

ESPERMATOGÊNESES EM *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) EM UM FRAGMENTO DE MATA ATLÂNTICA NORDESTINA.

SPERMATOGENESIS IN *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) IN A FRAGMENT OF NORTHEASTERN ATLANTIC FOREST.

Vanessa Alexandre Lourenço^{I*}, Caio Ian Delfino Oliveira^{II}, Marcela Meira Ramos Abrantes^{III},
Márcio Frazão Chaves^{IV}, Stephenson Hallison Formiga Abrantes^V, Artur da Nóbrega Carreiro^{VI}

Resumo. *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) é uma espécie da família *Ranidae*, associada principalmente a florestas tropicais úmidas de terras baixas, sendo amplamente distribuída na Amazônia, mas ocorrendo também de forma disjunta no Nordeste brasileiro, na Mata Atlântica. Os anfíbios, em geral, possuem ciclos reprodutivos que podem ser influenciados por fatores climáticos, como temperatura, umidade e precipitação. O estudo realizado investigou os aspectos histológicos dos testículos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824), com o objetivo de compreender seu ciclo reprodutivo e as respostas dessa espécie às variações ambientais. A espécie analisada apresenta um ciclo gametogênico do tipo contínuo, o que permite a produção de espermatozoides ao longo do ano, sem depender das estações chuvosas ou secas. A pesquisa foi realizada a partir de amostras de testículos de indivíduos coletados entre setembro de 2011 e junho de 2012, em um fragmento da Mata Atlântica, na Mata do Buraquinho, Paraíba. As análises histológicas revelaram que os testículos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) apresentam espermatogênese cística, com as células germinativas organizadas em lóculos, associadas às células de Sertoli. Durante o período de estudo, foram identificados diferentes estágios da espermatogênese, com predominância de espermatogônias em alguns meses e presença de espermátocitos e espermatídides em outros. Esses achados indicam que a espécie mantém uma reprodução contínua, independentemente das variações sazonais de chuvas, o que pode ser explicado pela presença de corpos d'água permanentes na área estudada. O estudo reforça a importância da análise histológica para entender a biologia reprodutiva dos anuros tropicais e sua relevância para as estratégias de conservação de espécies que habitam ambientes impactados pela urbanização. Além disso, esses resultados podem contribuir para a gestão ambiental e para a proteção de espécies que dependem de ecossistemas frágeis.

Palavras-chave: anfíbios; células; histologia; testículos; reprodução.

Abstract. *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) is a species in the family *Ranidae*, primarily associated with lowland tropical rainforests. It is widely distributed in the Amazon but also occurs separately in northeastern Brazil, within the Atlantic Forest. Amphibians, in general, have reproductive cycles that can be influenced by climatic factors such as temperature, humidity, and precipitation. The present study investigated the histological aspects of the testes of *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) with the aim of understanding its reproductive cycle and how the species responds to environmental variations. The analyzed species exhibits a continuous gametogenic cycle, allowing for the production of sperm throughout the year, regardless of rainy or dry seasons. The research was based on testicular samples from individuals collected between September 2011 and June 2012, in a fragment of the Atlantic Forest known as Mata do Buraquinho, located in Paraíba, Brazil. Histological analyses revealed that the testes of *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) exhibit cystic spermatogenesis, with germ cells organized in lobules and associated with Sertoli cells. During the study period, different stages of spermatogenesis were identified, with a predominance of spermatogonia in some months and the presence of spermatocytes and spermatids in others. These findings indicate that the species maintains continuous reproduction regardless of seasonal rainfall variations, which can be explained by the presence of permanent bodies of water in the studied area. The study underscores the importance of histological analysis for understanding the reproductive biology of tropical anurans and its relevance to conservation strategies for species inhabiting areas impacted by urbanization. Furthermore, these results can contribute to environmental management and the protection of species that rely on fragile ecosystems.

Keywords: amphibians; cells; histology; testes; reproduction.

^I*Graduanda em Medicina Veterinária, Faculdade Nova Esperança (FACENE), João Pessoa, Paraíba, Brasil
vanessaalexandre015@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0000-5904-6079>

^{II} Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade Nova Esperança (FACENE), João Pessoa, Paraíba, Brasil
<https://orcid.org/0009-0001-3534-3105>

^{III} Graduação em ciências biológicas UEPB, Tecnóloga em Gestão Ambiental Unicesumar, Doutora em Biociência Animal UFRPE, Professora UNIFIP, Patos, Paraíba, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-6786-0425>

^{IV} Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas UFPB, Doutor em Ciência Animal Tropical UFRPE, Lotado em Unidade Acadêmica de Biologia, Centro de Educação e Saúde UFCG, Cuité, Paraíba, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-0341-2882>

^V Biólogo, Doutor em Ciência Animal UFCG, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Patos, Paraíba, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-5727-8781>

^{VI} Médico Veterinário formado pela UFCG, Mestre e Doutor em Ciência e Saúde pela UFCG na área de Morfofisiologia Animal, Clínico de Animais Silvestres e Exóticos, Lotado na Faculdade Nova Esperança, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-2131-7432>



INTRODUÇÃO

A ordem Anura é a de maior diversidade e representatividade entre os anfíbios, com aproximadamente 7568 espécies distribuídas em praticamente todos os continentes, com exceção das regiões congeladas¹. Suas populações são altamente vulneráveis às variações do ambiente, devido a sua fisiologia metabólica e reprodutiva, com grande diversidade de modos reprodutivos, cada um dependente de condições ambientais ótimas e específicas¹. Cerca de 41% das espécies de anuros estão ameaçadas de extinção, o que reforça a necessidade de estudos sobre esse grupo². São considerados excelentes bioindicadores, pois podem fornecer informações sobre as condições dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Além disso, a pele permeável torna a maioria dos anuros dependente de áreas úmidas, limitando assim a mobilidade e as rotas de dispersão ou migração do grupo, tornando-os ainda mais suscetíveis a mudanças ambientais do que animais com maior mobilidade e autonomia para migrar, dispersar ou mesmo escapar².

A interface entre o meio terrestre e o meio aquático confere aos anfíbios um comportamento reprodutivo peculiar em relação aos demais vertebrados, a necessidade de locais adequados para realização de amplexos, fecundação externa e oviposição, assim como sua fisiologia reprodutiva está sujeita a fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (ciclos hormonais)³. A temperatura e o fotoperíodo são os principais fatores ambientais controladores de ciclos reprodutivos sazonais em anfíbios. Mudanças ambientais nesses fatores podem interferir na espermatogênese e estabelecer ciclos gametogênicos do tipo contínuo, descontínuos ou potencialmente contínuo⁴. 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 gametogênica durante algumas estações no ano, mas espermatogônias primárias nos machos permanecem sensíveis à estimulação gonadotrófica. Espécies que habitam regiões tropicais, normalmente apresentam o tipo contínuo de ciclo reprodutivo⁴. De fato, as características do equilíbrio térmico e hídrico são fundamentais na história evolutiva dos anfíbios, tornando o equilíbrio hídrico e a tolerância térmica indissolúveis⁵.

Entretanto, o período reprodutivo pode ocorrer também na estação seca, quando há disponibilidade de ambientes apropriados como os corpos d'água permanentes⁶. Nessas regiões, os maiores picos de produção de hormônios sexuais coincidem com a preparação fisiológica para o período reprodutivo, onde as maiores taxas de produção de andrógenos determinam o desenvolvimento das características sexuais secundárias, a manutenção do comportamento sexual e o start da gametogênese dos anuros⁶.

O antigo gênero *Rana* (Linnaeus, 1758), antes considerado um único táxon abrangendo todos os membros da família Ranidae, não é mais considerado como constituindo um grupo monofilético⁷. As recomendações atuais dividem a família Ranidae, que compreende 437 espécies, em 27 gêneros, sendo o gênero *Rana* retido para um grupo restrito de 58 espécies da Eurásia e América do Norte. O gênero *Lithobates*, 1843 compreende atualmente 51 espécies da América do Norte, Central e do Sul até o sul do Brasil⁷. *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) é uma espécie da família Ranidae, associada principalmente a florestas tropicais úmidas de terras baixas, sendo amplamente distribuída na Amazônia, mas ocorrendo também de forma disjunta no Nordeste brasileiro, na Mata Atlântica. No entanto, os dados sobre *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) são escassos, particularmente para indivíduos coletados na Mata Atlântica brasileira⁸. Portanto, este trabalho objetivou avaliar possíveis alterações nos aspectos histológicos dos testículos em machos desta espécie em um fragmento de Mata Atlântica nordestina, fornecendo dados adicionais sobre sua biologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem.

Para verificar a atividade reprodutiva dos machos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824), foram analisados os testículos disponibilizados pela Coleção de Herpetologia da Universidade Federal da Paraíba e, por isso, não foi necessária a documentação da CEUA, visto que os animais foram de apreensão. Este material foi composto de vinte testículos oriundos de animais coletados de Setembro a Dezembro de 2011 e Janeiro a Junho de 2012, na Área de Preservação Permanente Mata do Buraquinho ($7^{\circ}08'42''S$ e $34^{\circ}51'54''W$), situada a sudoeste do município de João Pessoa, Estado da Paraíba. Trata-se de um remanescente de Mata Atlântica de 515 hectares inseridos dentro da matriz urbana⁹. De clima quente e úmido a área de estudo apresenta chuvas de outono-inverno, com médias térmicas anuais de aproximadamente $25^{\circ}C$ e os totais pluviométricos variam entre 1500 a 1700 mm. Já a umidade relativa do ar está em torno de 80%. O período de maiores índices pluviométricos compreende os meses de março a agosto. O período seco é considerado curto e varia de 1 a 3 meses⁹.

Colheita de amostras e indivíduos

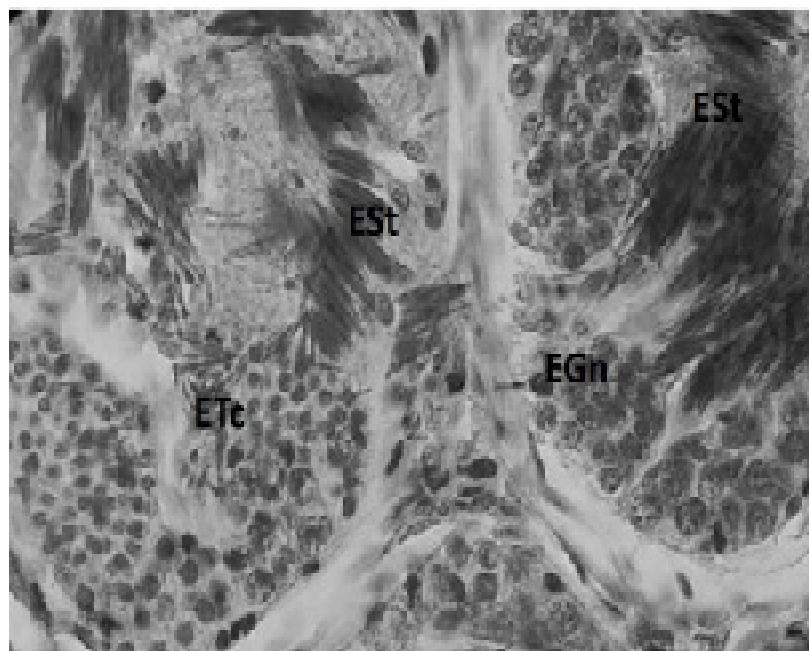
Após a abertura da cavidade celomática dos espécimes, os testículos foram identificados e analisados. Cada testículo avaliado estava previamente fixado em formol tamponado na concentração de 10% para processamento histológico usual. Estes foram então desidratados em série crescente de álcool. A inclusão foi procedida com parafina e secções transversais de 5µm para obtenção dos cortes que posteriormente foram corados com Hematoxilina e Eosina- H/E para a confecção de lâminas histológicas de microscopia de luz. Foram avaliadas as células reprodutivas quanto a sua morfologia, disposição e proporção numérica, identificando os períodos reprodutivos e correlacionando aos diversos fatores ambientais como precipitação, temperatura e umidade. As células germinativas foram identificadas e organizadas em cinco estádios espermatogênicos, considerando o estádio em que se encontravam dentro do túbulo seminífero. Estádio 1 – Epitélio seminífero contendo apenas espermatogônias e túbulo seminífero sem Lúmen definido; Estádio 2 – espermatócitos primários e secundários na margem do Lúmen; Estádio 3 – espermátides em diferentes estágios de diferenciação. Os dados referentes aos índices pluviométricos, umidade relativa do ar e temperatura média foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os machos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) atingem cerca de 7 a 8 centímetros de comprimento rostro-cloacal. Os testículos estão localizados na cavidade celomática próxima aos rins e ligados à parede dorsal do abdômen pelo mesórquio. São descritos como órgãos pares, arredondados, compactos, de cor ligeiramente amarelada, esbranquiçada ou branco-leitosa. Variações anatômicas podem ser observadas durante o período reprodutivo.

Através das análises dos cortes histológicos foi possível observar que as unidades estruturais dos testículos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824), chamados Lóculos seminíferos, abrigam em seu interior as células da linhagem germinativa e as células de Sertoli. As células germinativas, por sua vez, estão agrupadas em cistos caracterizados por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli. Os cistos apresentam-se em diversos estádios de diferenciação celular, caracterizando uma espermatogênese cística (Figura 1).

FIGURA 1 - Túbulos seminíferos de *Lithobates palmipes* corados em HE em fase reprodutiva. EGn: Espermatogônias; ETc: Espermatócitos; EST: Espermátides



Em todas as lâminas analisadas, os túbulos seminíferos apresentaram-se bem definidos e os estágios celulares bem demarcados (Figura 1), sendo facilmente identificados três tipos celulares nos testículos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824), as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides alongadas, com cada lóculo apresentando vários cistos de células espermatogênicas (Figura 1).

As espermatogônias foram caracterizadas como células que apresentavam o maior tamanho no interior dos lóculos, com o citoplasma bem evidente, localizadas na periferia locular, com forma ovoide e cromatina granular (Figura 1). São envolvidas por tecido conjuntivo chamadas de células foliculares ou células de Sertoli produzindo diversas cópias celulares dentro destes cistos passando por diversos processos de maturação celular. Os espermatócitos primários, originados nas últimas divisões mitóticas, apresentaram uma forma semelhante às espermatogônias, entretanto, de tamanho reduzido devido à diminuição do volume citoplasmático e com formato ligeiramente fusiforme em associação com as células de Sertoli. Sua cromatina se apresenta inicialmente difusa variando durante a prófase da primeira divisão meiótica.

As espermátides, decorrentes da segunda divisão meiótica, possuem um citoplasma escasso e são caracterizadas pelo formato alongado do núcleo (Figura 1). Estas células se agrupam em feixes compactos, orientadas na mesma direção à medida que amadurecem, desfazendo o arranjo cístico.

Dos vinte testículos analisados, sete pertenciam a indivíduos juvenis e treze eram de indivíduos adultos. Os juvenis foram capturados durante o período de chuva (Janeiro, Fevereiro e Março). Os testículos destes indivíduos exibiram o primeiro estágio espermatogenético, apresentando unicamente espermatogônias (Tabela 1).

Título: Sazonalidade germinativa em testículo de *Lithobates palmipes*

	Set 2011	Nov 2011	Dez 2011	Jan 2012	Fev 2012	Mar 2012	Abr 2012	Mai 2012	Jun 2012
Espermatogônia	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Espermatócyto	x	x	x				x	x	x
Espermátide	x	x	x				x	x	x

TABELA 1 – Tipos celulares encontrados nos testículos de *Lithobates palmipes*.

O grau de desenvolvimento das células germinativas dentro dos lóculos variou ao longo do período analisado. Cistos de espermatogônias foram encontrados ao longo de todo o período analisado (Tabela 1). Já os cistos de espermatócitos e espermátides alongadas foram encontrados em seis dos nove meses analisados e em treze das vinte lâminas analisadas. Não foram observados espermatozoides nas lâminas analisadas possivelmente pela ausência de material da cauda do epidídimo, região onde ocorre o processo de maturação dos espermatozoides. *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) apresentou feixes de espermátides alongadas entre Setembro e Dezembro de 2011 (período seco), sendo intercalado por três períodos nos quais foram encontrados apenas cistos de espermatogônias nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2012 (Tabela 1) e voltando a apresentar espermátides alongadas nos meses de Abril, Maio e Junho de 2012 (período chuvoso) (Tabela 1; Gráfico 1).

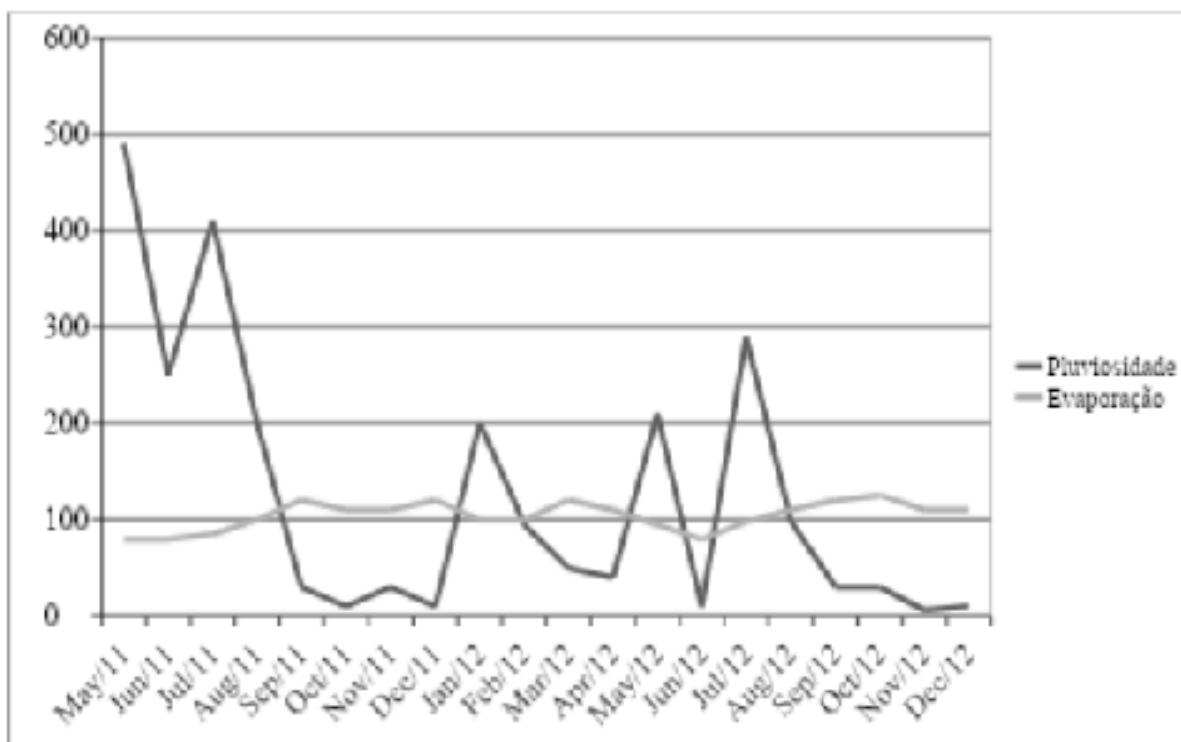


GRÁFICO 1 – Estadios espermatogenéticos encontrados em *Lithobates palmipes* e sua associação com as taxas de Pluviosidade e Evaporação da estudada (Dados abióticos obtidos pelo INMet).

O parênquima testicular é constituído por cordões seminíferos, formados por células de Sertoli e gonócitos, envolvidos por uma camada de musculatura lisa, as células mióides. A produção do gameta masculino envolve os processos de divisão celular e diferenciação, pelos quais os espermatozoides são produzidos nos testículos e esse processo é denominado de espermatogênese¹⁰. Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos. Esses túbulos contêm uma série complexa de células germinativas em desenvolvimento que posteriormente formam células altamente especializadas, os gametas masculinos¹⁰.

As espermatogônias, derivadas das células germinativas primordiais, através de modificações celulares formam os espermatócitos primários que, por uma divisão meiótica reducional, formam os espermatócitos secundários. Na etapa seguinte, eles passam por uma meiose equacional dando origem às espermátides, as quais passam pelo processo da espermiogênese, no qual sofrem várias modificações e formam os espermatozoides¹⁰. Os espermatócitos primários originados na última divisão mitótica são células menores que seu antecessor, possuem um núcleo esférico, basófilo¹¹. A organização germinativa é cística, como descrito para anuros, e cada cisto contém células germinativas no mesmo estágio¹². Os cistos de espermatócitos primários são os mais frequentes, assim como as espermatogônias que podem ser encontradas isoladas ao longo dos túbulos ou formando agrupamentos

espermatogoniais na periferia dos testículos¹¹. Em algumas espécies, apenas a porção apical das células de Sertoli está envolvida no processo de espermatogênese, enquanto a porção basal, contendo o núcleo é mantida para a próxima geração de cistos¹³.

Espermátides alongadas e espermatozoides iniciais estão dispostos em feixes paralelos com os núcleos incorporados nas partes apicais vacuolizadas das células de Sertoli e os flagelos direcionados para o lúmen de um túbulo seminífero. Nesse estágio do desenvolvimento, cistos se abriram devido a uma ruptura das células de Sertoli e finalmente formam espermatozoides com um flagelo¹⁴.

Os fatores ambientais e comportamentais que afetam os anuros também podem influenciar o processo espermatogênico, tanto em termos da variação de certos tipos celulares ao longo do ano quanto em termos da variação da organização germinativa nos testículos observada entre as espécies¹². Com base nessa descrição e no fato de que foram encontrados no interior dos túbulos seminíferos dos adultos da população de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) estudada, cistos de espermátides alongadas, em fase final de maturação, tanto no período seco (janeiro, fevereiro e março) quanto nos meses considerados chuvosos (abril, maio e junho) consideramos que *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) nessa região apresenta ciclo gametogênico do tipo contínuo; reproduzindo-se o ano todo, como também encontrado para outras espécies de anuros de regiões tropicais. Nestas espécies com ciclo gametogênico do tipo contínuo, os espermatozoides geralmente são produzidos ao longo do ano e os testículos sempre contêm ninhos de células espermatogênicas¹⁵.

Além de fatores ambientais naturais, como temperatura e umidade, atividades antrópicas em ambientes reprodutivos ou em seu entorno podem ter efeitos diversificados no desenvolvimento desses animais¹⁶. Entretanto, a reprodução da população estudada parece ocorrer independentemente do regime de chuvas da área. Isto é possível devido, em parte, pela menor heterogeneidade de habitats e a constante disponibilidade de corpos d'água permanentes e de ambientes aquáticos temporários ao longo do ano na área estudada. Embora esse regime de chuvas estabeleça um período de seca curto para a área estudada, estes fatores podem favorecer a manutenção da atividade reprodutiva da espécie mesmo no período mais seco. Além disso, o período estabelecido como seco foi precedido de índices pluviométricos acima da média, o que promoveu o crescimento da vegetação e, consequentemente, um favorecimento no desenvolvimento de sítio reprodutivo na área que foram mantidos durante o período seco. No entanto, há informações limitadas sobre o ambiente urbano e os efeitos da urbanização na população local de anuros. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar esses efeitos e estabelecer conclusões¹².

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos aspectos histológicos dos testículos de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) revela a complexidade da reprodução dos anuros em resposta às variáveis ambientais. Esse estudo reforça a importância da análise histológica sobre a biologia reprodutiva de anuros tropicais, especialmente em áreas de matas urbanas fragmentadas, onde fatores ambientais podem influenciar significativamente os padrões reprodutivos. Compreender como a espécie de *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) se adapta a tais condições é essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação, garantindo a manutenção das populações em ambientes cada vez mais impactados pelas atividades humanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Braga RR, Castro DP, Lima DC, Oliveira CR, Ávila RW. Achados patológicos e incidentais em anuros do Ceará, nordeste brasileiro. Rev. Cienc. anim. bras. 2024;25(1) p. 2-18.
<https://www.scielo.br/j/cab/a/FCn6kfQd3HWxjsmjMXwH7gq/?format=pdf&lang=pt>
2. Ferreira-Silva SK, Alexandre RJR, Penac SA, Lucenab MDL, Vieirade TB, Gomesum FBR. Associations between morphological attributes and food resources in anurans from the Middle Xingu region, Brazil. Rev. Braz. J. Biol. 2025;85(1) p. 1-13
<https://www.scielo.br/j/bjb/a/P3TzjcCTbf97FKM6b3PjPjz/?format=pdf&lang=en>

3. Ryan MJ. Amphibians: biology of amphibians. Rev. Scien. 1986;232(4747):271
4. Santos LRS, Oliveira C. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). Rev. Bras Zool. 2007;24(1) p.70-64. <https://www.scielo.br/j/rbzool/a/j8PzkhxfbmJPKs-ph7HmFhzR/?format=pdf&lang=pt>.
5. Bovo RP, Simon MN, Provete DB, Lyra M, Navas CA, Andrade DV. Beyond Janzen's Hypothesis: How Amphibians That Climb Tropical Mountains Respond to Climate Variation. Rev. Integr Org Biol. 2023;5(1) p. 2-19
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10155226/pdf/obad009.pdf>
6. Chaves MF. Caracterização histologia e biologia reprodutiva de *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae), nordeste do Brasil. Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2016 Dez; p. 74-111. <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/7307>
7. Mechkarska M, Barran G, Kolodziejek J, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, et al. Peptidomic analysis of the host-defense peptides in skin secretions of the Amazon River frog *Lithobates palmipes* (Ranidae). Rev. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics. 2023;46(1) p. 1-7.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744117X2300014X?via%3Dihub>
8. Barbosa GG, de Santana JC, Silva TL, Santana BCG, Paiva PMG, de Freitas GG, et al. A new temporin with antibacterial activity and cytotoxicity from the skin secretion of *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) (Amphibia: Ranidae) from Brazilian Atlantic Forest. Rev. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Bio. 2024;275(1) p. 1-6.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495924001088?via%3Dihub>
9. Lima PJ, Heckendorff WD. Atlas geográfico do Estado da Paraíba. João Pessoa: Grafset; 1985.
10. Alcântara LM, Toniolli R. A Espermatozône. Rev. Cienc. Anim. 2023;33(4) p. 101-121.
11. Chagas JMA, Ninhaus-silveira A, Veríssimo-silveira R. Ciclo Testicular de Devario aequipinnatus (Teleostei, Cyprinidae): Um Potencial Modelo Biológico Em Experimentação Animal. Rev. Bol. Inst. Pesca. 2016;42(4) p.766-780.
<http://hdl.handle.net/11449/173975>
12. Bordin RO, Fernandes CES, Franco-Belussi L, Leão TRF, Sanabria M. Sperm morphology and testicular histology of the polyandric species *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from an urban environment. Rev. Anat Rec. 2021;305(12) p. 1-11.
<https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.24928>
13. Pudney J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Rev. Microsc Res Tech. 1995;32(6) p. 459-97.
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jemt.1070320602>
14. Haczkiewicz K, Rozenblut-Kościsty B, Ogielska M. Prespermatogenesis and early spermatogenesis in frogs. Rev. Zoology. 2017;122 p. 1-17
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944200616301258?via%3Dihub>

15. Duellman WE, Trueb L. *Biology of Amphibia*. New York: McGraw-Hill Book Company; 1994.
16. Borges RE, Santos LRS, Assis RA, Benvindo-Souza M, Franco-Belussi L, & Oliveira C. Monitoramento da integridade morfológica de anuros neotropicais. *Ciências Ambiental e Pesquisa em Poluição*, 2019;26 p. 23–34.