

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

CYBELE SABINO LISBOA

**CAPACIDADE DE LOCOMOÇÃO DE *OLOLYGN ALCATRAZ*
(ANURA:HYLIDAE): SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO *EX SITU***

São Carlos
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

CYBELE SABINO LISBOA

**CAPACIDADE DE LOCOMOÇÃO DE *OLOLYGON ALCATRAZ*
(ANURA:HYLIDAE): SUBSÍDIOS PARA A CONSERVAÇÃO *EX SITU***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna para obtenção do título de mestre profissional em Conservação da Fauna.

Orientação: Prof. Dr. João Batista da Cruz
Co-orientação: Dra. Cinthia Aguirre Brasileiro

São Carlos
2017

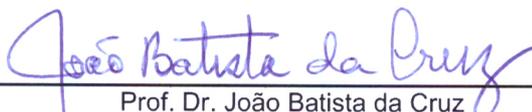


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

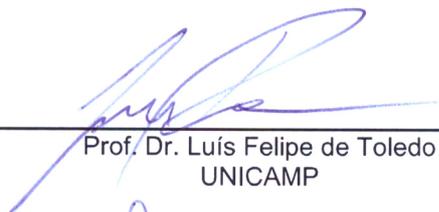
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

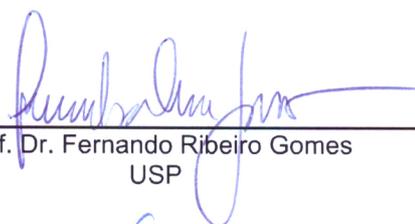
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Cybele Sabino Lisboa, realizada em 02/05/2017:



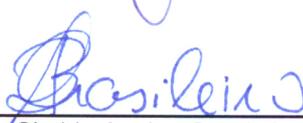
Prof. Dr. João Batista da Cruz
FPZSP



Prof. Dr. Luís Felipe de Toledo
UNICAMP



Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes
USP



Profa. Dra. Cinthia Aguirre Brasileiro
UNIFESP

*Aos meus pais Julio e Suzel...
por nos criarem de forma exemplar, sempre nos orientando e apoiando todas as nossas escolhas
.... além de me darem a base sólida e incentivo para estudar ciências!*

Agradecimentos

É inevitável finalizar um trabalho e não refletir sobre como chegamos até aqui. Não há como não fazer uma retrospectiva de todos os desafios que enfrentamos e não lembrar de pessoas que fizeram parte deste caminho e que foram fundamentais para atingir o objetivo final. Para estas pessoas, que fizeram parte da minha jornada durante os dois anos de mestrado, quero deixar registrado meus sinceros agradecimentos....

Ao meu orientador João Cruz, pela confiança em meu trabalho e por ser o maior incentivador ao meu ingresso no PPGCFau, além de todo o apoio ao projeto.

À minha co-orientadora Cinthia Brasileiro, por ser a pessoa que desde o início me inspirou a trabalhar com a conservação de *Ololygon alcatraz*, pela parceria de longa data, pelo direcionamento do tema e por todas as nossas discussões durante este trabalho.

Ao grande José Eduardo de Carvalho... não tenho palavras para agradecer, afinal este trabalho não teria saído se não fosse por ele, já que até então, minha experiência com enzimas e fisiologia era nenhuma! Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, por abrir as portas de seu laboratório, pela atenção e preocupação em todas as etapas deste estudo. Espero que esta seja apenas a primeira de muitas colaborações!

À minha equipe do Setor de Répteis, Edson Matsuda, Edvaldo dos Santos, Iara dos Reis, Iolanda Floriani, Junior Castro, Leandro Barros, Lucas Mantovani, Rachel Venturini, Regina Célia, Rodrigo Alarcon, Rosângela Tenório, Thaís Xavier, e à minha chefe Ana Maria Beresca, pela compreensão e por tocarem as atividades durante minha ausência para cumprir as disciplinas e atividades relacionadas ao projeto.

À Renata Ibelli Vaz, minha grande parceira no programa de conservação da *O. alcatraz*, por todas as nossas reflexões e apoio mútuo ao longo desta jornada.

Ao Cauê Monticelli pela grande ajuda e parceria nas saídas de campo à Ilha de Alcatrazes, principalmente pelos perrengues que passamos na trilha e desembarques, além do apoio quando eu estava com o estômago colabado de tanto passar mal no barco.

Ao Fabrício Rassy pela disponibilidade e profissionalismo em executar os procedimentos veterinários com os animais.

À Rachel Venturini e à Karin Saito por me ajudarem a cuidar com carinho das pererecas-de-Alcatrazes nestes últimos tempos.

À Natalya Lima e Bianca Gonçalves pelo auxílio durante os experimentos em laboratório.

À Kelen Leite, chefe da Estação Ecológica Tupinambás, pelo total apoio logístico a este projeto e a todos os outros desde que comecei a trabalhar com a espécie. Agradeço por tudo o que tem feito em sua gestão para proteger o Arquipélago de Alcatrazes e as espécies lá ocorrem.

Aos meus colegas de turma Claudia Berbert, Karen Bertoldo, Marcos Melo, Mariano Maudet, Olivaldi Azevedo, Pietra Micheletti e, em especial à Fernanda Vaz, por compartilharmos as mesmas angústias e por sempre um ajudar ao outro, afinal não é fácil enfrentar um mestrado em conjunto com empregos de tanta responsabilidade como os nossos.

À Tânia Vaz (mãe da Rê) por nos receber tão carinhosamente em sua chácara durante as disciplinas em São Carlos, nos fazendo sentir em casa.

Ao Fábio Barros, pela grande ajuda nas análises estatísticas e pela paciência em me ensinar a interpretar os dados e a mexer no programa.

Ao Herton Escobar (Estadão) por organizar o financiamento da última saída de campo.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) e à Estação Ecológica Tupinambás por concederem a autorização de pesquisa SISBIO.

E, enfim, agradeço à Fundação Parque Zoológico de São Paulo pelo apoio de sempre ao projeto e pela liberação para que eu pudesse cumprir todas as atividades referentes ao mestrado.

RESUMO

A atual situação global dos anfíbios requer a implantação de medidas eficientes de conservação para minimizar ou estabilizar as taxas de declínios e/ou extinções. A conservação *ex situ* é uma estratégia complementar à conservação *in situ* e é utilizada principalmente na reprodução e manutenção de espécies ameaçadas em cativeiro com a finalidade de criar bancos genéticos vivos para possíveis reintroduções. Sabe-se que certas aptidões podem ser perdidas após múltiplas gerações em cativeiro, gerando indivíduos mais adaptados ao ambiente cativo. Uma aptidão fundamental para a sobrevivência é a função locomotora, portanto, para um programa de conservação *ex situ*, é importante saber se as capacidades de locomoção e metabólica de indivíduos nascidos em cativeiros e indivíduos nativos são semelhantes. Com isso, o presente estudo avaliou as capacidades locomotoras e metabólicas de populações *ex situ* e *in situ* de *Ololygon alcatraz*. Esta espécie é bromelícola, endêmica da Ilha de Alcatrazes (SP) e está categorizada como Criticamente em Perigo nas listas de animais ameaçados. O desempenho locomotor foi medido por meio do deslocamento dos indivíduos, após estimulação manual em uma arena, e a capacidade metabólica foi estimada por meio da medida da atividade máxima de enzimas do metabolismo energético responsáveis pela produção de energia para a atividade de locomoção. Os animais nascidos em cativeiro apresentaram maior resistência ao exercício quando comparados com os de natureza, percorrendo maiores distâncias, saltando mais vezes e despendendo mais tempo em exercício, além de apresentarem maior atividade da enzima citrato sintase. Os indivíduos provenientes de natureza demonstraram potencial para executar saltos mais longos e apresentaram maior atividade da enzima lactato desidrogenase, a qual dá suporte a este tipo de exercício. Estas diferenças parecem ser explicadas pela plasticidade fenotípica, decorrente do ambiente em que os indivíduos foram criados durante o desenvolvimento ontogenético. Este estudo evidenciou a necessidade de implantação de algumas medidas para evitar que tais diferenças sejam fixadas em indivíduos nascidos em cativeiro e não comprometam sua sobrevivência se forem translocados para a vida selvagem, subsidiando assim o programa de conservação *ex situ* da espécie.

Abstract

The current global amphibian situation requires the implementation of efficient conservation measures to minimize or stabilize declines and extinctions rates. *Ex situ* conservation is a complementary strategy to *in situ* conservation and is mainly used in captive breeding and maintenance of endangered species for possible reintroductions. It is known that certain abilities can be lost after multiple generations in captivity, generating individuals more adapted to the captive environment. Locomotor function is a fundamental trait to survival, therefore, for an *ex situ* conservation program it is important to know whether the locomotion and metabolic capacities of captive born and wild animals are similar. Thereby, the present study evaluated the locomotor and metabolic capacities of *ex situ* and *in situ* populations of *Oloolygon alcatraz*. This species is bromeligenous, endemic to the Ilha dos Alcatrazes (Brazil) and is threatened, categorized as Critically Endangered on the IUCN and Brazilian red lists. The locomotor performance was measured by manual stimulation of the individuals in an arena and the metabolic capacity was estimated by measuring the maximum activity of enzymes responsible for the production of energy for the locomotion activity. Captives born presented greater resistance to exercise when compared to the wild ones, traveling greater distances, jumping more times and spending more time in exercise, besides presenting higher activity of the enzyme citrate synthase. Wild animals had the potential to perform longer jumps and presented greater activity of the enzyme lactate dehydrogenase, which supports this type of exercise. These differences seems to be explained by phenotypic plasticity, arising from the environment in which individuals were created during ontogenetic development. This study evidenced the need to implement some measures to avoid that such differences are fixed in captives born *Oloolygon alcatraz* and do not compromise their survival if they are translocated to the wild, thus subsidizing the species *ex situ* conservation program.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. A crise dos anfíbios	1
1.2. Desafios da conservação <i>ex situ</i>	2
1.3. Espécie de estudo	3
2. Material e Métodos	5
2.1. Procedência, animais experimentais e alojamento	5
2.2. Medidas do desempenho locomotor	8
2.3. Tratamento das amostras de tecido e atividade enzimática	9
2.4. Análises estatísticas	10
3. Resultados	12
3.1. Morfometria	12
3.2. Desempenho locomotor.....	12
3.3. Atividade enzimática.....	15
4. Discussão	18
4.1. Desempenho locomotor e atividade enzimática.....	18
4.2. Implicações para a conservação <i>ex situ</i>	21
5. Conclusões.....	23
6. Referências bibliográficas	24
Apêndice	30

1. Introdução

1.1. A crise dos anfíbios

Declínios populacionais e extinções de anfíbios são uma realidade global e alvo de preocupação de pesquisadores desde a década de 80 (CHANSON et al., 2008; HALLIDAY, 2008; MENDELSON, 2011). Tal preocupação intensificou-se em meados dos anos 2000 após os resultados da Avaliação Global dos Anfíbios (*Global Amphibian Assessment*), conduzida pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), quando 1% das espécies foram consideradas oficialmente extintas, 32% listadas em alguma categoria de ameaça e 23% possuíam deficiência de dados para avaliação. Além do mais, paralelamente a estes números e independente das categorias de ameaça, 42% das espécies apresentavam declínio populacional (CHANSON et al., 2008). As causas são diversas tais como: perda de habitat, caça, doenças, ação de espécies invasoras, contato direto e indireto com contaminantes ambientais e mudanças climáticas (HALLIDAY, 2008). Esses fatores, agindo de forma sinérgica ou isoladamente, variam em presença ou em intensidade de acordo com a localidade (BEEBEE; GRIFFITHS, 2005; GRANT et al., 2016; HALLIDAY, 2008; YOUNG et al. 2004). Embora a perda de habitat seja sem dúvida a principal ameaça para a maioria das espécies (HALLIDAY, 2008), nas últimas três décadas o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* foi o responsável pela extinção de espécies de anfíbios, em diferentes partes do mundo (LIPS, 2016; YOUNG et al., 2004;).

Os anfíbios constituem um grupo taxonômico diverso, com características, como o seu ciclo bifásico, que os tornam importantes para o funcionamento dos ecossistemas (COX et al., 2008; HALLIDAY, 2008). Assim, medidas de conservação são aplicadas na tentativa de

minimizar ou estabilizar declínios e/ou extinções das espécies (GRANT et al., 2016; HOFFMANN et al., 2008).

A intervenção deve aumentar de acordo com as ameaças às populações e, às vezes, são necessárias estratégias complementares à conservação *in situ*. Por meio da conservação *ex situ*, a extinção de muitas espécies sujeitas às ameaças *in situ* podem ser evitadas (PAVAJEAU, 2005). Esta estratégia é utilizada principalmente na reprodução e manutenção de espécies ameaçadas em cativeiro com a finalidade de criar bancos genéticos vivos para possíveis reintroduções (BLOXAM; TONGE, 1995; COHN, 1988; GRIFFITHS; PAVAJEAU, 2008; PAVAJEAU, 2005).

1.2. Desafios da conservação *ex situ*

O estabelecimento de populações viáveis para reintrodução ainda é um desafio, especialmente para os anfíbios. Para garantir a sobrevivência dos indivíduos nascidos em cativeiro após uma reintrodução e principalmente o estabelecimento dessas populações à longo prazo, devem ser avaliadas as características da vitalidade em cativeiro como, por exemplo, a qualidade sanitária, a variabilidade genética, a habilidade para detecção e fuga dos predadores, assim como a capacidade de estabelecimento de territórios e de alimentação (GRIFFIN et al., 2000; GRIFFITHS; PAVAJEAU, 2008; KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006; SNYDER et al., 1996).

Em cativeiro, a remoção das pressões ecológicas naturais como a capacidade de suporte ambiental e a presença de predadores podem resultar em alta sobrevivência e geração de uma prole numerosa. Por outro lado, certas aptidões dos indivíduos podem ser perdidas após múltiplas

gerações em cativeiro (GILLIGAN; FRANKHAM, 2003; WOODWORTH et al., 2002). Isso pode levar as populações estabelecidas em cativeiro a uma "seleção artificial", gerando indivíduos mais adaptados ao ambiente cativo (ARAKI et al., 2007; KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006). Caso isso ocorra, os indivíduos criados sob condições controladas podem não sobreviver quando reintroduzidos em ambiente natural (KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006). Programas de conservação *ex situ* em diferentes países têm resultado tanto em sucesso como em fracasso após a reintrodução e as causas destes resultados muitas vezes não são evidentes (BLOXAM; TONGE, 1995; GRIFFITHS; PAVAJEAU, 2008; PAVAJEAU, 2005).

Há evidências de que o desempenho locomotor de anuros é afetado pelas condições ambientais, além de haver grande variabilidade entre espécies e indivíduos (GOMES et al., 2009; OTANI, 2011). A função locomotora dos organismos é fundamental na captura de presas, na fuga contra predadores, na busca e defesa de territórios, atividades importantes para sobrevivência (BUCKLEY et al., 2005; HIGHAM; RUSSELL, 2010; IRSCHICK, 2000). Assim, é importante conhecer se as capacidades de locomoção e metabólica de indivíduos nascidos em cativeiros e indivíduos nativos são semelhantes, sendo este o objetivo do presente estudo. Com isso, espera-se que os resultados obtidos tragam subsídios para eventuais ações de reintrodução conduzidas por programas de conservação *ex situ*.

1.3. Espécie de estudo

Oolygon alcatraz é uma espécie bromelícola, endêmica da Ilha de Alcatrazes (com cerca de 135ha) (BRASILEIRO, 2008). Devido a sua ocorrência em área restrita e ameaças ao seu habitat, ela está categorizada como Criticamente em Perigo nas listas das espécies ameaçadas de

extinção do Estado de São Paulo, nacional e da UICN (União Internacional para Conservação da Natureza) (BRASILEIRO, 2008; BRESSAN et al., 2009; RODRIGUES; CRUZ, 2004). Apesar de ameaçada, a população da espécie é considerada abundante na ilha (CINTHIA BRASILEIRO, comunicação pessoal, 2017). Um dado importante sobre o histórico da Ilha de Alcatrazes é que até o início de 2013 a Marinha do Brasil executava treinamento de tiros no local, o que representava uma forte ameaça às espécies locais, visto que a ilha sofreu incêndios algumas vezes, atingindo principalmente a vegetação ao redor da área dos alvos, inclusive nos bromeliais (BATAUS; REIS, 2011). Atualmente, a ilha está inserida em uma Unidade de Conservação (Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes), porém como existe a possibilidade de visitação pública no local, projeta-se um declínio da qualidade do habitat (BRASIL, 2016).

Sendo assim, em 2011, *O. alcatraz* foi submetida a um programa de conservação *ex situ* na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, indo de encontro com uma das metas do Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Insular Ameaçada de Extinção (BRASIL, 2010). O protocolo de reprodução está estabelecido desde 2012 e, em caso de necessidade imediata, será possível aumentar o número de indivíduos produzidos nestas condições. Atualmente há uma população com cerca de 100 adultos de *O. alcatraz* mantida em cativeiro nesta instituição.

2. Material e Métodos

2.1. Procedência, animais experimentais e alojamento

A Ilha de Alcatrazes está localizada no arquipélago de mesmo nome, no litoral norte do Estado de São Paulo (Brasil), distante a cerca de 35km do continente (24°05'25"S e 45°41'00"W) e possui área aproximada de 135 ha (Fig. 1). Atualmente esta ilha está inserida na Unidade de Conservação Federal - Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes (BRASIL, 2016), sob administração do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A formação vegetal presente na ilha é característica do Domínio Mata Atlântica, porém típica de ambientes insulares com comunidades pequenas, isoladas do continente, fragmentadas e interdependentes. A ilha é constituída por costões rochosos, formações rupestres, com mata densa de encosta predominante de mirtáceas e palmeiras (BATAUS; REIS, 2011). As populações de *O. alcatraz* estão restritas aos bromeliais presentes na ilha (BRASILEIRO, 2008).

As coletas para este estudo foram realizadas em março e setembro de 2016 e os animais foram transportados até a Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) em potes plásticos com o fundo preenchido com água e vegetação para manter a umidade e para criar pontos de fuga. Foram utilizados quinze indivíduos de *Ololygon alcatraz* coletados na Ilha de Alcatrazes (doze adultos e três juvenis) e quinze nascidos em cativeiro (dez adultos e cinco juvenis) (Figs. 2a e b). Foram considerados juvenis aqueles que apresentaram gônadas imaturas, ou seja, quando não era possível distinguir testículos e ovários durante a dissecação.

Fig. 1: Localização da Ilha de Alcatrazes (24°05'25"S e 45°41'00"W) em relação ao continente e representação de algumas formações vegetais presentes na ilha.



Fonte: Google Earth (Acesso em Fev/2017)



Foto: Cauê Monticelli

Fig.2: (a) Indivíduo de *Ololygon alcatraz* proveniente de natureza e (b) nascido em cativeiro



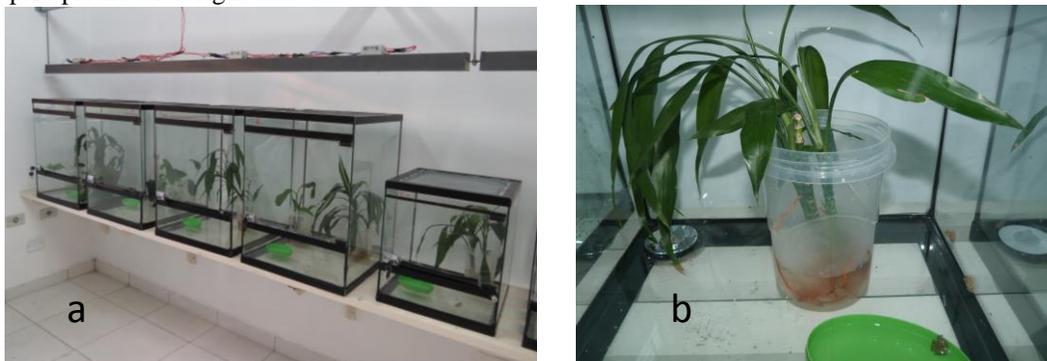
Foto: Cybele Lisboa



Foto: Alessandra Souza

Os indivíduos nascidos em cativeiro são provenientes da população *ex situ* mantida na FPZSP. Foram selecionados indivíduos nascidos em diferentes períodos e anos (idade: 1 a 47 meses após completarem a metamorfose) para obter variedade morfológica e etária no grupo amostral, de modo semelhante ao encontrado em natureza. Tanto os indivíduos coletados quanto os nascidos em cativeiro foram alojados e mantidos sob as mesmas condições na FPZSP: adultos em terrários de vidro (45x45x60cm; Fig.3a) e juvenis em potes plásticos (12x18cm), ambos com ventilação adequada e sem substrato. Água *ad libitum* era fornecida em potes com vegetação (Fig.3b).

Fig. 3: (a) aquários para alojamento dos indivíduos de *O. alcatraz* e (b) pote com água e folhagens para promover abrigo.



Fotos: Cybele Lisboa

Este estudo foi conduzido sob autorização SISBIO nº 45822 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em 18 de novembro de 2015 (nº3291220815).

2.2. Medidas do desempenho locomotor

Para a medida do desempenho locomotor, cada indivíduo foi submetido a um teste de salto em uma arena de 2 m de comprimento por 1,5 m de largura (Fig.4) (ZUG, 1978). A tomada de dados foi realizada em um laboratório da FPZSP nos meses de março e setembro de 2016. As medidas foram realizadas entre as 8h e 12h, em condições de temperatura ambiente variando entre 24,4 e 26,5°C e a umidade relativa do ar entre 62 e 81%. Na arena os animais foram estimulados manualmente a saltar até atingirem a exaustão (quando não mais respondiam ao serem colocados em decúbito ventral). A cada salto era realizada uma marcação no solo (Fig.4b) e, posteriormente, foi obtida a distância entre cada uma delas com fita métrica. Assim, foi possível calcular a distância do salto mais longo (representando a potência do maior esforço) e a distância total percorrida (representando a resistência ao exercício). Também foram contabilizados o número de saltos e o tempo despendido até a exaustão (este último representando o tempo total de exercício).

Fig. 4: (a) Arena em que os testes de salto foram realizados e (b) forma de estímulo manual para o salto e marcação no solo



Foto: Cybele Lisboa

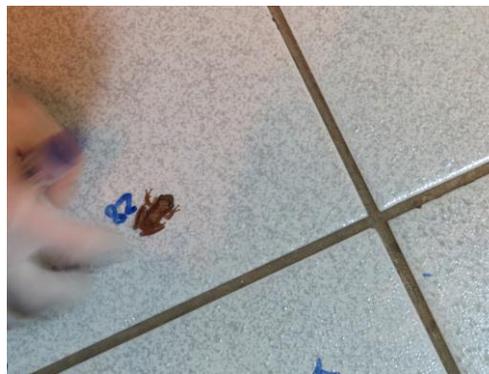


Foto: Natalya Lima

Após 2 a 3 horas do término do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com anestésico inalatório isoflurano (CFMV, 2013) e posteriormente congelados em freezer -

80°C. Como variáveis morfométricas foram medidas a massa corpórea (MC) e os comprimentos rostro-cloacal (CRC), da tíbia (CT), do fêmur (CF) de cada animal com o auxílio de um paquímetro (0,01 mm de precisão).

Para os indivíduos coletados, a tomada de dados foi realizada em um intervalo de três dias após a data de coleta para evitar possíveis mudanças nas características fisiológicas decorrentes da permanência em cativeiro (NAVAS; GOMES, 2001); em apenas um indivíduo o intervalo foi de oito dias.

2.3. Tratamento das amostras de tecido e atividade enzimática

Dos animais congelados, foram retirados todos os músculos da perna para a medida da atividade máxima de enzimas do metabolismo energético, como uma estimativa do metabolismo energético. As amostras de tecido muscular foram homogeneizadas em 9 volumes de tampão Imidazol-HCl-100mM (pH 7,0) contendo EDTA-2mM; NaF-20mM; PMSF- 1mM e Triton X-100-0,1%; mantidas sobre gelo, em um homogeneizador tipo Turrax (Ultra Stirrer 80). A ruptura das membranas mitocondriais foi efetuada por meio de sonicação utilizando um sonicador UltraCleaner 800A (Unique Inc.). A partir deste processo foram obtidos os extratos brutos de cada amostra, que passaram por uma diluição adicional (1:10), com a mesma solução tampão, para então serem utilizadas no ensaio enzimático.

Foram feitas medidas da atividade máxima das enzimas piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), ambas pertencentes à via glicolítica, e da citrato sintase (CS), pertencente ao Ciclo de Krebs. Os ensaios enzimáticos foram preparados em cubetas de quartzo para 700µL com o uso de um espectrofotômetro Beckman DU-800 equipado com um controlador de

temperatura Peltier (Beckman-Coulter Inc.). Foram usados métodos baseados nas alterações de absorvância de NADH a 340nm (PK e LDH), ou DTNB a 412nm (CS), a 25°C, em condições de saturação de substrato e não inibitórias, de acordo com as modificações feitas a partir de Bergmeyer (1983) conforme a seguir:

- **PK:** Imidazol-HCl-100mM pH 7,0; MgCl₂ - 10mM; KCl -100mM; ADP-2,5mM; F_{1,6}P₂-0,02mM; NADH-0,15mM; LDH-11,6U/mL; extrato bruto diluído (1:10); e substrato fosfoenolpiruvato-2,5mM.

- **LDH:** Imidazol-HCl-100mM pH 7,0; DTT-5mM; NADH-0,15mM; extrato bruto diluído (1:10); e substrato piruvato -1mM.

- **CS:** Tris-HCl-50mM pH 8,0; DTNB-0,1mM; AcetilCoA-0,214mM; extrato bruto diluído (1:10); e substrato oxaloacetato -0,86mM.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados de atividade enzimática, obtidos das médias das duplicatas, foram expressos em micromol de substrato convertido em produto, por minuto e por grama de tecido úmido, nas condições do ensaio.

2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R v. 0.99.902 (RSTUDIO, 2016) e pelo PAST v. 2.17 (HAMMER et al., 2001) A normalidade dos dados foi testada pelo método Shapiro-Wilk, considerando $P > 0,05$ como hipótese nula para uma distribuição normal.

Para verificar as diferenças morfométricas entre os grupos (cativeiro e natureza), foi utilizado o teste *t* de Student com nível de significância 0,05. Regressões lineares simples foram aplicadas para averiguar a correlação dos parâmetros morfométricos entre si (CRC, MC, CF e

CT), com base na correlação de Pearson (r). Caso houvesse correlação, apenas um parâmetro seria selecionado como co-variável nos demais testes.

A Análise de Covariância (ANCOVA) foi utilizada considerando a procedência do indivíduo (cativeiro ou natureza) como variável preditora sobre os parâmetros de desempenho locomotor (distância total percorrida, número de saltos, distância do salto mais longo, tempo de exercício e velocidade) controladas pelo CRC (co-variável). Primeiramente testou-se o efeito aditivo de um fator sobre o outro e, na ausência de interação, o modelo foi reduzido de acordo com Engovist (2005).

Para verificar as diferenças nas atividades máximas das enzimas (PK, LDH e CS) entre os grupos, foi utilizado o teste t de Student com nível de significância 0,05.

Em situações em que pretendia-se averiguar o efeito de determinado parâmetro sobre outro, independente da procedência dos indivíduos, os dados foram analisados em conjunto. Neste sentido, regressões lineares e correlação de Pearson (r) foram aplicadas para averiguar a relação da atividade máxima das enzimas com o desempenho locomotor (CS com distância total percorrida, número de saltos e tempo de exercício; LDH com salto mais longo) e do desempenho locomotor com os parâmetros morfométricos cabíveis (salto mais longo com comprimento do fêmur e da tíbia).

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão.

3. Resultados

3.1. Morfometria

Os indivíduos de cativeiro apresentaram comprimento rostro-cloacal (CRC) variando de 15,7 a 26,71mm ($22,07 \pm 3,92$ mm) e os de natureza de 14 a 30,6mm ($23,72 \pm 4,51$ mm) (Apêndice - Tabela S1). O CRC médio dos dois grupos foi semelhante ($t = -1,07$; $P=0,29$).

A massa corpórea (MC) foi semelhante entre os animais de cativeiro e aqueles coletados em natureza ($t = -0,4$; $P=0,69$), sendo que os indivíduos de cativeiro apresentaram uma média de 0,98g ($\pm 0,52$ g) de MC e os de natureza uma média de 1,06g ($\pm 0,55$ g). Os indivíduos de cativeiro apresentaram menor tamanho do fêmur e da tíbia (CF: $9,97 \pm 1,82$ mm; CT: $10,1 \pm 0,45$ mm) quando comparados com os indivíduos de natureza (CF = $11,64 \pm 2,14$ mm; CT = $12,7 \pm 2,55$ mm; $t=-2,31$ e $t = -3,23$; respectivamente, em ambos $P<0,01$). Além disso, todos os parâmetros morfométricos foram correlacionados entre si (Apêndice - Tabela S2).

3.2. Desempenho locomotor

Os indivíduos de cativeiro percorreram em média 200 cm a mais dos que os animais de natureza ($F_{1,27}=6,83$; $P=0,01$; Tabela 1, Fig. 5). O CRC não tem influência na distância total percorrida ($F_{1,27}=2,28$; $P=0,14$; Tabela 1).

Tanto o CRC quanto a procedência dos indivíduos influenciaram no número de saltos. O CRC influenciou os dois grupos da mesma forma, porém em magnitudes diferentes: quanto maior o CRC, maior foi o número de saltos ($F_{1,27}=5,72$; $P=0,02$), sendo que na média os indivíduos de cativeiro realizaram onze saltos a mais do que os de natureza. ($F_{1,27}=15,24$; $P<0,001$). Tanto o

CRC ($F_{1,27}=1,29$; $P=0,26$) quanto a procedência ($F_{1,27}=2,28$; $P=0,14$) não influenciaram o salto mais longo executado pelos indivíduos (Tabela 1, Fig. 6).

O tempo de exercício também sofreu influência do CRC para ambos os grupos ($F_{1,27}=4,96$; $P=0,03$); contudo, a diferença nas médias é explicada pela procedência dos grupos ($F_{1,27}=17,65$; $P<0,001$). Os indivíduos de cativo aguentaram mais tempo em exercício do que aqueles capturados na natureza, em média 86 segundos a mais. Tanto o CRC ($F_{1,27}=1,16$; $P=0,69$) quanto a procedência ($F_{1,27}=3,54$; $P=0,07$) não influenciaram na velocidade do deslocamento em ambos os grupos (Tabela 1, Fig 6).

Tabela 1: Resultados da análise de covariância entre a procedência de indivíduos de *Ololygon alcatraz* (cativo ou natureza, $n=15$ em cada grupo) sobre os parâmetros de desempenho locomotor controladas pelo comprimento rostro-cloacal (CRC)

Parâmetro do desempenho locomotor	Média dos Grupos		Resultados ANCOVA		
	Cativo	Natureza	Procedência	CRC	Interação
Distância total percorrida (cm)	702,4 ± 213,95	524,57 ± 207,7	Coef. = -200,86 $F_{1,27}=6,83$ $P=0,01$	Coef. = 13,91 $F_{1,27}=2,28$ $P=0,14$	$F_{1,26}=3,73$ $P=0,06$
Número de saltos	30 ±9,30	20,3 ±6,88	Coef.= -11,00 $F_{1,27}=15,24$ $P<0,001$	Coef.= 0,81 $F_{1,27}=5,72$ $P=0,02$	$F_{1,26}=2,28$ $P=0,14$
Salto mais longo (cm)	58,3 ±12,74	70,2 ±22,82	Coef. = 10,35 $F_{1,27}=2,28$ $P=0,14$	Coef.= 0,93 $F_{1,27}=1,29$ $P=0,26$	$F_{1,26}=2,28$ $P=0,14$
Tempo de exercício (s)	174,4 ±65,85	97,07 ± 51,24	Coef. = -86,43 $F_{1,27}=17,65$ $P<0,001$	Coef. = 5,50 $F_{1,27}=4,96$ $P=0,03$	$F_{1,26}=0,01$ $P=0,1$
Velocidade (cm/s)	4,5 ±1,92	6,7 ±4,05	Coef.= 2,26 $F_{1,27}=3,54$ $P=0,07$	Coef. = -0,06 $F_{1,27}=0,16$ $P=0,69$	$F_{1,26}=0,28$ $P=0,60$

Fig.5: Distância total percorrida pelos indivíduos de *Ololygon alcatraz* provenientes de cativeiro e de natureza. Os valores representam a média e o desvio padrão para n= 15 indivíduos em cada grupo. O símbolo * indica diferença significativa entre as médias dos grupos.

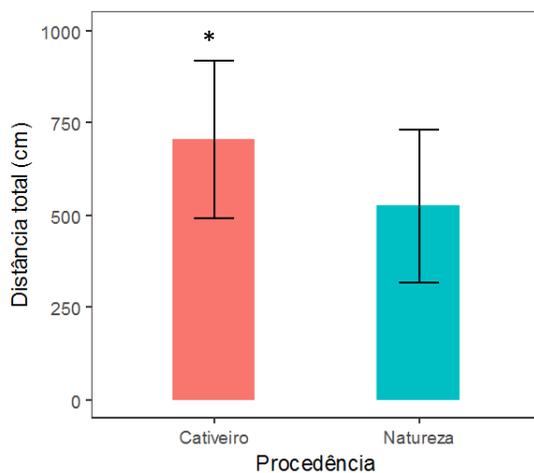


Fig. 6: Relação entre desempenho locomotor e comprimento rostro-cloacal (CRC) de indivíduos de *Ololygon alcatraz* provenientes de cativeiro (n=15) e de natureza (n=15).

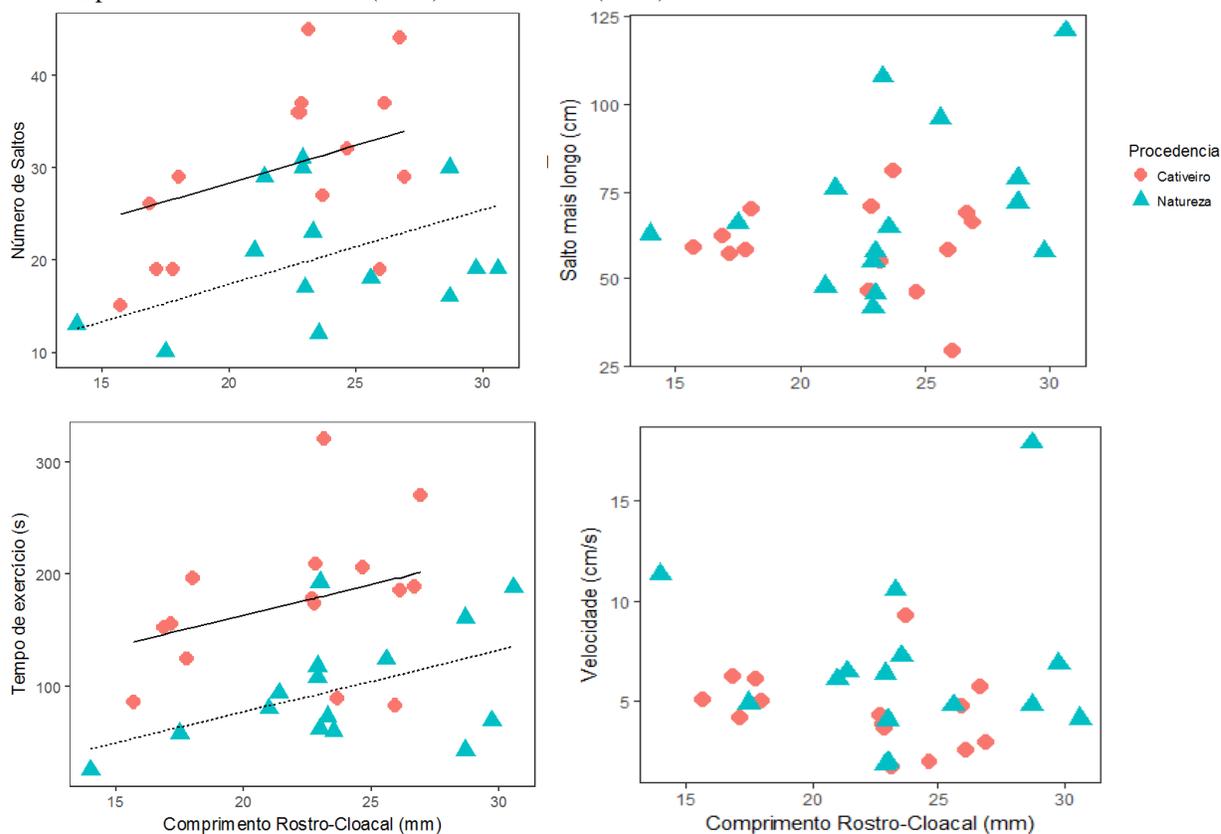
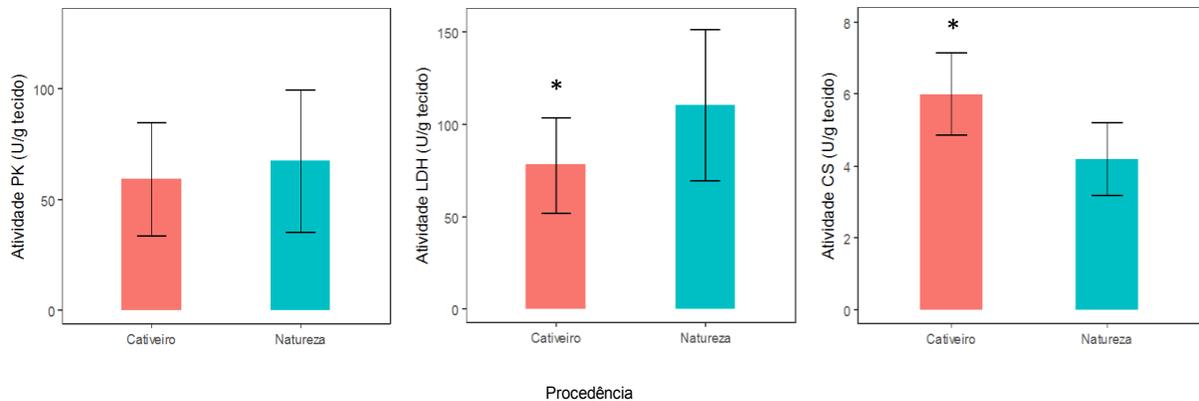
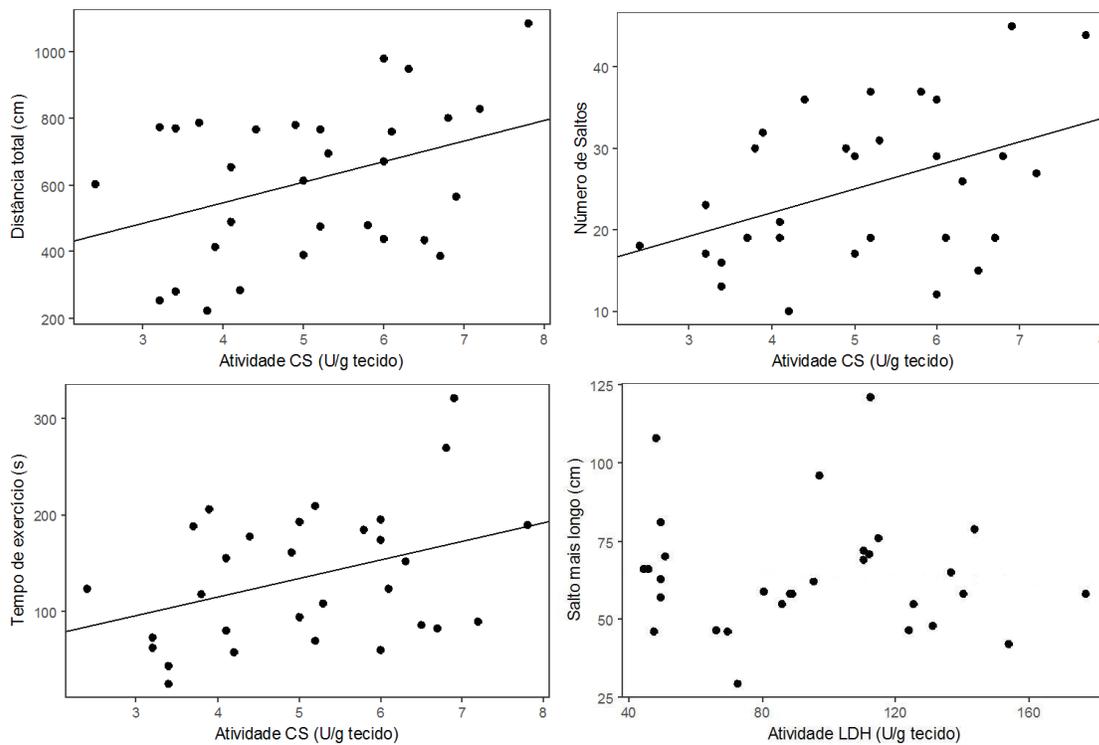


Fig.8: Atividade máxima das enzimas piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS), em U/g tecido, entre indivíduos de *Oololygon alcatraz* nascidos em cativeiro e coletados em natureza. Os valores representam a média e o desvio padrão para n= 15 indivíduos em cada grupo. O símbolo * indica diferença significativa entre as médias dos grupos.



Existe uma correlação positiva entre a atividade da CS e os seguintes parâmetros de desempenho locomotor: distância total percorrida ($r=0,38$; $P=0,04$), número total de saltos ($r=0,43$; $P=0,02$) e tempo de exercício ($r=0,38$; $P=0,04$) quando os indivíduos de ambas as procedências são analisados em conjunto (Fig 9). Da mesma forma, a atividade da LDH esteve positivamente correlacionada com o comprimento do fêmur ($r= 0,42$; $P=0,02$) e da tíbia ($r= 0,45$; $P=0,01$), não havendo correlação entre esta enzima e o salto mais longo ($r= -0,05$; $P=0,77$; ver também Apêndice - Tabela S3).

Fig.9: Relação entre desempenho locomotor e atividade máxima das enzimas citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH) de indivíduos de *Ololygon alcatraz* nascidos em cativeiro e coletados em natureza (n=30).



4. Discussão

4.1. Desempenho locomotor e atividade enzimática

Os indivíduos de *Oloolygon alcatraz* nascidos em cativeiro apresentaram maior resistência ao exercício quando comparados com os indivíduos de natureza, percorrendo maiores distâncias, saltando mais vezes e despendendo mais tempo em exercício, além de apresentarem maior atividade da enzima citrato sintase. No entanto, em relação à potência do salto, os animais de natureza demonstraram potencial em executar saltos mais longos e apresentaram maior atividade da enzima lactato desidrogenase. As populações de *O. alcatraz* de cativeiro e de natureza não apresentaram diferenças em relação ao tamanho médio ou massa corpórea, porém os indivíduos de natureza apresentaram membros posteriores maiores (fêmur e tíbia) do que os de cativeiro.

As diferenças morfológicas e fisiológicas encontradas entre os indivíduos provenientes do cativeiro e da natureza de *O. alcatraz* provavelmente não são em decorrência das características genéticas entre as populações, uma vez que os indivíduos nascidos em cativeiro utilizados no presente estudo são F1 (primeira geração), ou seja, são filhos de animais coletados em natureza. Sabe-se que as alterações genéticas fixadas em uma população começam a ser evidenciadas após múltiplas gerações (KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006) e não a curto prazo como neste caso. Sendo assim, tais diferenças podem ser decorrentes dos efeitos da plasticidade fenotípica ocorrida durante o desenvolvimento dos indivíduos. A plasticidade fenotípica é uma resposta extremamente importante e comum apresentada pelos organismos frente às diferentes condições ambientais a que são expostos, que pode ser expressa na morfologia, na fisiologia ou no comportamento (FUSCO;MINELLI,2010). Está claro que as condições dos ambientes artificiais são muito diferentes dos naturais, sendo praticamente impossível representá-los de

forma fidedigna. Assim, é de se esperar que os indivíduos de *Oloolygon alcatraz* criados em cativeiro apresentem diferenças daqueles que se desenvolveram em natureza (McKECHNIE et al., 2006; PORTUGAL ET AL., 2011).

Considerando que os membros posteriores são os principais responsáveis pela potência do salto em anfíbios (ZUG,1978), parece plausível afirmar que o espaço em que os indivíduos de *O. alcatraz* se desenvolveram e a ausência de predadores foram os fatores importantes para as diferenças encontradas no comprimento do fêmur e da tíbia entre os animais de cativeiro e de natureza. Otani (2011) comparou populações de anfíbios provenientes de áreas fragmentadas e contínuas e relatou que as variáveis fenotípicas associadas diretamente à locomoção (tais como comprimento relativo do membro posterior e de cada parte deste membro) são influenciadas pela paisagem. No caso de *O. alcatraz*, a restrição de espaço aos animais de cativeiro e a ausência de predadores fazem com que eles não precisem realizar exercícios explosivos, tais como saltos longos para fuga. Mesmo em uma comparação com grupos de vertebrados mais distantes, estudos com roedores e frangos comprovam que existe um aumento significativo do tamanho da tíbia quando estes animais são submetidos a exercícios durante a fase inicial de desenvolvimento (BIEWENER; BERTRAM, 1994; WALLACE et al., 2007; PORTUGAL et al., 2011). Esta plasticidade fenotípica é favorecida pela própria estrutura do tecido ósseo que, durante grande parte do ciclo de vida de um animal, permite um redimensionamento contínuo dos ossos em resposta aos estímulos mecânicos provocados pela contração muscular (PORTUGAL et al., 2011).

O fato dos indivíduos de *O. alcatraz* mantidos em cativeiro terem apresentado maior atividade da enzima citrato sintase (CS) parece explicar a maior resistência ao exercício. A alta

atividade de CS indica maior capacidade do metabolismo aeróbio para a produção de energia na forma de ATP (HOCHACHKA; SOMERO, 2002) e que, portanto, parece desempenhar importante papel no tipo de atividade física mais sustentada nos animais de cativeiro. Esta maior atividade aeróbia dos músculos esqueléticos de animais de cativeiro em comparação com aqueles provenientes da natureza pode ser um indicativo da adaptação ao exercício moderado realizado cronicamente (COUTINHO, 2004). Em observações diárias nos recintos de *O. alcatraz* mantidos na FPZSP, durante o manejo para alimentação e limpeza dos aquários, é notável que os indivíduos mais velhos criados em cativeiro normalmente caminham ou dão pequenos saltos dentro dos aquários (como em exercício moderado), efetuando apenas eventualmente saltos explosivos mais longos. Ainda sobre estas características do comportamento locomotor, também é evidente notar que os indivíduos recém-metamorfoseados nascidos em cativeiro apresentam saltos mais explosivos e longos, assim como indivíduos juvenis e adultos coletados em natureza.

Os resultados referentes a enzima lactato desidrogenase (LDH) completam essa linha de raciocínio. Os animais de natureza apresentaram maior atividade da LDH comparados com os de cativeiro. A maior atividade desta enzima indica uma maior capacidade do metabolismo glicolítico para a produção anaeróbia de ATP nos músculos esqueléticos (HOCHACHKA; SOMERO, 2002). Dessa forma, os indivíduos de *O. alcatraz* provenientes da natureza são mais propensos ao metabolismo glicolítico anaeróbio que os animais de cativeiro. Apesar de não ter sido confirmado no conjunto de dados deste estudo, provavelmente devido ao número amostral reduzido, os indivíduos de natureza apresentam potencial para executar saltos mais longos em comparação com os animais de cativeiro (ver Fig. 6). Isto se relaciona, de certa forma, com as características bioquímicas dos músculos apontadas e também com as características estruturais,

uma vez que animais de natureza possuem membros posteriores maiores do que os de cativeiro, sendo este um indício de capacidade em realizar saltos mais potentes (ZUG,1978; JAMES et al., 2007). Nos indivíduos de *O. alcatraz*, o comprimento da tíbia influenciou de forma positiva o salto mais longo e tais constatações, associadas à alta atividade da LDH, fornece suporte a esta idéia. Provavelmente, a necessidade constante de fuga contra os predadores presentes na ilha (BRASILEIRO; OYAMAGUCHI, 2006) deve levar os animais a uma mudança fenotípica mais propensa a atividade por saltos de maior potência sustentado por metabolismo glicolítico anaeróbio.

4.2. Implicações para a conservação *ex situ*

As diferenças morfológicas, comportamentais e fisiológicas associadas ao desempenho locomotor encontradas entre os animais de cativeiro e natureza podem ser decorrentes da influência do ambiente em que foram expostos durante o desenvolvimento ontogenético. Estes resultados não devem ser interpretados como algo que compromete o programa de conservação *ex situ*, mas sim que devem ser levados em consideração para promoção de ajustes importantes para o caso de soltura e reforço populacional *in situ*.

Os animais criados em cativeiro são mais resistentes ao exercício e isso pode lhes proporcionar maior longevidade. Coutinho (2004) encontrou um efeito positivo no sistema imunológico de roedores envelhecidos submetidos cronicamente a exercícios moderados. Essa característica pode ser benéfica para manutenção de populações cativas, porém, quando a reintrodução é prevista, deve ser priorizado um melhor preparo para fuga contra predadores, uma vez que essa condição é essencial para a sobrevivência em natureza (KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006). Com base nos resultados deste estudo, é possível afirmar que a fase de soltura seja o

ponto crucial para solucionar este problema. Sendo assim, os animais nascidos em cativeiro podem ser liberados ainda na fase larval ou pós-metamórfica para evitar que tais diferenças sejam expressas nestes indivíduos quando adultos, uma vez eles irão se desenvolver em condições naturais. Bloxam e Tongue (1995) afirmaram que a melhor fase para soltura é a larval, pois acreditam que a finalização da metamorfose em natureza garante que o desenvolvimento dos padrões comportamentais seja mantido. Nesta mesma linha, Germano e Bishop (2008) mencionaram que liberar ovos ou juvenis é mais benéfico do que adultos, pois assim os indivíduos não terão tempo suficiente para desenvolver fortes associações com o local de origem.

Embora as diferenças observadas em relação à potência do salto entre as populações cativa e nativa sejam desencadeadas pelas condições ambientais, elas estão sob controle genético e podem ser adaptativas se selecionadas ao longo de muitas gerações (VIA;LANDE,1985; KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2006). Kraaijeveld-Smit et al. (2006) observaram que a resposta anti-predador em girinos de *Alytes muletensis* começa a ser degenerada após 9 a 12 gerações em cativeiro, tendo como evidências tanto mudanças morfológicas quanto genéticas. Com isso, é importante que algumas medidas sejam implantadas aos animais nascidos em cativeiro para evitar esta “seleção artificial”, tais como submeter os mesmos a exercícios que estimulem a realizarem saltos longos durante a fase de crescimento e elaborar um treinamento anti-predação (GRIFFIN et al., 2000). Além disso, enquanto a população nativa estiver estável, é interessante de tempos em tempos coletar novas matrizes para cruzar com a população cativa. Considerando que o programa de conservação *ex situ* de *Ololygon alcatraz* é uma proposta à longo prazo, o presente estudo evidenciou a necessidade de adoção de medidas para evitar a fixação de

caracteres que possam comprometer a sobrevivência de indivíduos nascidos em cativeiro se forem translocados para a natureza.

5. Conclusões

- a) A única diferença na morfologia observada entre os indivíduos de *Ololygon alcatraz* oriundos de natureza e de cativeiro foi o comprimento da perna, que foi maior em indivíduos de natureza.
- b) Os indivíduos nascidos em cativeiro percorreram maiores distâncias, saltaram mais vezes e despenderam mais tempo em exercício do que os de natureza. Também apresentaram maior atividade da enzima citrato sintase, indicando maior capacidade do metabolismo aeróbio para a produção de energia na forma de ATP.
- c) Os indivíduos provenientes de natureza tiveram maior atividade da enzima lactato desidrogenase, que dá suporte a exercícios explosivos, indicando maior capacidade do metabolismo glicolítico para a produção anaeróbia de ATP.
- d) As diferenças observadas entre os grupos de natureza e de cativeiro podem ser explicadas pela plasticidade fenotípica, decorrente do ambiente em que os indivíduos foram criados durante o desenvolvimento ontogenético.

6. Referências bibliográficas

ARAKI, H.; COOPER, B.; BLOUIN, M. S. Genetic Effects of Captive Breeding Cause a Rapid, Cumulative Fitness Decline in the Wild. **Science**, 318, 101, 2007. (doi: 10.1126/science.1145621)

BATAUS, Y. S. L.; REIS, M. L. (organizadores). **Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Insular Ameaçada de Extinção**. Série Espécies Ameaçadas n° 21, Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Icmbio, 2011.

BEEBEE, T.J.C.; GRIFFITHS, R.A.. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, 125, p.271–285, 2005.

BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis, vol 2**. Verlag Chemic, Wheinheim, 1983.

BIEWENER AA; BERTRAM JE. Structural response of growing bone to exercise and disuse. **J. Appl. Physiol.** 76:946–955, 1994.

BLOXAM, Q. M. C.; TONGE, S.J. Amphibians: suitable candidates for breeding-release programs. **Biodiversity and Conservation**, 4: 636-644, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Portaria nº. 94, de 27 de agosto de 2010**. Aprova o Plano de Ação Nacional da Herpetofauna Insular ameaçada de extinção, estabelecendo seu objetivo, metas, prazo, abrangência e formas de implementação e supervisão. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p.100, 2010.

BRASIL. **Decreto s/n, de 2 de Agosto de 2016**. Estabelece a criação do Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes, no litoral norte do Estado de São Pau

lo, Município de São Sebastião. Diário Oficial da União, Brasília, n.148, 3 ago. 2016, Seção 1, ISSN 1677-7042.

BRASILEIRO, C.A. *Scinax alcatraz*. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G. M. & PAGLIA, A. P. (editores). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1.ed. Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008

BRASILEIRO, C.A.; OYAMAGUCHI, H.M. *Scinax alcatraz* (Alcatraz snouted frog). Predation. **Herpetological Review**. 37, 451, 2006.

BRESSAN, P.M.; KIERULFF, M.C.M.; SUGIEDA, A.M. (coordenadores). **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2009.

BUCKLEY, C. R.; MICHAEL, S. F.; IRSCHICK, D. J. Early hatching decreases jumping performance in a direct developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. **British Ecological Society: Functional Ecology**. 19: 67–72, 2005.

CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). **Guia Brasileiro de boas práticas para a eutanásia em animais. Conceitos e procedimentos recomendados**. Comissão de ética, bioética e bem-estar animal. Brasília, 2013.

CHANSON, J.; HOFFMANN, M.; COX, N.; STUART, S. The state of the world's amphibians. In: Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., and Young, B.E. (eds.) **Threatened Amphibians of the World**. Lynx Editions, Barcelona, Spain, 2008. Cap. 4, p. 33-52.

COHN, J. P. Captive breeding for conservation. **Bioscience**. Vol.38, No 5, pp. 312-316, 1988

COUTINHO, M.M. **Efeito do treinamento moderado sobre metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos**. 2004. 100f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, 2004.

COX, N. et al. Why save amphibians? In: Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., and Young, B.E. (eds.) **Threatened Amphibians of the World**. Lynx Editions, Barcelona, Spain, 2008. Cap. 2, p. 23-29.

ENGQVIST, L. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. **Animal Behaviour**, 70, 967–971, 2005. (doi:10.1016/j.anbehav.2005.01.016)

FUSCO, G.; MINELLI, A. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts **Phil. Trans. R. Soc. B**. 365, 547–556, 2010. (doi:10.1098/rstb.2009.0267)

GERMANO, J.M.; BISHOP, P.J. Suitability of Amphibians and Reptiles for Translocation. **Conservation Biology**, Volume 23, No. 1, 7–15, 2008. (doi: 10.1111/j.1523-1739.2008.01123.x)

GILLIGAN, D. M.; FRANKHAM, R. Dynamics of genetic adaptation to captivity. **Conservation Genetics**. 4: 189-197, 2003.

GOMES, F.R., REZENDE, E.L., GRIZANTE, M.R.; NAVAS, C.A. The evolution of jumping performance in anurans: morphological correlates and ecological implications. **J. Evol. Biol.**, 22: 1088-1097, 2009.

GRANT, E. H. C. et al. Quantitative evidence for the effects of multiple drivers on continental-scale amphibian declines. **Sci. Rep.** 6, 25625, 2016. (doi: 10.1038/srep25625)

GRIFFIN, A. S.; BLUMSTEIN, D. T.; EVANS, C. S. Training captive-bred or translocated animals to avoid predators. **Conservation Biology**, Volume 14, No. 5, 1317–1326, 2000.

GRIFFITHS, R. A.; PAVAJEAU, L. Captive Breeding, Reintroduction and the Conservation of Amphibians. **Conservation Biology**, Volume 22, No. 4, 852–861, 2008.

HALLIDAY, T.R. Why amphibians are important **Int. Zoo Yb.** 42: 7–14, 2008. (doi:10.1111/j.1748-1090.2007.00037.x)

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1):9pp. 2001.

HOFFMANN, M. et al. Amphibian Conservation – Responding to the Global Decline of Amphibians. In: Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., and Young, B.E. (eds.) **Threatened Amphibians of the World**. Lynx Edicions, Barcelona, Spain, Cap. 11, p. 114-134, 2008.

HOCHACHKA P.; SOMERO, G. **Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. Oxford University Press, Oxford. 2002. 466p.

HIGHAM, T.E.; RUSSELL, A.P. Divergence in locomotor performance, ecology, and morphology between two sympatric sister species of desert-dwelling gecko. **Biological Journal of the Linnean Society**, 101: 860–869, 2010

IRSCHICK, D. J. Effects of behaviour and ontogeny on the locomotor performance of a West Indian lizard, *Anolis lineatopus*. **British Ecol. Society: Functional Ecology**, 14: 438–444, 2000

JAMES, R. S.; NAVAS, C. A.; HERREL, A. How important are skeletal muscle mechanics in setting limits on jumping performance? **The Company of Biologists: The Journal of Experimental Biology**, 210: 923-933, 2007. (doi:10.1242/jeb.02731)

KRAAIJEVELD-SMIT, F. J. L.; GRIFFITHS, R. A.; MOORE, R. D.; BEEBEE, T. J. C., Captive breeding and the fitness of reintroduced species: a test of the responses to predators in a threatened amphibian. **Journal of Applied Ecology**, 43: 360–365, 2006.

LIPS, K.R. Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. **Phil. Trans. R. Soc. B** 371: 20150465, 2016. (doi: 10.1098/rstb.2015.0465)

McKECHNIE, A. E.; FRECKLETON, R. P.; JETZ, W. Phenotypic plasticity in the scaling of avian basal metabolic rate. **Proc. R. Soc. B.** 273, 931–937, 2006. (doi:10.1098/rspb.2005.3415)

MENDELSON, J.R., III. Shifted Baselines, Forensic Taxonomy, and Rabbs' Fringe-limbed Treefrog: The Changing Role of Biologists in an Era of Amphibian Declines and Extinctions. **Herpetological Review**, 42(1), 21–25, 2011.

NAVAS, C.A.; GOMES, F.R.. Time in captivity as a confounding variable in herpetological research: an example from the metabolic physiology of frogs. **Herpetol. Rev.** 32: 228–230, 2001.

OTANI, L. **Aspectos da fisiologia metabólica e do desempenho locomotor em anfíbios anuros: Implicações da fragmentação ambiental.** 2011. 121f. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral). Instituto de Biociências da USP, São Paulo, 2011.

PAVAJEAU, L. **Captive Breeding and Release of Amphibians: *an assessment of published data of breeding-release programmes.*** 2005. Dissertation (Master of Science degree in Conservation Biology). The Durrell Institute of Conservation and Ecology. University of Kent at Canterbury, United Kingdom, 2005.

PORTUGAL, S.J; BUTLER, P.J; GREEN, J.A.; CASSEY, P. Indications of phenotypic plasticity in moulting birds: captive geese reveal adaptive changes in mineralisation of their long bones during wing moult. **J Ornithol.**152:1055–1061, 2011. (doi: 10.1007/s10336-011-0699-9)

RODRIGUES, M. T.; CRUZ, C. A. G., 2004. *Scinax alcatraz*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **03 August 2014**.

RSTUDIO (2016). RStudio: Integrated development environment for R (Version 0.99.902) [Computer software]. Boston, MA. Retrieved July, 2016. Available from <http://www.rstudio.org/>

SNYDER, N. F. R.; DERRICKSON, S. R.; BEISSINGER, S. R.; WILEY, J. W.; SMITH, T. B.; TOONE, W. D. & MILLER, B., 1996. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. **Conservation Biology**, vol.10, n.2, pp. 338-348, 1996.

VIA, S.; LANDE, R. Genotype–environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. **Evolution**, 39, 505–522, 1985.

WALLACE, J.M. et al. Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. **Bone** 40:1120–1127, 2007. (doi:10.1016/j.bone.2006.12.002)

WOODWORTH, L. M.; MONTGOMERY, M. E.; BRISCOE, D. A.; FRANKHAM, R. Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. **Conservation Genetics**, 3: 277-288, 2002.

YOUNG, B. E. et al. Disappearing Jewels: The Status of NewWorld Amphibians. **NatureServe**, Arlington, Virginia, 2004.

ZUG, G. R. Anuran Locomotion—Structure and Function, **2: Jumping Performance of Semiaquatic, Terrestrial, and Arboreal Frogs**. Number 276. Washington: Smithsonian Contribution to Zoology, 1978, 31 p.

Apêndice

Tabela S1: Médias morfométricas comparativas de indivíduos de *Ololygon alcatraz* nascidos em cativeiro e coletados em natureza

Parâmetro	Grupo Cativeiro (n=15)		Grupo Natureza (n=15)		Teste t
	Shapiro-Wilk	Média	Shapiro-Wilk	Média	
Comp. Rostro-Cloacal (mm)	W=0,88; p= 0,06	22,07 ± 3,92	W=0,93; p= 0,31	23,72 ± 4,51	t = -1,07; p=0,29
Massa Corpórea (g)	W=0,90; p= 0,11	0,98±0,52	W=0,89; p= 0,07	1,06±0,55	t = -0,4; p=0,69
Comp. Fêmur (mm)	W=0,91; p= 0,13	9,97±1,82	W=0,97; p= 0,82	11,64±2,14	t = -2,31; p=0,03
Comp. Tíbia (mm)	W=0,96; p= 0,67	10,1±0,45	W=0,97; p= 0,86	12,7±2,55	t = -3,23; p=0,003

Tabela S2: Resultados da análise de regressão linear e correlação entre os diferentes parâmetros morfométricos dos indivíduos de *Ololygon alcatraz* (n=30).

	Inclinação (a)	Elevação (b)	r	P
Comp. Rostro-Cloacal x Massa Corpórea	7,60	15,11	0,96	<0,001
Comp. Fêmur x Comp. Tíbia	0,78	1,85	0,93	<0,001
Comp. Tíbia x Comp. Rostro-Cloacal	0,53	-0,73	0,89	<0,001
Comp. Fêmur x Comp. Rostro-Cloacal	0,46	0,16	0,92	<0,001
Comp. Tíbia x Massa Corpórea	3,90	7,39	0,83	<0,001
Comp. Fêmur x Massa Corpórea	3,56	7,16	0,89	<0,001

Tabela S3: Resultados da análise de regressão linear e correlação entre a atividade máxima das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS) com parâmetros de desempenho locomotor e morfométricos de indivíduos de *Ololygon alcatraz*

	Inclinação (a)	Elevação (b)	r	P
Desempenho locomotor				
Distância total x CS	0,002	3,636	0,38	0,04
Nº de saltos x CS	0,064	3,477	0,43	0,02
Tempo de exercício x CS	0,007	4,051	0,38	0,04
Salto mais longo x LDH	-0,106	100,83	-0,05	0,77
Morfometria				
LDH x comp. fêmur	7,355	14,542	0,42	0,02
LDH x comp. tíbia	6,671	18,046	0,45	0,01
CS x comp. fêmur	-0,108	6,25	-0,16	0,38
CS x comp. tíbia	-0,160	6,901	-0,29	0,12