coletas, os indivíduos machos de *L. macrosternum* foram levados ao Laboratório de Biossistemática de Anfíbios (LABAN) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Cuité-PB. Para a preparação das lâminas, pequenos fragmentos de fígado dos animais foram removidos, pesados, medidos e encaminhados à rotina histológica (RIBEIRO; LIMA, 2000).

Os fígados foram fixados em solução Bouin (mistura de 71% ácido pícrico, 24 % e formol puro e 5% volumes de ácido acético glacial) por 24 horas e depois desidratados em série crescentes de álcool (70%-30min, 80%-30min, 90%-30min, 95%30min, 100%-30min e 100%-30min) (HOPWOOD, 1990), posteriormente incluídos em parafina e seccionados a 5,0 µm em micrótomo. A coloração dos cortes foi realizada por meio de corantes específicos, onde utilizou-se a reação de PAS (Periodic acid-Schiff) para analisar os carboidratos e xilidina para analisar as proteínas. Foram realizados dez cortes histológicos para cada indivíduo. As lâminas histológicas foram observadas em um microscópio de luz com sistema de captura de imagens. Para obter a quantificação das proteínas e dos carboidratos presentes no fígado dos animais, foram analisados a área do tecido hepático através das fotomicrografias dos cortes obtidos no programa de manutenção de imagem GIMP 2, onde os valores das quantidades de proteínas e carboidratos foram expressos em pixels.

2.4. Dados climatológicos

Os dados meteorológicos mensais de temperatura (°C) e pluviosidade (mm) foram adquiridos através do banco de dados do Centro de Agência Executivos de Gestão de Águas do Estado da Paraíba (AESPA), através da estação meteorológica vizinha ao local de amostragem.

2.5. Análises estatísticas

Primeiramente foi verificada a existência de valores discrepantes (outliers), em seguida, a normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk e, quando necessário, submetidos à normalização $(x + 0,5)^{1/2}$ (Tukey e Dunn, respectivamente). A quantificação de proteínas e carboidratos no fígado foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e quando necessário completado pelo Teste de Dunn.

A dependência entre as variáveis climáticas e quantificação de proteínas e carboidratos, foi verificada por meio do teste de Regressão Linear Simples. Sendo necessária a realização dos testes de correlação de Spearman (dados não paramétricos) entre os parâmetros avaliados. Foram considerados $p \leq 0,05$ como referência para se atribuir significância estatística, sendo todas as análises baseadas em Krebs (1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

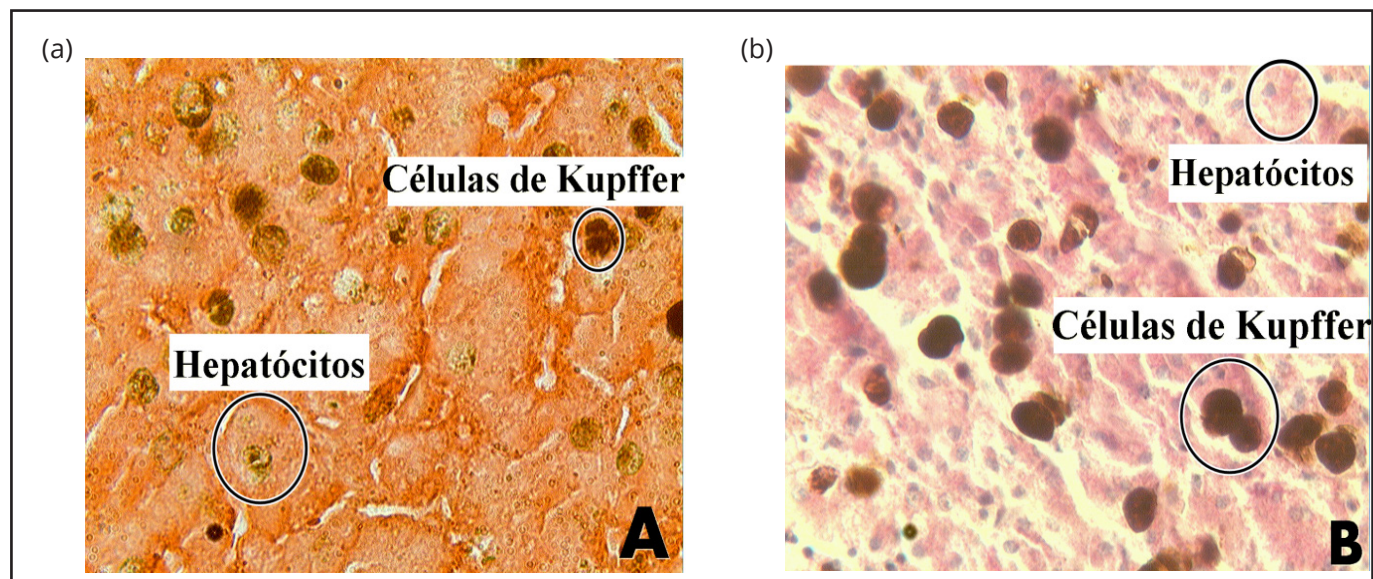
3.1. Quantificação das proteínas e carboidratos

Nas análises histológicas das células hepáticas de *L. macrosternum* observou-se a presença das células de Kupffer também designados macrófagos pigmentados (Figura 2, A e B), que segundo Agius e Roberts (2003) evidenciam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como a melanina, advindas da degradação de material celular fagocitado, sendo assim funcionam como células de defesa e sua deficiência ou morte causam patologias.

Além do mais, os melanomacrófaos hepáticos, denominados células de Kupffer especificamente em anfíbios, são dotados de diversos grânulos citoplasmáticos, que podem indicar a presença de diferentes substâncias químicas e grânulos escuros com propriedades histoquímicas e ultraestruturais semelhantes à melanina (GUIDA *et al.*, 2004). Foram evidenciados também os hepatócitos contendo agrupamento de grânulos pigmentados, cuja função está relacionada à síntese de proteínas, para manutenção própria ou exportação (CORSARO *et al.*, 2000).

Gartner e Hiatt (2003) afirmam que os hepatócitos estão distribuídos em placas, como um "muro", essas placas possuem células denominadas células de Kupffer, contendo uma morfologia estrelada com um núcleo oval atuando como macrófagos, e consideram ainda que estas estruturas hepáticas são as principais células constituintes do fígado. Desta forma, as imagens observadas nesse trabalho corroboram com as descrições dos autores supracitados, demonstrando assim que este padrão é muito conservado dentro dos vertebrados.

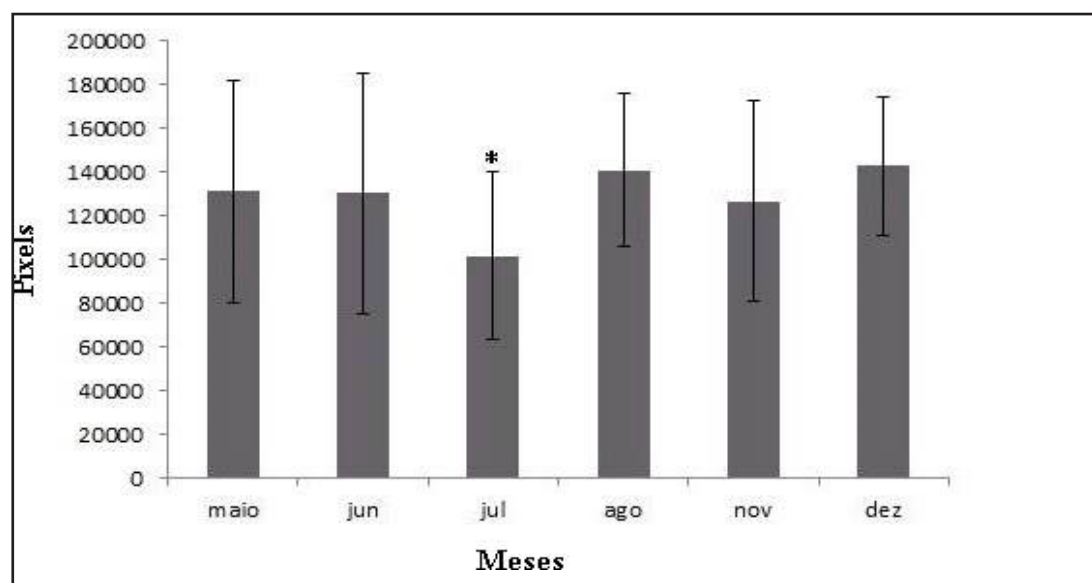
Figura 2 – Visualização de estruturas celulares presentes no fígado de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO,1926)



(a) Visualização de estruturas presentes no fígado (por meio de corante Xilidina para análise histoquímica de proteínas); (b) Visualização de estruturas presentes no fígado (por meio da reação de PAS para análise histoquímica de carboidratos) dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013

Os valores mensais das quantidades de proteínas (Figura 3) apresentaram os menores valores significativos durante o mês de julho ($p = 0,04$, Kruskal - Wallis). Além disso, observou-se que a quantidade de proteínas dadas em pixels, entre os meses de maio, junho, agosto, novembro e dezembro, apresentaram quantidade consideráveis de proteínas, variando entre 120000 e 140000 pixels. Os maiores valores observados para este parâmetro foram nos meses de agosto ($140985, 9 \pm 35395, 4$ pixels) e dezembro ($142731,8 \pm 31865,7248$).

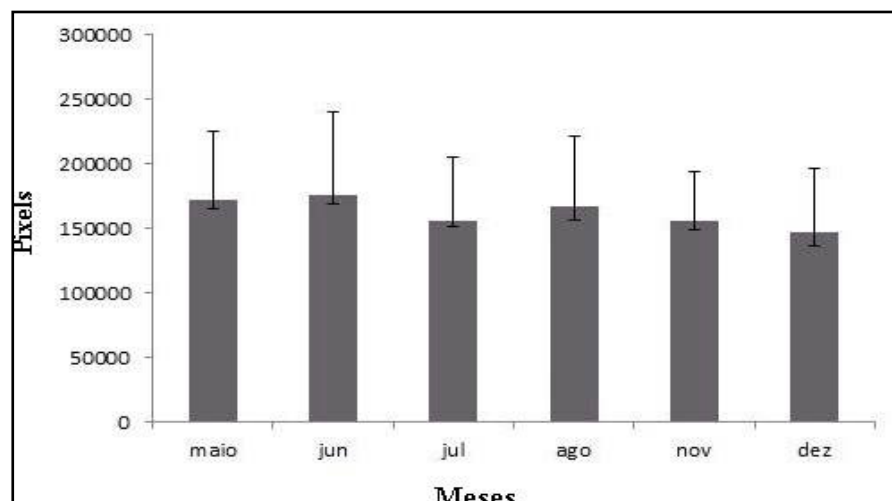
Figura 3 – Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de proteínas depositadas no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013



* indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Kruskal-Wallis- $p < 0,05$

A quantidade de carboidratos depositados nos fígados dos animais não apresentaram diferenças significativas durante os meses amostrados, permanecendo pouco acima de 150000 pixels. Entretanto, o mês de junho apresentou valores relevantes para este parâmetro ($176251,13 \pm 6904,78$) seguido do mês maio ($172161,13 \pm 53484,26$) (Figura 4).

Figura 4 – Valores médios e erro padrão mensais das quantidades de carboidratos depositados no fígado dos indivíduos machos coletados de *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926) na área do HFODB, Cuité- PB, no período de janeiro a dezembro de 2013



De acordo com Dayton e Fitzgerald (2001) a irregularidade de chuvas, a formação e duração dos corpos de água limitam vários aspectos de vida dos anuros como aquisição de recursos, acúmulo de reservas e principalmente, atividade reprodutiva. Nesse sentido, as baixas ocorrências das chuvas bem como a sua imprevisibilidade em ambientes semiáridos podem determinar alguns ajustes fisiológicos nos anuros limitando a ocorrência destes animais em alguns meses do ano o que justifica a ausência de avistamento dos indivíduos de *L. macrosternum* entre os meses de janeiro-abril e setembro-outubro durante as saídas de campo (SANTOS *et al*, 2007; GIARETTA *et al.*, 2008).

Os valores de proteínas e carboidratos acumulados no fígado de *L. macrosternum* também podem ser utilizados como indicador de várias atividades desempenhadas por esses animais como alimentação, forrageio do período reprodutivo, dentre outras. Portanto, pode-se afirmar que estes valores podem estar relacionados com a mobilização das reservas energéticas necessárias para o processo de vitelogenese, reprodução ou inclusive de preparação para um período de baixa disponibilidade alimentar (MADALOZZO *et al.*, 2013).

3.2. Relações de proteínas e carboidratos com a estacionalidade

Foram observadas relações significativas entre a pluviosidade e as quantidades de carboidratos ($r = 0,01$; $p = 0,03$), e entre temperatura e quantidade de carboidratos ($r = 0,02$; $p = 0,04$). Estes fatores podem estar associados a uma maior intensidade na alimentação de *L. macrosternum*, com subsequente acúmulo de gorduras e carboidratos no fígado (CHAVES *et al.*, 2017). A variação do regime de chuvas e temperatura não apresentou nenhuma relação significativa com a quantidade de proteínas depositadas no fígado de *L. macrosternum* (Tabela 2).

Tabela 2 – Referente as relações entre a quantidade de proteínas e carboidratos depositados no fígado de machos da espécie *Leptodactylus macrosternum* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926). em relação à pluviometria e a temperatura na área do Horto Florestal Olho D' Água da Bica, município de Cuité, estado da Paraíba-Brasil, no período entre maio-agosto e novembro-dezembro de 2013

	Pluviometria		Temperatura	
	r	p	r	p
Proteína	0,004	0,24	0,003	0,15
Carboidrato	0,01	0,03*	0,02	0,04*

* = Valores estatisticamente significativos. r = Valor da análise estatística. p = Teste de significância

Além de interferir no acúmulo de carboidratos no fígado de *L. macrosternum*, outros estudos indicaram que, em áreas semiáridas, a pluviometria é a condição física ambiental que mais interfere na atividade reprodutiva dos anuros, seguida pela temperatura, determinando o tempo mais favorável para a reprodução e, conseqüentemente, a distribuição espacial destes animais (SASSO-CERRI *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2017).

4 CONCLUSÃO

As técnicas empregadas neste estudo demonstraram ser relevantes para entender o comportamento fisiológico de anuros em diferentes períodos do ano. *L. macrosternum* demonstrou ser uma espécie sensível as variações sazonais, tendo em vista que foram observadas relações significativas entre os fatores ambientais e as quantidades de carboidratos e proteínas depositados no fígado dos animais analisados.

REFERÊNCIAS

- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Biology*. 2003; 26(9): 499-509.
- AMÉZQUITA, A.; FLECHAS, S.V.; LIMA, A.P.; GASSER, H.; HODL, W. Acoustic interference and recognition space within a complex assemblage of dendrobatid frogs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2003; 108(1): 17058-17063.
- BOQUIMPANI-FREITAS, L.; ROCHA, C.F.D.; VAN SLUYS, M. Ecology of the horned leaf-frog, *Proceratophrys appendiculata* (Leptodactylidae), in an insular atlantic rainforest area of southeastern Brazil. *Journal of Herpetology*. 2002; 36(1): 318-322.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M.T. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic rainforest anurans at Boracéia, southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*. 2003; 23(2): 161-167.
- BIONDA, C.L.; TADA, I.; LAJMANOVICH, R.C.; Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russ. J. Herpetol.* 2011; 18: 93-98.
- BOTH, C.; KAEFER, I.L.; SANTOS, T.G.; ZECHIN, S.T.Z. An austral anuran assemblage in the Neotropics: seasonal occurrence correlated with protoperiod. *Journal Natural History*. 2008; 42(3): 205-222.
- CHAVES, M.F.; TENÓRIO, F.C.; SANTOS, I.L.; LAPA NETO, C.J.C.; TEXEIRA, V.W.; MOURA, G.J.; TEXEIRA, A.A. Correlations of condition factor and gonadosomatic, hepatosomatic and lipo-somatic relations of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae) in the Brazilian Semi-arid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2017; 89(3): 1591-1599.
- CHAVES, M.F.; MOURA, G.J.; TENÓRIO, F.D.C.; BAPTISTA, J.D.S.; LAPA NETO, C.J.; TEXEIRA, V.W.; TEXEIRA, Á.A. Influence of rainfall and temperature on the spermatogenesis of *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae). *Zoologia*. 2017; 34: 1-7.
- CORSARO, C.; SCALIA, M.; LEOTTA, M.; MONDIO, F.; SICHEL, G. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*. 2000; 196: 249-261.
- COSTA, C.F. Projeto horto florestal olho d'água da bica\ UFCG\ CES\ CUITÉ. Cuité, Fev, 2009.
- DAYTON, G.H.; FITZGERALD, L.A. Competition, predation, and the distribution of four desert anurans. *Oecologia*. 2001; 129: 430-435.
- ETEROVICK, P.C.; SAZIMA, I. Anfíbios da Serra do Cipó. Ed. PUC Minas, Belo Horizonte, 2004.
- FROST, D.R. Amphibian Species of the World: An Online Reference, Version 5.4. American Museum of Natural History, New York. 2010. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>

- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de Histologia em Cores. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- GIARETTA, A.A.; MENIN, M.; FACURE, K.G.; KOKUBUM, M.N.C.; OLIVEIRA FIHO, J.C. Species richness, relative abundance, and habitat of reproduction of terrestrial frogs in the Triângulo Mineiro region, Cerrado biome, southeastern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*. 2008; 98(2): 181-188.
- GUIDA, G.; ZANNA, P.; GALLONE, A.; ARGENZIO, E.; CICERO, R. Melanogenic Response of the Kupffer Cells of *Rana esculenta* L. to Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Research*. 2004; 17: 128-134.
- HATANO, F.H.; ROCHA, C.F.D.; VAN SLUYS, M. Environmental factors affecting calling activity of a tropical diurnal frog (*Hylodes phyllodes*: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*. 2002; 36(1): 314-318.
- HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*. 2000; 31: 231-410.
- HOCKEY, P.A.R.; CURTIS, O.E. Use of basic biological information for rapid prediction of the response of species to habitat loss. *Conservation Biology*. 2009; 23(1): 64-71.
- HOPWOOD, D. Fixation e fixativos. In: Bancroft J.D., Stevens A. Theory and practice of histological techniques. New York, Churchill Livingstone, 3 ed., 1990: 21-42.
- KREBS, C.J. Ecological Methodology. Addison Wesley Educational Publishers, Menlo Park, 1999.
- LI, Y.; COHEN, J.M.; ROHR, J.R. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*. 2013; 8: 145-161.
- MADALOZZO, B.; BOTH, C.; CECHIN, S.Z. Temporal distribution and age structure of tadpoles of *Hypsiboas faber* and *H. leptolineatus* in ponds: how do they coexist? *Journal of Natural History*. 2013; 45(39-40): 2575-2581.
- MOORE, F.L.; BOYDB, S.K.; KELLEY, D.B. Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Hormone Behavior*. 2005; 48: 373-383.
- NAVAS, C.A.; ANTONIAZZI, M.M.; CARVALHO, J.E.; Suzuki, H.; Jared, C. Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2007; 147: 647-657.
- OLIVEIRA, M.C.L.M.; SANTOS, M.B.; LOEBMANN, D.; TOZETTI, A.M. Diversity and associations between coastal habitats and anurans in southernmost Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2013; 85(1): 575-582.
- PRADO, C.P.A.; UETANABARO, M.; LOPES, F.S. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus* in the Pantanal, Brazil. *Journal of Herpetology*. 2000; 135-139.
- RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia. Editora Belo Horizonte: Segrac. 2000; p. 89.
- RODRIGUES, M.T. Herpetofauna da Caatinga. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 181-236. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.
- SANTOS, T.G.; ROSSA-FERES, D.C.; CASATTI, L. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*. 2007; 97(1): 37-49.
- SASSO-CERRI, E.; FARIA, F.; FREYMULLER, E.; MIRAGLIA, S.M. Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the Bullfrog *Rana catesbeiana*. *Journal of Experimental Zoology*. 2004; 301A: 249-260.
- STUART, S.N.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; YOUNG, B.E.; RODRIGUES, A.S.L.; FISCHMAN, D.L.; WALLER, R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 2004; 306: 1783-1786.
- SUN, J. W. C.; NARINS, P. M. Anthropogenic sounds differentially affect amphibian call rate. *Biological Conservation*. 2005; 121(1): 419-427.

TEIXEIRA, L.M. Informando o trade turístico paraibano: Cuité. Caderno de Turismo. 2003; p. 9-11.

TOZETTI, A.M.; PONTES, G.M.F.; MARTINS, M.B; OLIVEIRA, R.B. Temperature preferences of *Xenodon dorbigny*: field and experimental observations. *Journal of herpetology*. 2010; 20(1): 277-280.

VAN SLUYS, M.; MARRA, R.V.; BOQUIMPANI-FREITAS, L.; ROCHA, C.F.D. Environmental factors affecting calling behavior of sympatric frog species at na Atlantic Rain Forest Area, southeatern Brazil. *Journal of herpetology*. 2012; 46(1): 41-46.

VIERA, W.L.S.; ARZABE, C.; SANTANA, G.G. Composição e distribuição espaço-temporal de anuros no Cariri Paraibano, nordeste do Brasil. *Oecologia Brasiliensis*. 2007; 11(3): 383- 396.

VITT, L. J.; CALDWELL, J.P. *Herpetology*. Burlington: Elsevier. 2009.

XIMENEZ, S.S.; TOZETTI, A.M. Seasonality in anuran activity and calling season in a Brazilian subtemperate wetland. *Zoological Studies*. 2015; 2015(1): 54-47.