



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso

**Estimativa de Idade e taxa de crescimento de
Melanophryniscus admirabilis (Anura: Bufonidae) por
meio da osteocronologia**

Juliane Heyde dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Márcio Borges Martins

Porto Alegre, novembro de 2016.

Estimativa de Idade e taxa de crescimento de *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae) por meio da osteocronologia.

Orientador: Dr. Márcio Borges Martins

Coorientadora: Dra Júlia Giora

Banca Examinadora:

MSc. Adriana Moriguchi Jeckel

MSc. Ana Júlia Lenz

Porto Alegre, novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha família, por ser o meu suporte, proporcionando todas as condições para que eu chagasse até aqui. Obrigada por todo apoio e incentivo aos estudos e por me mostrarem que eu poderia escolher a profissão que me fizesse feliz. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao Prof. Márcio, pela orientação deste trabalho e pela confiança em mim depositada. Certamente isso influenciou positivamente na minha formação. Obrigada, principalmente, pelas aulas motivantes, as quais me fizeram querer trabalhar nesta área.

À Júlia, pela coorientação deste trabalho, pelas discussões e por me apresentar o mundo da histologia.

À Mimi e à Thay, por terem sido as responsáveis pela minha iniciação na herpetologia.

Por todo aprendizado, amizade e risadas em campo. Vocês me mostraram o quão maravilhoso é trabalhar em equipe. Mimi, obrigada por toda dedicação e preocupação no decorrer do trabalho, pelas discussões, correções e ajuda nas análises. Vocês duas são exemplos de profissionais, obrigada por tudo.

À Dezi, minha amiga inseparável, colega de trabalho e graduação, não tenho nem palavras para te agradecer por toda amizade, apoio e companheirismo ao longo de toda graduação. Sem o teu ombro amigo nos momentos mais difíceis, nada seria o mesmo.

Obrigada pelas revisões e pela dedicação a este trabalho.

Ao Vi, meu companheiro de vida, pelo carinho e compreensão em todos os momentos (até nos desesperadores últimos dias de escrita). Obrigada por toda ajuda na revisão, edição das imagens e discussões. Sem tua ajuda esse trabalho não seria o mesmo.

À Bibs, pela força em diversos momentos deste trabalho e também fora dele. E também por ter se tornado minha “miga plena” haha. Foi muito importante a tua presença nesses momentos.

A todos amigos da graduação, em especial a Carol, Rafa, Marcelinho e Nano pela amizade e parceria durante todos esses anos.

Ao Di, pelo café de cada dia, pelas discussões, por sempre estar pronto para me ajudar no Corel e pela ajuda nos gráficos.

À Prof^ª. Laura, pelo exemplo de profissional e por sempre estar pronta para ajudar a todos.

A todos os demais colegas do laboratório de Herpetologia. Vocês fizeram os dias de trabalho muito mais leves.

Ao laboratório de Ictiologia, que sempre esteve de portas abertas para a realização deste estudo.

E por último, mas não menos importante, à Adriana e à Ana Júlia por aceitarem a missão de ser minha banca e contribuir para este trabalho.

Manuscrito formatado segundo as regras editoriais

do periódico Austral Ecology

(ISSN 1442-9985, IF JCR 2015=1,598)

As tabelas e figuras seguem no final do texto.

Estimativa de idade e taxa de crescimento de *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae) por meio da osteocronologia.

JULIANE HEYDE,¹ MICHELLE ABADIE,² JÚLIA GIORA^{1,3} & MÁRCIO BORGES-MARTINS^{1,3}

¹ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500. CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: julianeheyde@gmail.com, borges.martins@ufrgs.br

² Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Resumo: Informações sobre idade, longevidade e crescimento de espécies ameaçadas são valiosas para o conhecimento da história de vida e planejamento de ações voltadas para sua conservação. A aplicação da osteocronologia permite acessar essas informações de forma rápida, por meio da observação de marcas anualmente depositadas nos ossos, devido à sazonalidade do crescimento. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estimar estes parâmetros para *Melanophryniscus admirabilis*, espécie microendêmica e Criticamente Ameaçada de Extinção. Para acessar as idade e crescimento, foram analisados 46 indivíduos (42 previamente coletados e 4 coletados para este estudo) da única população conhecida para a espécie, no extremo sul da Mata Atlântica, estado do Rio Grande do Sul. Foram analisados indivíduos de recém-metamorfoseados à adultos com tamanhos variando de 3,64 a 40,97 mm (Comprimento rostro-cloacal, CRC). As idades dos espécimes jovens e adultos foram estimadas entre 0 e 7 anos. A idade dos jovens variou de 0 a 2 anos ($0,5 \pm 0,76$; $n = 8$), a dos machos de 2 a 6 anos ($3,95 \pm 0,95$; $n = 22$) e a das fêmeas de 4 a 7 anos ($5,4 \pm 0,84$; $n = 10$). A longevidade encontrada foi de 7 anos para as fêmeas e 6 anos para os machos. O CRC demonstrou ter uma forte relação com o perímetro externo do fêmur ($r^2 = 0,968$). As taxas de crescimento idades-específica foram estimadas pelo cálculo retroativo dos CRCs a partir dos perímetros de deposição das LAGs (*Lines of Arrested Growth*). A taxa de crescimento relativo, durante o primeiro ano de vida, foi muito expressiva, representando um aumento no tamanho corporal de quase 200%, decaindo nos anos subsequentes, até atingir 4% no último ano. Além disso, sugerimos que o padrão sazonal de deposição das LAGs, para esta espécie, é sincronizado com o seu período reprodutivo. Sendo assim, este estudo contribui para o conhecimento da história de vida de *M. admirabilis*, a ser considerado na proposição de ações para sua conservação, servindo também de exemplo para a aplicação da osteocronologia em outras espécies Neotropicais.

Palavras-chave: estrutura etária, longevidade, crescimento, sazonalidade, conservação.

INTRODUÇÃO

Estudos que avaliam parâmetros demográficos como idade, longevidade e taxa de crescimento, são fundamentais para a compreensão da história de vida e da dinâmica populacional, podendo contribuir para o monitoramento de espécies ameaçadas e para a elaboração de estratégias de conservação que se adequem à realidade destas (Guarino & Erismis 2008; Yetman *et al.* 2012, Abadie 2015). A análise de marcas de crescimento depositadas em tecidos rígidos e associadas a eventos cíclicos no tempo permite estimar a idade dos indivíduos (Castanet & Smirina 1990), sendo a principal alternativa às técnicas de observação direta da idade como a marcação e recaptura. Esta, apesar de ser confiável, demanda um longo período de coleta de dados, pois sua precisão depende do acompanhamento dos indivíduos desde os estágios iniciais de vida (Halliday & Verrell 1988).

A osteocronologia tem sido utilizada como forma de acessar a idade e avaliar o crescimento em peixes (Pawson 1990), répteis (Snover *et al.* 2007; Lenz *et al.* 2016; Zug & Rand 1987), anfíbios (Sinsch 2015) e mamíferos atuais (Castanet *et al.* 2004), bem como em registro fóssil (Horner *et al.* 1999). Este é o único método, além da marcação e recaptura, considerado confiável para a determinação da idade em anfíbios e répteis (Halliday & Verrell 1988) tornando-se um procedimento padrão para estimar idades dos anfíbios (Castanet 2002). O método baseia-se na contagem de marcas de crescimento radial nos ossos longos, formadas pela aposição concêntrica de tecido ósseo, de modo que a camada mais externa é a última a ser depositada. Os ciclos de aposição são sincronizados com ciclos sazonais abióticos e refletem os períodos de atividade metabólica dos organismos, de forma que camadas densas de osteócitos depositam-se nos períodos de baixo metabolismo, formando Linhas de Suspensão do Crescimento (em inglês: LAGs- Lines of Arrested Growth) que são intercaladas por períodos de atividade metabólica intensa, quando há rápida deposição de matriz óssea (Smirina *et al.* 1994; Rozenblut & Ogielska 2005). A periodicidade anual da deposição em anfíbios foi verificada tanto por meio de marcação e recaptura, quanto experimentalmente, como revisado por Sinsch (2015), sendo que a maioria dos estudos confirmam a deposição de uma LAG por ano. A análise das LAGs em falanges, como alternativa ao uso de ossos longos, tem sido utilizada como meio de acesso as mesmas informações, sem a necessidade de morte dos indivíduos (Smirina 1972).

O gênero *Melanophryniscus* (Gallardo 1961) compreende 29 espécies de sapinhos-de-barriga-vermelha (Frost 2015) restritas à América do Sul, sendo que uma grande porcentagem delas encontra-se sob algum grau de ameaça ou apresenta distribuição geográfica restrita (Zank *et al.* 2014). Apesar disso, somente existem dados de estrutura etária para a espécie *Melanophryniscus moreirae* (Jeckel *et al.* 2015). *Melanophryniscus admirabilis* (Di-Bernardo, Maneyro & Grillo, 2006) é uma espécie de distribuição altamente restrita, endêmica de apenas uma localidade no extremo sul da Mata Atlântica, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A espécie foi avaliada como Criticamente Em Perigo (CR) (Decreto Estadual Nº 51.797 de 8 de Setembro de 2014; ICMBio, 2014; IUCN SSC Amphibian Specialist Group 2013) devido a sua distribuição restrita aliada a uma série de fatores que vêm ameaçando a sua sobrevivência, como a supressão da vegetação nativa por meio da monocultura de fumo, soja e eucalipto, o potencial para biopirataria e o forte indício de escoamento dos resíduos de agrotóxicos utilizados na plantação do fumo nas margens do rio Forqueta, onde a espécie se reproduz (Abadie 2015). Além disso, sua área de ocorrência é extremamente vulnerável por ter um grande potencial hidrelétrico e turístico (Fonte *et al.* 2014). Por isso, essa espécie consta como uma das prioridades para a conservação da herpetofauna no sul do Brasil (Brasil, 2012. Portaria nº 25, de 17 de fevereiro de 2012).

Além de esclarecer aspectos da história de vida de uma espécie, informações como a idade, a longevidade e o crescimento dos indivíduos podem ser ferramentas muito úteis para a avaliação da qualidade dos habitats e das ameaças ambientais a que estão sujeitos (Sinsch *et al.* 2007). A contaminação do rio pelo escoamento dos agrotóxicos é uma importante ameaça a *Melanophryniscus admirabilis*, visto que o tegumento dos anfíbios é extremamente sensível à exposição de químicos, já que a sua respiração se dá por essa via e seu desenvolvimento é associado a corpos d'água. Conhecer a longevidade dos organismos e, portanto, por quanto tempo ele pode estar exposto a esta e outras ameaças ambientais, auxilia no planejamento de ações de conservação mais efetivas, voltadas às particularidades da espécie. A longevidade também é um importante parâmetro para a compreensão das ameaças impostas por efeitos estocásticos ambientais em populações restritas (Smith 2006). Tendo em vista a importância e urgência em se obter informações a respeito da ecologia e história natural de *M. admirabilis*, um dos anuros mais ameaçados de extinção no Brasil, o objetivo deste estudo foi estimar por meio da osteocronologia a idade, a estrutura etária e a

longevidade desta espécie, bem como a relação entre crescimento somático e ósseo, visando estimar as taxas de crescimento idade-específicas. Objetivando aperfeiçoar as técnicas de estudo de osteocronologia com espécies ameaçadas, também buscamos averiguar a possibilidade do uso das falanges como alternativa não letal, uma vez que o uso destas foi considerado não adequado ao estudo de *Melanophryniscus moreirae* (Jeckel *et al.* 2015).

MÉTODOS

Amostragem

Considerando o grau de ameaça da única população de *Melanophryniscus admirabilis* conhecida, optamos por minimizar os impactos a esta utilizando uma amostra reduzida e previamente disponível. Um total de 46 indivíduos de *Melanophryniscus admirabilis* coletados no Perau de Janeiro, Município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul (52°18''W, 28°51'S) foram submetidos à análise (22 machos, com CRC variando de 32,72 a 37,75 mm; 10 fêmeas, com CRC variando de 35,29 a 40,97 mm; oito jovens com CRC variando de 8,23 a 26,09 mm e seis recém-metamorfoseados com CRC variando de 3,64 a 5,70 mm). Dentre estes, 42 espécimes já haviam sido coletados para projetos desenvolvidos anteriormente (licença ICMBio/MMA 35295-1) e outros quatro espécimes jovens foram coletados na mesma localidade para a realização deste estudo sob a mesma licença. Todos os exemplares foram tombados na Coleção de Anfíbios e Répteis do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O sexo dos indivíduos foi determinado no momento da coleta, por meio do exame de caracteres secundários externos como a presença de excrescência sexual e a emissão do canto de soltura nos machos. A ausência destes caracteres, bem como a evidência externa da presença de óvulos, foram critérios para determinar os espécimes como fêmeas (Abadie 2015). Já os jovens foram determinados pela ausência desses caracteres, menor tamanho corporal e coloração do padrão vermelho ventral menos conspícua (Abadie, M. *dados não publicados*), quando comparado aos indivíduos adultos. Tendo em vista a dificuldade em examinar as gônadas dos indivíduos, consideramos adultos somente aqueles em que já era claro o desenvolvimento sexual. O

comprimento rostro-cloacal (CRC) foi medido com o auxílio de um paquímetro de precisão 0,02 mm. Para a determinação das idades e das taxas de crescimento, o fêmur esquerdo de cada espécime foi retirado e o seu comprimento foi medido para determinação do comprimento da diáfise (35% do comprimento central do fêmur), correspondendo à faixa confiável para a observação das LAGs (Rozenblut & Ogielska 2005). A segunda falange do quarto dedo desse mesmo membro foi retirada para comparação com os fêmures (adaptado de McCreary *et al.* 2008).

Osteocronologia

Os ossos foram descalcificados em solução de ácido clorídrico (HCl) 4% durante 24 – 120 horas (dependendo do tamanho), desidratados em soluções de crescente graduação alcoólica (de 70 a 95%), e infiltrados e incluídos em resina glicolmetacrilato. Foram obtidas secções transversais da porção mais central da diáfise, com espessura de 3µm, com um micrótomo rotativo e utilizadas duas colorações de rotina, Hematoxilina-Eosina (HE) e Azul de Toluidina, para fins de comparação entre as técnicas. Para a melhor visualização e contagem de LAGs, as secções foram fotografadas com o auxílio de um microscópio com câmera acoplada (Nikon AZ 100m) e do software NIS-Elements AR. Foram selecionadas as secções mais centrais da diáfise dos fêmures e realizadas medições na secção com menor cavidade medular (maior proporção de perióstio em relação ao endóstio) com o auxílio do software Image J 1.47v. Foram mensurados os perímetros da cavidade medular (CM), da linha de reabsorção (LR), das linhas de suspensão do crescimento (LAGs) e o perímetro externo (PE) (Fig. 1.A). A interpretação da morfologia óssea foi feita segundo Guarino *et al.* (2003), Rozenblut and Ogielska (2005) e Jeckel *et al.* (2015). Quando havia reabsorção parcial de alguma LAG ou quando a mais externa se tornava parcialmente indistinguível da LAG mais próxima ou da borda externa, a medida era obtida selecionando-se o segmento visível desta e continuando no segmento do perímetro adjacente (p.ex. se o segmento da primeira LAG acabava nos limites da LR, o perímetro da mesma era utilizado para concluir a circunferência). O perímetro externo não foi considerado como uma LAG.

Estimativa de Idade

A reabsorção do endóstio deve ser considerada para estimar corretamente as idades por meio da osteocronologia, pois pode ocasionar a perda do registro dos primeiros anos de vida dos indivíduos e, conseqüentemente, a subestimativa das idades

(Castanet *et al.* 1993). É necessário, portanto, a análise osteométrica para identificar se houve perda por reabsorção (Hemelaar 1985). A estimativa de reabsorção foi modificada de Guarino *et al.* (2003), comparando-se o perímetro da LR de cada indivíduo adulto com o perímetro médio das cinco menores LAGs observadas nos adultos. Se o perímetro da LR do indivíduo excedia o perímetro médio das menores LAGs acrescido de um desvio padrão (DP), uma LAG (estimada) era acrescentada ao número de LAGs observadas neste indivíduo. A partir desta correção, o mesmo procedimento foi realizado com as LAGs correspondentes ao próximo ano, até o ponto em que as linhas de reabsorção não excedessem mais o perímetro médio mais um DP. Dois indivíduos jovens não apresentaram indícios de reabsorção (ausência de LR e endóstio), indicando que suas LAGs eram representativas do primeiro ano de vida. Como eram apenas dois, não foi possível utilizar o mesmo método para estimar a reabsorção das primeiras LAGs. Sendo assim, optamos por somar uma LAG ao total de LAGs estimadas pelo método descrito acima, em todos indivíduos que apresentaram indícios de reabsorção (presença de LR e endóstio) considerando assim, que essa fora reabsorvida nestes. Para verificar a existência de dimorfismo sexual nas idades, nós ajustamos um modelo linear generalizado da família Poisson, com um nível de significância de 0,05.

Taxa de crescimento

O cálculo da taxa de crescimento foi realizado a partir do retrocálculo dos CRCs de cada indivíduo, por meio do qual, foram inferidos os tamanhos corporais apresentados pelos espécimes no momento da deposição de cada LAG (Leclair Jr. & Castanet 1987; Snover *et al.* 2007). A estimativa do CRC, a partir dos perímetros das LAGs, foi feita com base na equação da regressão linear determinada para esta relação (Equação 1), de forma que para cada perímetro de LAG (n= 99) foi estimado o respectivo CRC.

$$\text{CRC} = (14,966 * P_{\text{LAG}}) - 3,2788$$

Equação 1, onde: CRC= Comprimento rostro-cloacal; P_{LAG} = Perímetro da LAG.

Uma vez estimados os valores de CRC de cada indivíduo, para cada LAG, as taxas de crescimento anual foram calculadas pela diferença entre os CRCs adjacentes (Ex.: $\text{CRC}_{3^{\circ} \text{ ano}} - \text{CRC}_{2^{\circ} \text{ ano}}$). A média dos CRCs (observados) dos recém-

metamorfosados foi utilizada para se obter a taxa de crescimento do primeiro ano de vida ($CRC_{1^o \text{ ano}} - CRC_{RM}$). Para a obtenção de uma taxa de crescimento relativo, corrigida pelo tamanho geral dos indivíduos, comparamos a taxa de crescimento médio bruto com o tamanho médio da menor categoria de idade para cada intervalo (Taxa de Crescimento Relativa = Taxa de Crescimento Médio Δt 1-2 / Tamanho Médio t1 x 100). Para verificar se as taxas de crescimento idade-específica diferiam entre os sexos, realizamos um teste-t, com um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Análise histológica

A partir da comparação entre as técnicas de coloração, o Azul de Toluidina foi o corante estabelecido para a análise dos fêmures e falanges, visto que este permitiu a visualização das LAGs e das linhas de reabsorção de forma muito mais nítida (Fig. 2).

Através do exame dos fêmures, identificamos que os indivíduos recém-metamorfosados (n=6) apresentaram apenas uma fina camada de cartilagem em torno da cavidade medular (Fig. 1.B), já os jovens (n=8), uma camada mais densa de periósteo em torno da cavidade (Fig.1.C). Três indivíduos jovens apresentaram uma linha de suspensão do crescimento (LAG) na região do periósteo, sendo que somente um deles já apresentava a presença de uma linha de reabsorção (LR) delimitando uma fina camada de endósteo. Os dois jovens que apresentavam somente uma LAG e não possuíam evidência de reabsorção, foram considerados com um ano de vida. O outro jovem, por apresentar indícios de reabsorção da primeira LAG, foi considerado com dois anos. Quanto aos indivíduos adultos (n= 32; sendo 10 fêmeas e 22 machos), foi possível distinguir a presença de uma densa camada de periósteo, na qual foi possível observar de uma até quatro LAGs fortemente coradas e uma camada mais delgada de endósteo, mais interna e delimitada externamente pela linha de reabsorção. Todos indivíduos adultos apresentaram algum grau de remodelamento do endósteo, podendo haver algum grau de redeposição óssea, evidenciada pelo padrão de linhas concêntricas nesta região (Fig. 1.D). Também foi possível observar a presença de LAGs duplas em 14,3% dos indivíduos que apresentam LAGs e estas foram consideradas como um ano

de vida. Um esquema geral dos resultados observados para os fêmures, a partir das medições, pode ser observado na Fig. 3.

Em comparação aos fêmures, as falanges apresentaram, em geral, uma cavidade medular menor, o endóstio mais espesso e o perióstio mais compacto, o que dificultou a distinção e a contagem das LAGs devido à proximidade entre essas. Assim, o fêmur foi considerado a estrutura mais adequada para análise das linhas de crescimento. Em alguns indivíduos, no limite entre o endóstio e o perióstio foi possível diferenciar uma fina camada de tecido condróide (Linha de Kastschenko) referida por Rozenblut & Ogielska (2005) (Fig. 4). Este limite, nos fêmures, é dado pela linha de reabsorção. O número de LAGs observada nas falanges foi significativamente correlacionado com o observado nos fêmures ($r = 0,449$; $P = 0,012$; $n = 31$) ainda que fracamente. Do total, 41,94% dos indivíduos apresentou o mesmo número de LAGs no fêmur e nas falanges, sendo que em 38,71% dos indivíduos o número de LAGs foi maior e em apenas 19,35% foi menor nas falanges.

Estimativa de idade

O número de LAGs observadas nos fêmures variou de 0 a 4. Os indivíduos jovens variaram de 0 a 2 anos, os machos de 2 a 6 e as fêmeas de 4 a 7 anos (Tab. 1, Fig. 5). O perímetro das LAGs variou entre as idades (Fig. 6). Os sexos não diferiram significativamente quanto às idades (p -valor = 0,072), apesar da média e da mediana da idade das fêmeas terem sido maiores do que as de machos (Tab. 1).

Retrocálculo do Tamanho e Taxas de Crescimento

O CRC mostrou uma forte correlação com o perímetro externo do fêmur ($r = 0,88$; p -valor < 0,0001; $n = 46$; Fig. 7). Uma equação de regressão linear com alto Coeficiente de Determinação ($r^2 = 0,968$) foi obtida permitindo o retrocálculo do tamanho (CRC) dos indivíduos para cada LAG observada. A estimativa dos CRCs a partir do retrocálculo permitiu a obtenção de 64 intervalos anuais de tamanho.

As taxas de crescimento anuais foram agrupadas por idades e apresentadas como médias \pm DP (Tab. 2). A média geral das taxas de crescimento foi de $7,03 \pm 4,45$ mm por ano, sendo que a maior taxa bruta de crescimento idade-específica se dá entre o segundo e o terceiro ano, e a menor entre o sexto e o sétimo ano. Contudo, a correção da

taxa bruta pelo tamanho corporal médio da categoria idade-específica permite identificar um padrão de decréscimo contínuo das taxas de crescimento. No primeiro ano, a taxa média corresponde a cerca de 200% de acréscimo no tamanho corporal, decaindo rápido para 47,5% no intervalo de 2 a 3 anos. Nos demais intervalos, a taxa decresce, chegando a 4% no último ano de vida. Não foi possível calcular a taxa de crescimento entre o primeiro e segundo ano, pois nenhum indivíduo apresentou as duas primeiras LAGs. Não foram encontradas diferenças significativas entre as taxas de crescimento idade-específica entre machos e fêmeas (Δ 2-3: p-valor = 0,4324; Δ 3-4: p-valor = 0,1566; Δ 4-5: p-valor = 0,8237).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que há deposição cíclica de LAGs nos fêmures e nas falanges de *Melanophryniscus admirabilis* e que a técnica de osteocronologia é uma ferramenta útil para fornecer estimativas de idade para esta espécie, bem como das taxas de crescimento idade-específica, usando dados de retrocálculo do tamanho corporal para inferência do histórico individual de crescimento. A dificuldade em encontrar os indivíduos na natureza fora de eventos reprodutivos é a principal barreira para realização de estudos que avaliem parâmetros demográficos de *M. admirabilis* (Abadie 2015). Mesmo durante estes eventos, quando há um grande número de indivíduos no sítio reprodutivo, a presença dos imaturos (jovens) é rara e a lacuna na amostragem de espécimes na faixa de 1 ano de idade neste estudo é um reflexo desta realidade. A maior parte da amostra aqui analisada representa indivíduos adultos obtidos durante eventos reprodutivos. Entretanto, a opção pela utilização dos espécimes de coleção científica para as análises se deu com o intuito de minimizar o impacto gerado pela coleta excessiva de indivíduos, principalmente por se tratar de uma espécie avaliada como apresentando alto grau de ameaça de extinção. A possibilidade de se trabalhar com espécimes provenientes de coleções científicas, também nos permitiu averiguar a viabilidade de se utilizar falanges para aplicação da técnica de análise histológica visando resultados de osteocronologia em comparação aos resultados observados para fêmures, uma vez que em um estudo anterior afirmaram ocorrer a subestimação de idades através da análise de falanges em comparação a análise de fêmures para a espécie *Melanophryniscus moreirae* (Jeckel *et al.* 2015). No presente

estudo, foi encontrada uma correlação fraca, porém significativa entre o número de LAGs observadas nos fêmures e nas falanges, indicando que a estimativa de idade a partir destas últimas pode ser considerada uma alternativa viável em estudos de osteocronologia. Entretanto, as diferenças observadas indicam um padrão de deposição e reabsorção próprio em falanges. São, portanto, necessárias análises osteométricas específicas para estimar as perdas por reabsorção e as idades, a fim de se validar o uso das falanges para aplicação da técnica aqui discutida nesta espécie.

Tem sido demonstrado para anuros que a maior parte da variação no tamanho de machos e fêmeas pode ser explicada em termos das diferenças na estrutura etária entre os sexos (Monnet & Cherry 2002). Sabe-se que *M. admirabilis* apresenta dimorfismo sexual quanto ao tamanho corporal (Abadie, M. *dados não publicados*) e é esperado, portanto, que essa diferença seja um reflexo da variação de idades existente na população. Contudo, nossos dados indicaram que não há diferença de idade entre os sexos, ainda que as fêmeas apresentem maiores valores de tendência central e o valor de p tenha sido limítrofe. O fato de não termos encontrado uma diferença significativa na análise do dimorfismo deve-se, provavelmente, ao baixo número de indivíduos analisados, principalmente de fêmeas. É importante considerar também que, pelo fato de não conseguirmos distinguir o sexo dos indivíduos jovens, existe a chance de alguns desses serem fêmeas adultas que ainda não apresentam evidências externas de maturidade. Portanto, a falta de significância pode ser um artefato do pequeno tamanho amostral ($n = 10$ fêmeas; $n = 22$ machos), mas em princípio devemos considerar a possibilidade de as diferenças de tamanho não serem um reflexo da estrutura etária.

A sobreposição de idades identificada entre um indivíduo jovem e dois machos adultos de 2 anos corrobora o padrão descrito para *Melanophryniscus moreirae*, para o qual se verificou a sobreposição nas idades de fêmeas jovens e adultas de tamanhos muito distintos (Jeckel *et al.* 2015). Os autores sugerem que a maturidade sexual das fêmeas é determinada, portanto, pelo tamanho e não pela idade. Nas análises aqui realizadas, o indivíduo jovem (sexo indeterminado, pela ausência de caracteres secundários) apresentou tamanho corporal muito menor que os dois machos adultos e também menor que a média estabelecida para adultos machos, indicando que a maturidade sexual de machos em *M. admirabilis*, também pode ser determinada pelo tamanho corporal e não pela idade.

A longevidade encontrada para *M. admirabilis* (6 anos para machos e 7 anos para fêmeas) foi semelhante ao encontrado por Jeckel *et al.* (2015), que estimou a longevidade de *M. moreirae* em 6 anos, para machos e fêmeas. Além disso, está dentro do esperado para esta espécie, visto que dados de marcação e recaptura realizados por meio de fotoidentificação mostram que indivíduos foram recapturados depois de quatro a seis anos da primeira captura, quando já eram adultos (Abadie 2015; Abadie, M. *Dados não publicados*), evidenciando que a vida reprodutiva destes indivíduos pode chegar a seis anos e sua longevidade, conseqüentemente, é ainda maior.

Sabe-se que o crescimento dos anfíbios se dá de forma rápida nos juvenis, desacelera a medida que atingem a maturidade sexual, e tende então a estabilizar, pois os recursos são realocados para reprodução (Halliday & Verrell 1988). A partir das taxas de crescimento encontradas para *M. admirabilis*, podemos inferir que a taxa relativa de crescimento inicial, de recém metamorfoseados ao primeiro ano, é muito alta, decaindo rapidamente até atingir um platô onde a taxa diminui muito lentamente (Tab. 2). Esta baixa taxa de crescimento observada nos últimos anos de vida, acarreta na proximidade de deposição das LAGs nestes anos e esse é outro fator que pode ocasionar a subestimativa da longevidade dos indivíduos mais velhos, pois a distinção das suas LAGs mais periféricas é dificultada (Castanet & Smirina, 1990).

Em uma escala temporal menor, o crescimento pode sofrer variações, ocorrendo de forma mais lenta ou rápida, dependendo da disponibilidade dos alimentos, podendo inclusive cessar durante alguns meses em espécies sujeitas a sazonalidade (Vitt & Caldwell 2013), sendo que a deposição das LAGs segue um ritmo circanual que é sincronizado com ciclos sazonais ambientais (Castanet *et al.* 1993). O que se sabe sobre a biologia e ecologia populacional de *M. admirabilis*, se deve a um longo trabalho de monitoramento da espécie, que se faz necessário diante das inúmeras ameaças à sua sobrevivência (Fonte *et al.* 2014; Abadie 2015). Sabe-se que a estação reprodutiva da espécie ocorre de julho a dezembro, dentro da qual ocorrem eventos de explosão reprodutiva de curta duração (Abadie 2015). Este padrão reprodutivo é semelhante ao descrito para *Melanophryniscus rubriventris* (Vaira 2005), espécie também pertencente ao grupo *M. stelzneri* e proximamente relacionada à *M. admirabilis* (Baldo *et al.* 2014). Acreditamos que o padrão sazonal de deposição das LAGs para esta espécie esteja relacionado à sua sazonalidade reprodutiva, uma vez que é nos períodos reprodutivos que se encontra os indivíduos ativos e alimentando-se. Baseando-se nesta hipótese, o

metabolismo ativo nos períodos de alerta para reprodução, coincidiria com o período de rápida deposição de osteócitos e consequente crescimento. Já os períodos em que não se encontra os indivíduos no seu sítio reprodutivo, nem próximos a este, corresponderiam aos períodos de total ou parcial inatividade, no qual o metabolismo encontra-se reduzido e o crescimento se dá a taxas tão baixas, que os osteócitos depositam-se em uma fina e densa linha de suspensão do crescimento (LAG). A formação de LAGs duplas tem sido atribuída a parada de crescimento duas vezes no mesmo ano (Kumbar & Pancharatna 2001), e a não identificação destas pode superestimar a longevidade de uma espécie (Smirina 1994). Entretanto, não encontramos no estudo aqui desenvolvido problemas em distingui-las das demais, de forma que as mesmas foram contabilizadas como um ano de vida.

A variação encontrada nos perímetros das LAGs, para uma mesma idade em uma população é esperada, já que o tamanho dos adultos vai depender do tamanho atingido por ele antes da maturidade sexual e que estes, geralmente, apresentam uma grande variação (Halliday & Verrell 1988). Esta variação também pode ser um reflexo da diferenciação entre os sexos, a qual não pudemos detectar devido ao baixo número de indivíduos analisados. Não encontramos diferenças significativas entre as taxas de crescimento idade-específica de machos e fêmeas, entretanto, esta análise foi baseada nas taxas encontradas somente a partir de dois anos. Portanto, a obtenção de uma maior amostra de indivíduos jovens é fundamental para compreender melhor o padrão de crescimento nos dois primeiros anos de vida de *M. admirabilis*, onde podemos esperar uma grande variabilidade nas taxas de crescimento.

Este estudo permitiu obter as primeiras estimativas de estrutura etária, longevidade e taxas de crescimento em *Melanophryniscus admirabilis*, uma espécie Criticamente Ameaçada de Extinção, para a qual não era desejável a coleta de uma amostra grande. Nossos dados contribuem para a compreensão da história natural da espécie e devem ser considerados na proposição de ações que vem sendo planejadas para sua conservação. Novas perspectivas de estudo também foram identificadas, sendo a mais promissora a possibilidade de uso das falanges na obtenção das estimativas de idade, ao contrário do observado em outra espécie do gênero. O uso das falanges, se validado, pode viabilizar a obtenção de estimativas de idade não letais e assim permitir o aumento das amostras de maneira menos invasiva nas populações. Visando uma melhor estimativa dos parâmetros etários, recomendamos o direcionamento de novas

coletas para indivíduos jovens e secundariamente para fêmeas adultas e indivíduos de qualquer sexo com mais de 40,00 mm de CRC. Apesar da técnica de osteocronologia ter sido amplamente validada em vários estudos com anfíbios, ainda é muito escassa a sua aplicação em espécies de anfíbios tropicais (Sinsch 2015), especialmente para as ameaçadas, apesar da sua importância para o estabelecimento de estratégias de conservação melhor embasadas em conhecimento adequado da história natural de cada espécie. As dificuldades legais e logísticas de obtenção de amostras em uma espécie ameaçada, microendêmica e de comportamento reprodutivo explosivo, não impediu a obtenção de dados etários muito importantes em *M. admirabilis*. Esperamos que estes resultados incentivem a aplicação da técnica de osteocronologia em outras espécies Neotropicais, especialmente em regiões de clima subtropical e temperado, visando o incremento do conhecimento sobre os parâmetros etários em um conjunto mais amplo taxonomicamente e ambientalmente.

REFERÊNCIAS

- Abadie (2015). Conservação do Sapinho-admirável-de-barriga-vermelha, *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae): Estudo de Ecologia Populacional Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Baldo, D., Candiotti, F. V., Haad, B., Kolenc, F., Borteiro, C., Pereyra, M. O., Zank, C., Colombo, P., Bornschein, M. R., Sisa, F. N., Brusquetti, F., Conte, C. E., Nogueira-Costa, P., Almeida-Santos, P., Pie, M. R. (2014) Comparative morphology of pond, stream and phytotelm-dwelling tadpoles of the South American Redbelly Toads (Anura: Bufonidae: *Melanophryniscus*). *Biol. J. Linn. Soc.* **112**, 417–441.
- Castanet, J. (2002) Amphibiens et reptiles non aviens: un matériel de choix en squelettochronologie. *Bull. la Société herpétologique Fr.*, 21–40.
- Castanet, J., Croci, S., Aujard, F., Perret, M., Cubo, J., Margerie, E. de (2004) Lines of arrested growth in bone and age estimation in a small primate: *Microcebus murinus*. *J. Zool.* **263**, 31–39.
- Castanet, J., Smirina, E. (1990) Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. In: *Annales des sciences naturelles. Zoologie et biologie animale* pp. 191–196 Elsevier.
- Di-Bernardo, M., Maneyro, R., Grillo, H. (2006). New Species of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *J. Herpetol.* **40**, 261–266.
- Gallardo, J. M. (1961) La ubicación sistemática y distribución geográfica de *Brachycephalidae argentinos*. *I Reun.*
- Guarino, F. M., Erismis, U. C. (2008). An endemic frog from Turkey. *Ital. J. Zool.* **75**, 237–242.
- Guarino, F. M., Lunardi, S., Carlomagno, M., Mazzotti, S. (2003) A skeletochronological study of growth, longevity, and age at sexual maturity in a population of *Rana latastei* (Amphibia, Anura). *J. Biosci.* **28**, 775–782.
- Halliday, T. R., Verrell, P. a (1988) Society for the Study of Amphibians and Reptiles Body Size and Age in Amphibians and Reptiles. *J. Herpetol.* **22**, 253–265.
- Hemelaar, A. (1985) An improved method to estimate the number of year rings resorbed in phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its application to populations from different latitudes and altitudes. *Amphibia-Reptilia*. **6**, 323–341.
- Horner, J. R., de Ricqles, A., Padian, K. (1999) Variation in dinosaur skeletochronology indicators: implications for age assessment and physiology. *Paleobiology*. **25**, 295–304.
- Jeckel, A. M., Saporito, R. A., Grant, T. (2015) The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Front. Zool.* doi: 10.1186/s12983-015-0120-2. [online]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12983-015-0120-2>.

- Kumbar, S. M., Pancharatna, K. (2001) Determination of age, longevity and age at reproduction of the frog *Microhyla ornata* by skeletochronology. *J. Biosci.* **26**, 265–270.
- Leclair Jr., R., Castanet, J. (1987) A Skeletochronological Assessment of Age and Growth in the Frog *Rana pipiens Schreber* (Amphibia, Anura) from Southwestern Quebec. *Copeia*. **1987**, 361–369. [online]. Available from: <http://www.jstor.org/stable/1445771>.
- Lenz, A. J., Avens, L., Trigo, C. C. (2016) Skeletochronological estimation of age and growth of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the western South Atlantic Ocean. doi: 10.1111/aec.12347.
- McCreary, B., Pearl, C. a, Adams, M. J. (2008) A Protocol for Aging Anurans Using Skeletochronology. *US Geol. Surv. OpenFile Rep.* **2008**, 1–38. [online]. Available from: <http://pubs.usgs.gov/of/2008/1209/pdf/ofr20081209.pdf>.
- Monnet, J.-M., Cherry, M. I. (2002) Sexual size dimorphism in anurans. *Proc. Biol. Sci.* **269**, 2301–2307.
- Pawson, M. G. (1990) Using otolith weight to age fish. *J. Fish Biol.* **36**, 521–531.
- Rozenblut, B., Ogielska, M. (2005) Development and growth of long bones in European water frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), with remarks on age determination. *J. Morphol.* **265**, 304–317.
- Sinsch, U. (2015) Life-History Traits in Amphibians. *Herpetol. J.* **25**, 5–13.
- Sinsch, U., Leskovar, C., Drobig, A., König, A., Grosse, W.-R. (2007) Life-history traits in green toad (*Bufo viridis*) populations: indicators of habitat quality. *Can. J. Zool.* **85**, 665–673.
- Smirina, E. M. (1972) Annual layers in bones of *Rana temporaria*. *Zool. Zh.* **51**, 1529–1534.
- Smith, J. N. M. (2006) *Conservation and biology of small populations: the song sparrows of Mandarte Island*. Oxford University Press on Demand.
- Snover, M. L., Avens, L., Hohn, A. A. (2007) Back-calculating length from skeletal growth marks in loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Endanger. Species Res.* **3**, 95–104.
- Vaira, M. (2005) Annual variation of breeding patterns of the toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Vellard, 1947). *Amphibia-Reptilia* doi: 10.1163/1568538054253519.
- Vitt, L. J., Caldwell, J. P. (2013) *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles: Fourth Edition*. [online]. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84940272640&partnerID=40&md5=44a4ccf48d605446a769e22c5be58ca2>.
- Yetman, C. A., Mokonoto, P., Ferguson, W. H. (2012) Conservation implications of the

age / size distribution of Giant Bullfrogs (*Pyxicephalus adspersus*) at three pen-urban breeding sites.

Zank, C., Becker, F. G., Abadie, M., Baldo, D., Maneyro, R., Borges-Martins, M. (2014) Climate change and the distribution of neotropical red-bellied toads (*Melanophryniscus*, Anura, Amphibia): How to prioritize species and populations? *PLoS One*. **9**, 1–11.

Zug, G. R., Rand, A. S. (1987) Estimation of age in nesting female *Iguana iguana*: testing skeletochronology in a tropical lizard. *Amphibia-Reptilia*. **8**, 237–249.

Tabelas e Figuras:

Tab. 1. Estrutura etária de *Melanophryniscus admirabilis*.

<i>Sexo</i>	<i>N</i>	<i>CRC médio ± DP (mm)</i>	<i>CRC mín. -máx. (anos)</i>	<i>Idade média ± DP (anos)</i>	<i>Idade mín. - máx.(anos)</i>	<i>Idade mediana (anos)</i>	<i>Longevidade (anos)</i>
<i>Machos</i>	22	35,21 ± 0,79	32,72 - 37,75	3,95 ± 0,95	2 - 6	4	6
<i>Fêmeas</i>	10	38,96 ± 1,73	35,29 - 40,97	5,4 ± 0,84	4 - 7	4,5	7
<i>Jovens</i>	8	16,06 ± 7,40	8,23 - 26,09	0,5 ± 0,76	0 - 2	1,5	-
<i>Recém-metamorfoseados</i>	6	4,35 ± 0,79	3,64 - 5,70	-	-	-	-

CRC= Comprimento rostro-cloacal; *N* = número de indivíduos.

Tab. 2. Taxas de crescimento, calculadas a partir dos CRCs estimados para cada marca anual de crescimento (n=99) presente nos fêmures de *M. admirabilis* (n=46).

<i>Intervalo (anos)</i>	<i>N</i>	<i>Taxa de crescimento CRC (mm/ano)</i>	<i>DP</i>	<i>Min.</i>	<i>Máx.</i>	<i>TC %</i>
Δ 0-1	2	8,48	4,34	5,41	11,55	197.2
Δ 2-3	17	9,56	3,34	4,52	17,06	47.5
Δ 3-4	25	7,89	4,53	0,27	17,23	30.4
Δ 4-5	14	4,1	3,29	0,37	8,96	12.6
Δ 5-6	5	2,85	3,55	0,16	8,28	7.7
Δ 6-7	1	1,57	-	-	-	4.0

CRC= comprimento rostro-cloacal; *N* = número de taxas de crescimento calculados a partir dos CRCs estimados; TC% = Taxa de crescimento percentual.

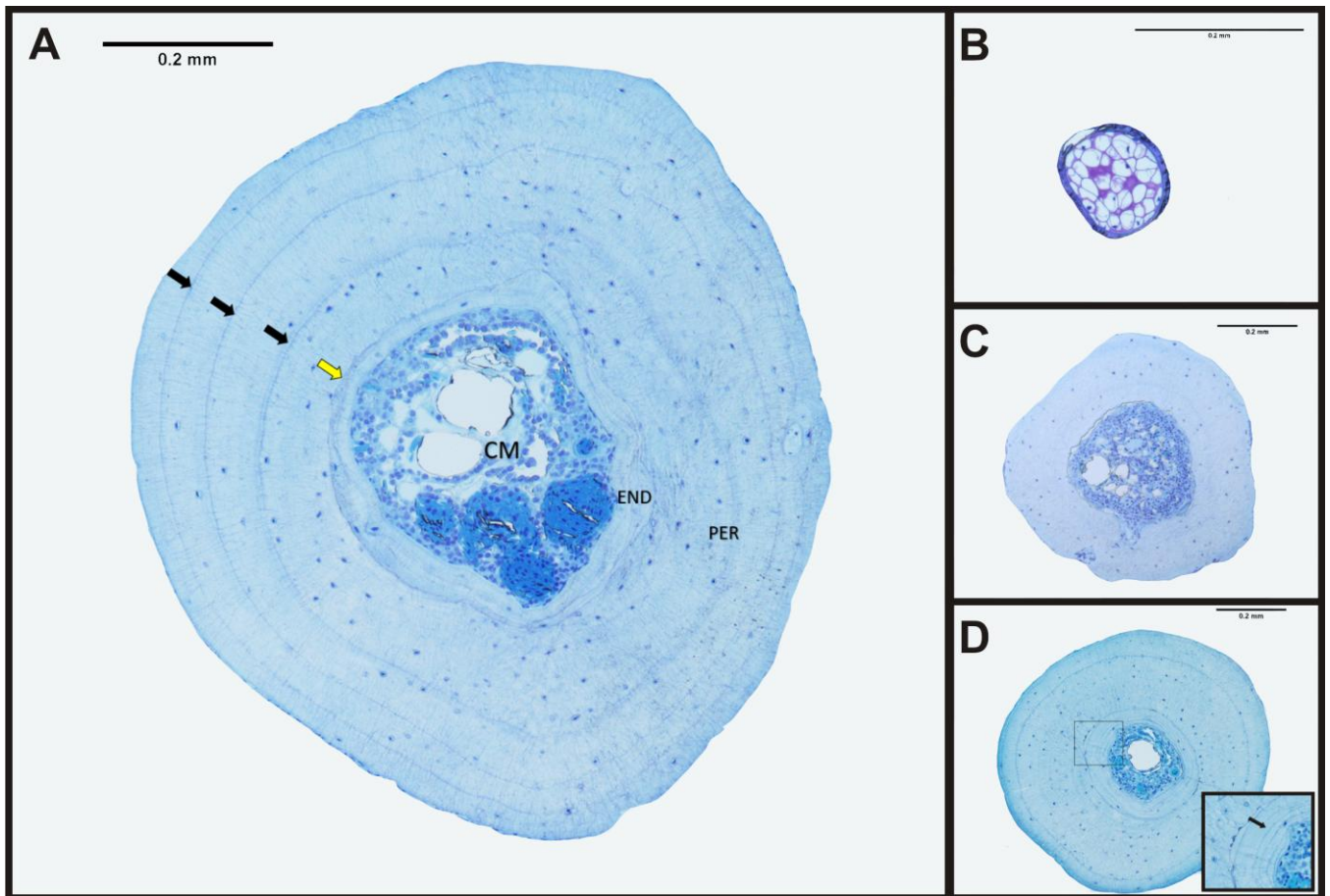


Fig. 1. Secções da porção mediana da diáfise dos fêmures de *M. admirabilis*. **A.** Indivíduo macho com 4 anos de idade. As setas pretas indicam as linhas de suspensão do crescimento (**LAGs**); A seta amarela indica a Linha de Reabsorção (**LR**); **CM**= Cavidade Medular; **END**= Endóstio; **PER**= Perióstio. **B.** Indivíduo Recém-Metamorfoseado (**RM**). **C.** Indivíduo Jovem (**J**). **D.** Indivíduo macho, com 4 anos de idade (destaque para a região do endóstio). A seta indica uma das linhas depositadas nesta região. Em B, C e D não é possível.

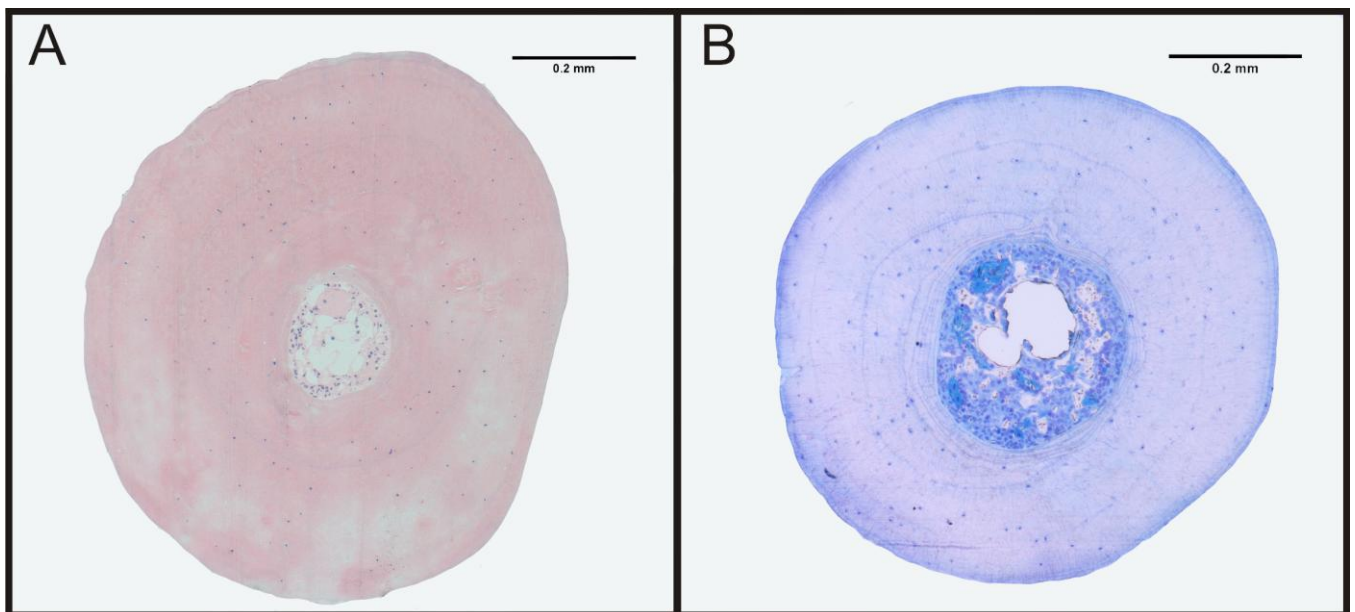


Fig. 2. Comparação entre as técnicas de coloração nas secções das diáfises dos fêmures. **A.** Corada com Hematoxilina-Eosina. **B.** Corada com Azul de Toluidina.

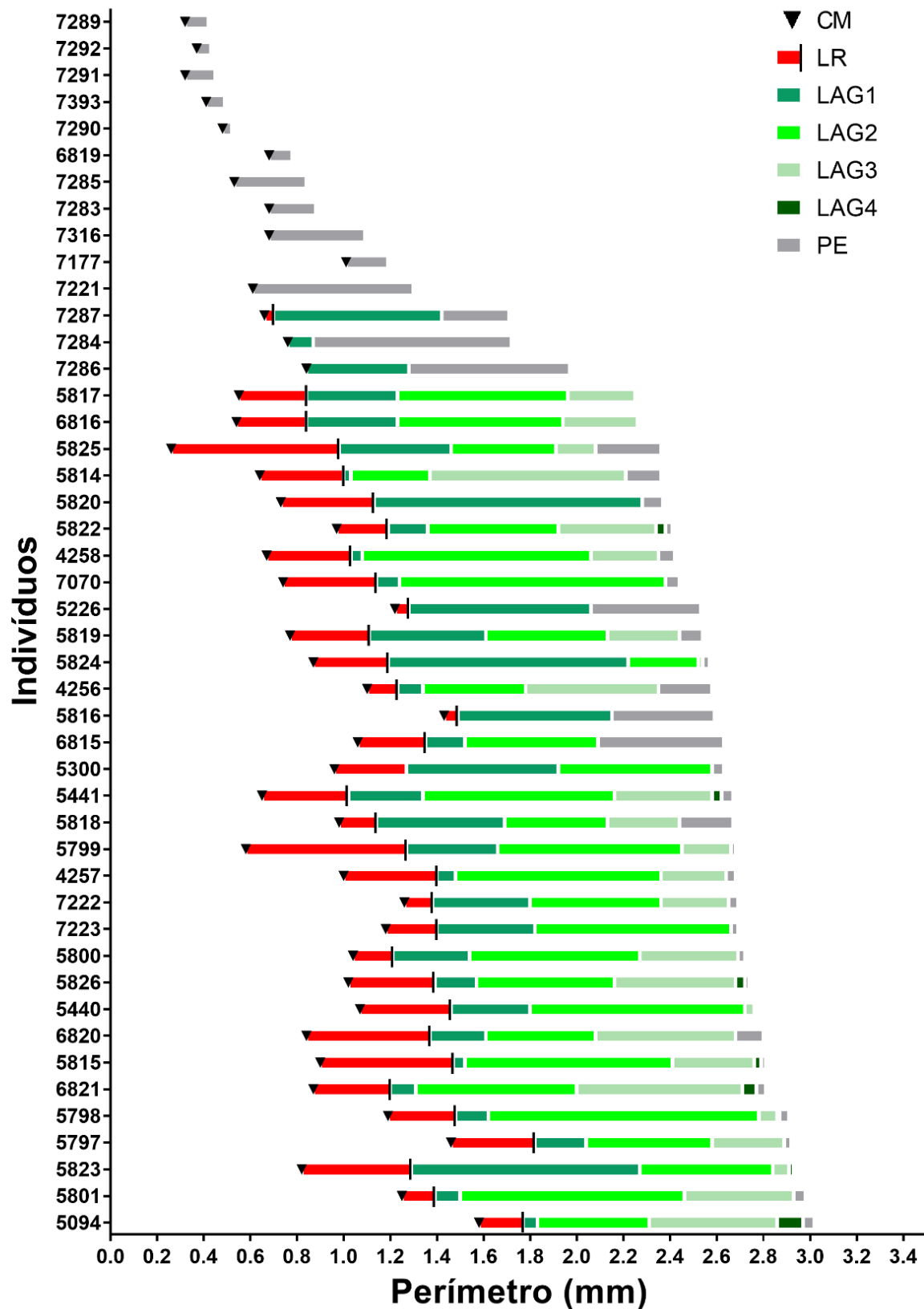


Fig. 3. Dados brutos das medições dos perímetros da CM= Cavidade Medular, LR= Linha de Reabsorção, LAG= Linhas de suspensão do crescimento observadas, PE= Perímetro Externo dos indivíduos de *Melanophryniscus admirabilis*. Os limites das barras coloridas indicam o perímetro mensurado.

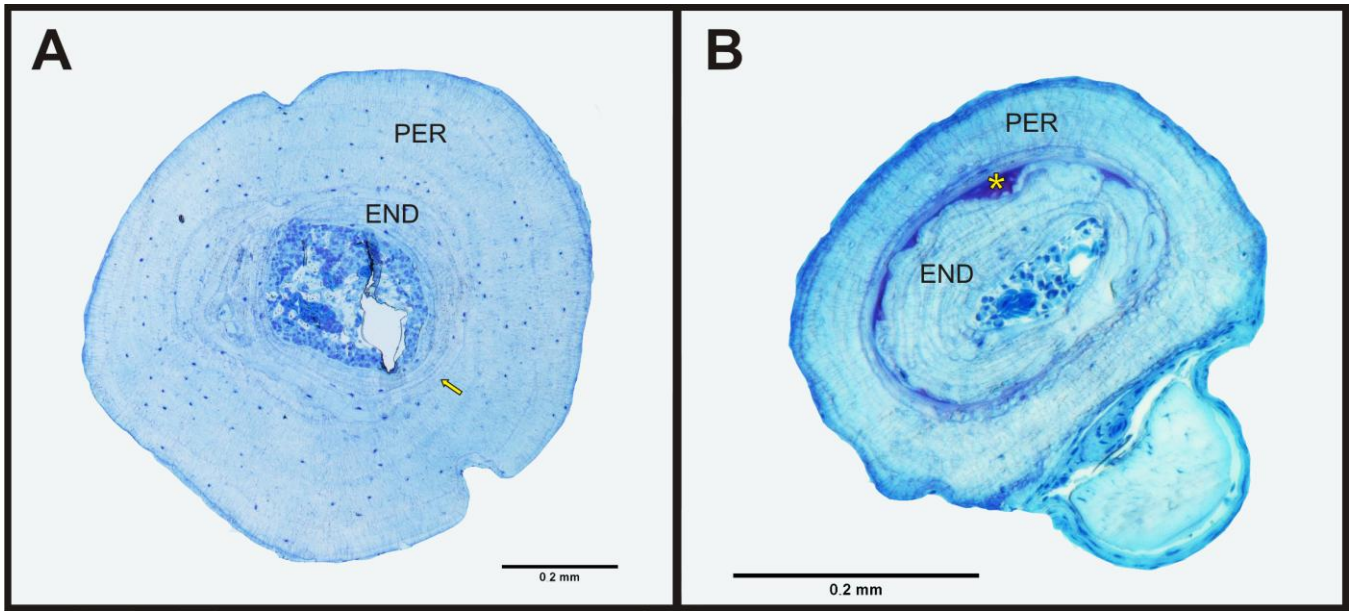


Fig. 4. Comparação entre as secções da diáfise do fêmur (A) e da falange (B) de uma fêmea de *M. admirabilis* com 39.50 mm de CRC. END= Endósteo; PER= Periósteo; A seta indica a LR e o asterisco, a Linha de Kastschenko.

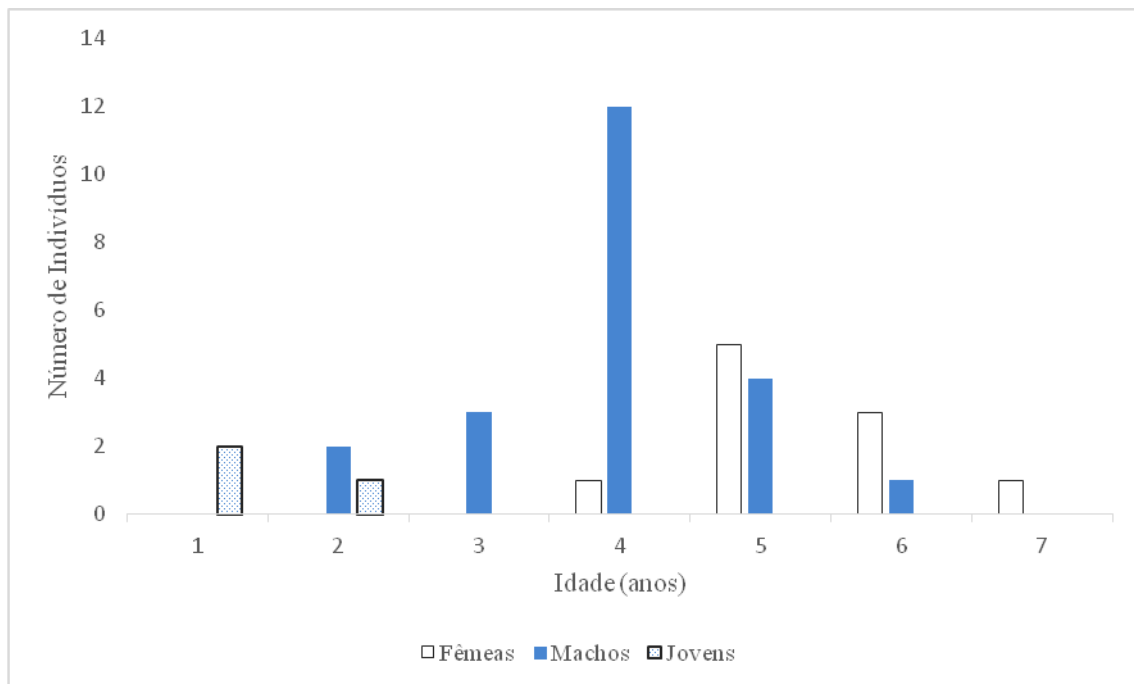


Fig. 5. Estrutura etária de *Melanophryniscus admirabilis*, definida a partir da análise de osteocronologia..

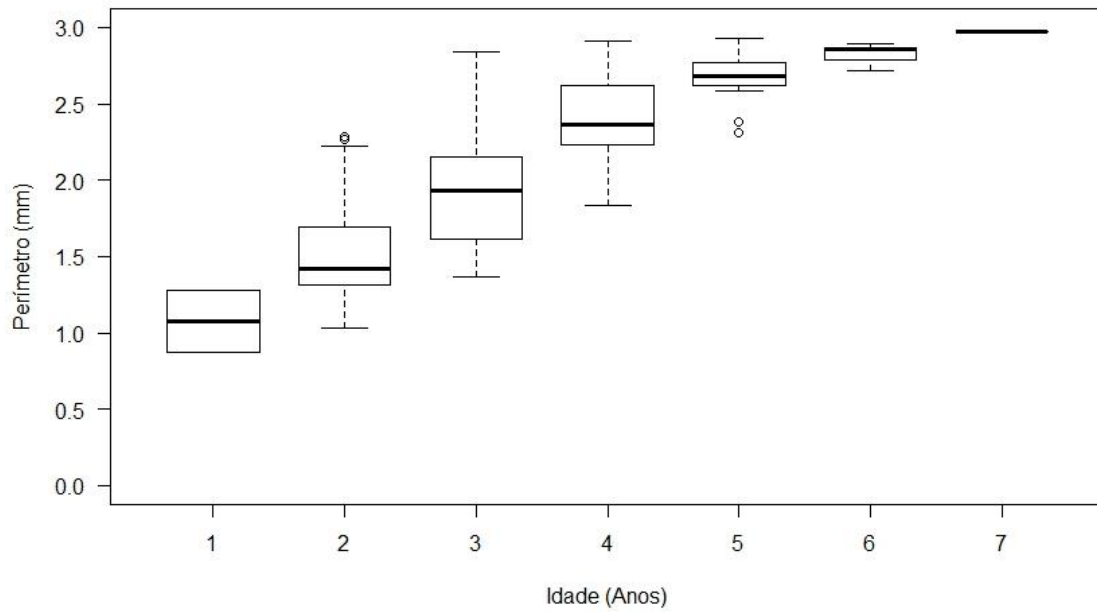


Fig. 6. Variação nos perímetros das LAGs de *M. admirabilis*, para cada idade. Limites das caixas representando valores mínimos e máximos, barra horizontal indicando a média e linha tracejada indicando os desvios padrão.

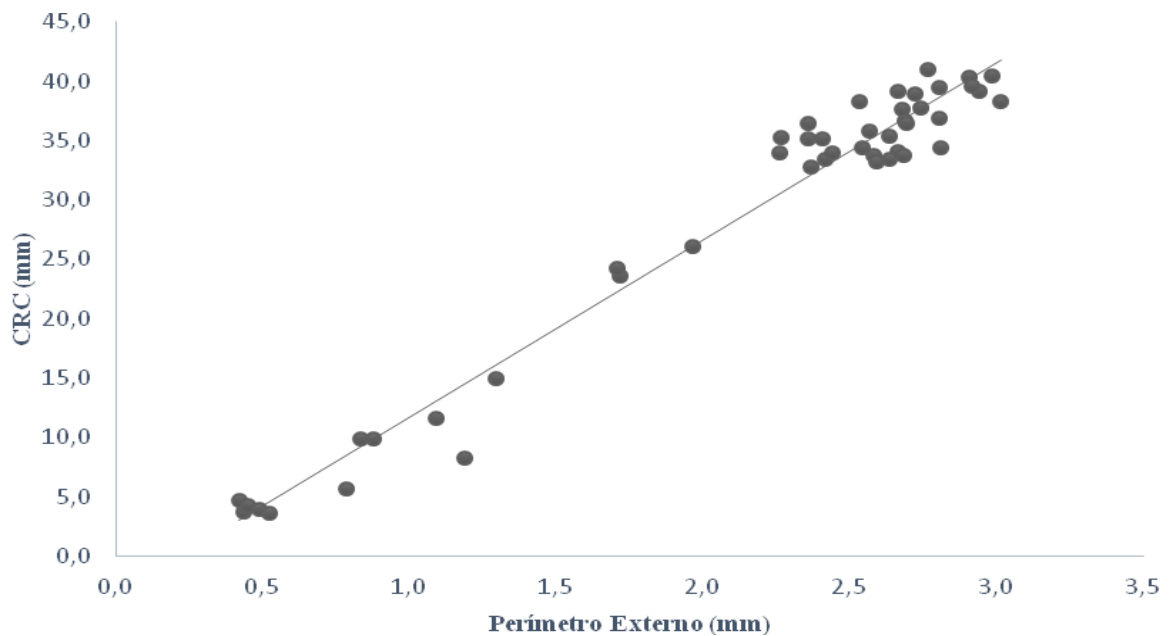


Fig. 7 Relação entre comprimento rostro-cloacal e perímetro externo dos fêmures de indivíduos de *M. admirabilis* ($n = 46$; $r = 0.88$; $P < 0.0001$). A linha representa o modelo linear.

