

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Rodrigo Zieri

INFLUÊNCIA HORMONAL SOBRE O SISTEMA PIGMENTAR EM

***Eupemphix nattereri* (ANURA): EFEITOS DO ALPHA-MSH,**

ESTRADIOL E TESTOSTERONA

DOUTORADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

RODRIGO ZIERI

INFLUÊNCIA HORMONAL SOBRE O SISTEMA PIGMENTAR EM *EUPHEMIX NATTERERI*

(ANURA): EFEITOS DO ALPHA-MSH, ESTRADIOL E TESTOSTERONA

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, área de Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

ORIENTADOR: PROF. DR. CLASSIUS DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA

Zieri, Rodrigo.

Influência hormonal sobre o Sistema Pigmentar em *Eupemphix nattereri* (Anura): efeitos do MSH, estradiol e testosterona / Rodrigo Zieri. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

106 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Classius de Oliveira

Co-orientador: Sebastião Roberto Taboga

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Células pigmentares viscerais. 2. Anuro - Morfologia. 3. *Eupemphix nattereri*. 4. MSH. 5. Estradiol. 6. Testosterona. I. Oliveira, Classius de. II. Taboga, Sebastião Roberto. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 597.8

RODRIGO ZIERI

Influência Hormonal sobre o Sistema Pigmentar em *Eupemphix nattereri* (Anura):

Efeitos do alpha-MSH , Estradiol e Testosterona

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Classius de Oliveira
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Rejane Maira Góes,
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior
Professora Doutora
UNIRP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Selma Maria Almeida Santos
Professora Doutora
Instituto Butantan – São Paulo

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Doutor
UNICAMP - Campinas

SUPLENTES:

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Silvana Gisele Pegorin de Campos
Professora Doutora
UNICAMP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina de Carvalho Marchesin
Professora Doutora
UNIRP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 01 de junho de 2010

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	v
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	4
1.1. Panorama geral dos Anfíbios	4
1.2. <i>Eupemphix nattereri</i> (Anura, Leiuperidae)	6
1.3. Sistema Pigmentar	9
1.4. Sistema Pigmentar Extracutâneo	13
1.5. Ação Hormonal	15
1.6. Sistema Reprodutor Masculino	16
1.7. Referências Bibliográficas	20
1.8. Objetivos	32
Capítulo 1	33
Resumo	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados	40
Discussão	43
Agradecimentos	47
Bibliografia	50
Capítulo 2	56
Resumo	58
Introdução	59
Material e Métodos	60
Resultados	63
Discussão	64
Agradecimentos	71
Bibliografia	72
Capítulo 3	77
Resumo	79

Introdução	80
Material e Métodos	81
Resultados	82
Discussão	84
Agradecimentos	86
Bibliografia	89
2. Conclusões	95

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria e Alécio, lições de vida.

Isabella. Estarei sempre ao seu lado.

Pequena Júlia, que teu caminho seja pleno de alegrias.

AGRADECIMENTOS

Nesse especial e particular momento, fruto de trabalho, alegrias, tropeços, sonhos e principalmente amizades, exponho a minha íntima e honesta gratidão a cada pessoa denominada aqui e outras que deixei escondidas em minha memória, mas que fizeram ou ainda fazem parte de minha vida.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Classius de Oliveira, cujo papel foi de fundamental importância para minha formação acadêmica e pessoal. Devo-lhe muita gratidão e respeito pela confiança depositada em mim durante todos esses anos. Você Exemplo a ser seguido.

Aos membros do Laboratório de Anatomia que aqui estão e que por aqui passaram, Lia Raquel de Souza Santos, Lilian Franco Belussi, Rafaela Maria Moresco, Juliana Rodrigues de Souza, Juliane S. Freitas, Mariana Navarro, Silvia Rosana Pagliarini Cabral, Carlos Eduardo Saranz Zago, Paula Omena e Aline Cristina Santana, pelo aprendizado e companheirismo.

Especialmente às amigas Lia Raquel de Souza Santos e Lilian Franco Belussi, pela amizade e cumplicidade. Obrigado pela oportunidade de termos crescidos juntos da maneira mais harmônica possível. Contem sempre comigo.

Ao meu co-orientador Sebastião Roberto Taboga, pelos ensinamentos e disposição para ajudar sempre. Ótimo profissional. Serei eternamente grato.

Ao Centro de Microscopia, coordenado pelo Professor Dr. Sebastião Roberto Taboga, que nos abriu as portas durante toda a pós-graduação. Sendo de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Ao técnico do Centro de Microscopia e amigo Luiz Roberto Falleiros Junior, pela assistência laboratorial, pela convivência e pelos momentos de descontração. Muito obrigado.

Aos professores que participaram de minha formação, sinceros reconhecimentos e gratidão.

Ao amigo Michel Varajão Garey, pelo grande auxílio com as análises estatísticas. Obrigado irmão (Mané).

Aos meus queridos e atuais companheiros de República – S/N ou Tromba d'água, Michel Varajão Garey (praticamente um filho, que toma conta do pai), Fenanda Vital Ramos de Almeida (nossa linda e esquecida cantora e ficóloga), Nando Rodrigues (irmão e baguá), Laura Elena Chavaría Pizarro (soy de Costa Rica y no de Puerto Rico) e Adriano Mondini (orgulho). Desejo à vocês um futuro brilhante e espero nunca desfazer esse laço que fizemos. Amo todos vocês.

Aos amigos da extinta República “Toca do Largato” pelos muitos anos de convivência, sofrimentos, alegrias e festas (que não foram poucas). Uso novamente aquela célebre palavra, que de fato resume tudo o que queremos um para o outro: “sucesso”.

Aos meus irmãos Alessandra e Adriano, por tudo que fizeram e que ainda fazem por mim. Irmão caçula é assim mesmo. Amo vocês.

À minha querida sobrinha e afilhada Júlia Zieri Carminati, que nos trouxe ainda mais alegria. Tão pequena e já tão importante.

Ao meu sobrinho, concebido à pouco. Será muito bem vindo.

Ao primo Arlindo Pedro Santana e ao cunhado Paulo H. Carminati, pela ajuda e incentivo.

Aos queridos amigos que fiz durante a minha passagem pela universidade e que continuam presente em minha vida de alguma forma. Em ordem alfabética: Aline Magri de Aguiar, Angelita Capobianco, Bianca C. Lisboa, Carmélia, Carolina Panin Candeira, Caroline Vieira, Cintia Bittar, Denilson Fernandes Peralta, Fernando Martins Couto (*in*

memorian), Gabriel Queiróz Pereira, Glaura S. Fernandes, Isabella Mariana de Assis, Ligia Maria Winter, Luiz Fernando Fracassi Gelin (Gorgon), Luiz Gustavo Gorgatto da Silveira, Mario Pinzán Scatena (Xurú), Nadia Martins Lemes da Silva, Natalia de Seta, Renata Ferrari, Renato Romero, Rita L. Peruquetti, Tiago da Silveira Vasconcelos, Thais Bilalba, Vand'mel e Tilangas: Ana Rita, Ferzinha, Ferzona, Kaiser, Marts e Vivian.

À trupe, Adriano Mondini, Aline Chimello Ferreira, Ana Carolina Buzzo Marcondeli, Diego Augusto Lopes da Silva, Lilian Sayuri Ouchi de Melo e Raduan Alexandre Soleman. Incentivadores, amigos, lindas pessoas. Amo vocês.

Finalmente às pessoas pelas quais tenho amor incondicional, Maria e Alécio. Levo de vocês tudo de melhor que um filho poderia esperar. Pais verdadeiros em todos os sentidos.

“O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo, numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”

(Albert Einstein)

Resumo: Os vertebrados ectotérmicos apresentam um desenvolvido sistema de células com pigmentos melânicos em seu citoplasma, localizado em diversos órgãos e membranas. A dispersão dos grãos de melanina dentro dos melanócitos responde fortemente à exposição ao hormônio estimulante de melanócitos (MSH) e aos hormônios sexuais, promovendo alteração na coloração. Este trabalho buscou avaliar o efeito dos esteróides cipionato de testosterona, 17 β -estradiol e do MSH sobre a pigmentação hepática e testicular de *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica, e ultra-estrutural. Foram coletados 60 machos adultos na região de São José do Rio Preto, SP. Para cada experimento, dez machos adultos receberam doses subcutâneas contendo 0,5 mg/kg de cipionato de testosterona e 0,5 mg/kg de 17 β -estradiol, dissolvidos em óleo vegetal e, $2,5 \times 10^{-7}$ mmol/10g de α -MSH dissolvido em PBS, durante 7 dias, a cada 48h. O grupo controle recebeu apenas óleo vegetal ou PBS. Grupos com cinco animais foram eutanasiados 24h após do término do tratamento, e outros cinco, após 15 dias. Foram realizados estudos morfológicos utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. No tecido hepático foram encontradas células de Kupffer. No interstício testicular observou-se melanócitos, com inúmeros melanossomos. Para o grupo tratado com cipionato de testosterona, foi observado um aumento de aproximadamente 2x na área ocupada pelas células pigmentadas no fígado e 4x nos testículos mediante análise a curto prazo. Para o mesmo tratamento, foi observado aumento de 1,8x no fígado dos animais eutanasiados após 15 dias. Tal resposta pode ser decorrente do aumento da atividade melanossintética, do aumento do número de células, ou ambos. Os animais tratados com 17 β -estradiol e α -MSH não apresentaram alterações na pigmentação hepática e testicular mediante estudos morfológicos. Apesar desses resultados, análises bioquímicas podem ser úteis

para detectar alterações na atividade da dopa-oxidase ou da tirosinase no fígado e nos testículos.

Palavras-chave: Anura, testículo, fígado, melanócito, melanomacrófago, melanina.

Abstract: Ectothermic vertebrates have a well-developed system of melanin-containing cells, which are distributed throughout several organs and tissues. The dispersion of melanin-containing granules within melanocytes responds to prolonged exposure to high concentration of MSH and sexual hormones inducing color change. The present study aimed to characterize morphological and stereological patterns of pigmented cells in liver and testis of the *Eupemphix nattereri* under effect of testosterone cypionate, 17 β -estradiol and α -MSH. Sixty adult males were collected in São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. For each experiment, ten adult males were treated with the following hormones injected in the dorsal lymph sac during seven days: (1) 5 mg/kg dose of testosterone cypionate or (2) 5 mg/kg dose of 17 β -estradiol (dissolved in vegetal oil) or (3) $2,5 \times 10^{-7}$ mmol/10g of α -MSH (dissolved in PBS). The control group received only vegetal oil or PBS solution at the same hormonal concentration. Groups of five animals were euthanatized after 24h and the other five, after 15 days. Morphological studies with light and transmission electron microscopy were carried out in the groups. In the hepatic tissue were found Kupffer cells, which are characterized by multivesicle bodies in the cytoplasm and large amount of melanosomes. In the testis, melanocytes-like cells are present in the interstitium. They presented large and irregular aspect and a great amount of intensely pigmented cytoplasm. For the groups treated with testosterone cypionate an increase of approximately 2x in the occupied area by the pigmented cells in the liver and 4x in the testis was observed in the treatment group against the control. The observed response can be due to increase of melanosynthesis

activity, increase in the number of pigmented cells, or both. Moreover, for the same treatment an increase of approximately 1,8x was observed in the liver of animals euthanized after 15 days when compared to those euthanized after 24 hours. The animals treated with 17β -estradiol and α -MSH did not show differences with regard to organs pigmentation. Despite these results, biochemical analysis may be useful in detecting changes in the activity of dopa oxidase or tyrosinase in the liver and testes.

Keywords: Anuran, testis, liver, melanocyte, melanomacrophages, melanin.

1. Introdução

1.1. Panorama geral dos Anfíbios

A classe Amphibia, descrita por Linnaeus (1758), apresenta-se como os primeiros vertebrados a viverem em ambiente terrestre, há cerca de 350-400 milhões de anos, no período Devoniano. Está dividida em três subclasses, Labyrinthodontia (ancestrais dos répteis) e Lepospondyli, já extintas, e a subclasse Lissamphibia (HILDEBRAND, 1995; LINZEY, 2001; POUGH et al., 2008).

A subclasse Lissamphibia, assim denominada pela escassez ou ausência de escamas sobre a pele, surgiu no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 150 milhões de anos (LINZEY, 2001). Estes anfíbios vivos formam um grupo monofilético, que apresentam como sinapomorfia epiderme contendo glândulas produtoras de muco e de veneno, ricamente vascularizado e que permite a realização de trocas gasosas (POUGH et al., 2008). Esta subclasse apresenta enorme diversidade na forma corporal, tamanho, ecologia e comportamento (DUELLMAN e TRUEB, 1999), sendo constituída pelas ordens Gymnophiona, representada pelas cecílias, Urodela, que são as salamandras, e Anura, a qual inclui sapos, rãs e pererecas (HILDEBRAND, 1995; POUGH et al., 2008).

A permeabilidade da pele dos anfíbios é uma característica que rege em muitos aspectos de suas vidas. A evaporação de água pela superfície da pele, limita a atividade dos anfíbios à ambientes relativamente úmidos. A pele é o maior sítio de trocas gasosas, portanto, esses animais apresentam epitélio glandular contendo glândulas mucosas para manutenção da umidade, glândulas que produzem substâncias utilizadas na corte e glândulas de veneno como mecanismo de defesa passiva. Muitos anfíbios advertem sua toxicidade exibindo coloração aposemática e, algumas espécies não tóxicas, se protegem contra predação mimetizando animais venenosos (POUGH et al., 2008).

Os anfíbios, por apresentarem características e modo de vida peculiares, como permeabilidade cutânea à água e eletrólitos e ciclo de vida dependente do ambiente aquático e do terrestre, com uma fase larval aquática e outra adulta terrestre (POUGH et al., 2008), se tornam vulneráveis às alterações ambientais (RABB, 1990; DUELLMAN e TRUEB, 1999). Pelo caráter estenobionte de certas espécies e seu declínio populacional, o grupo tem sido reconhecido como bioindicador de qualidade ambiental (WEYGOLDT, 1989; VITT et al., 1990; BLAUSTEIN e WAKE, 1995).

Neste grupo, também se observa uma grande diversidade de estratégias reprodutivas, seja no comportamento de atração sexual, seja nos tipos e nos locais de postura e nos cuidados com as crias (FEIO et al., 1998; POUGH et al., 2008). A maioria das espécies depositam ovos na água ou em ambiente terrestre, transformando-se em larvas aquáticas ou em miniaturas de adultos. O cuidado parental é observado em muitos anfíbios, onde adultos de algumas espécies carregam os ovos presos na superfície do corpo, outros carregam em dobras da pele, nos sacos vocais ou mesmo no estômago. Algumas fêmeas retêm os ovos nos ovidutos e dão a luz a jovens já metamorfoseados, outros transportam os girinos do ninho para a água e em alguns casos, alimentam o girino (POUGH et al., 2008).

Os anfíbios ocorrem em todos os continentes, com exceção da Antártica, com a proporção de 77% das suas famílias com centro de distribuição tropical, 14% em áreas subtropicais do hemisfério norte e 9% distribuídas pelo restante do globo (POUGH et al., 2008). O Brasil tem a maior biodiversidade mundial (MITTERMEIER et al., 1992) e de acordo com Haddad (1998) cerca de 60% das espécies são endêmicas. Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2009), desde 2005 foram descritas 59 novas espécies de anfíbios e diante dos números atuais, o Brasil ocupa a primeira

colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de anfíbios, seguido por Colômbia e Equador.

A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possuem os membros posteriores modificados para o salto (ORR, 1986; POUGH et al., 2008). Os anuros, com poucas exceções, apresentam fertilização externa, tendo o macho o papel de atrair a fêmea por meio da vocalização e durante o amplexo ou abraço nupcial, as cloacas são justapostas, garantindo a fertilização dos ovos. A maioria dos anuros apresentam desenvolvimento indireto, passando por um estágio larval denominado girino que é morfofisiologicamente diferentes do adulto. Esta forma contrastante entre corpo e estilo de vida pode explicar em parte a falta de pedomorfose e pedogênese em anuros (ZUG et al., 2001).

No Brasil, até o momento, foram descritas 849 espécies de anfíbios, dos quais 821 pertencem à Ordem Anura e 53 à família Leiuperidae Bonaparte, 1850 (SBH, 2009), táxon que incorpora a espécie utilizada como modelo biológico neste trabalho.

1.2. *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae)

O gênero *Eupemphix* Steindachner, 1863, removido da sinonímia de *Physalaemus* Fitzinger, 1826, por Nascimento et al. (2005), após revisão taxonômica do grupo, atualmente está inserido na família Leiuperidae Bonaparte, 1850, juntamente com outros 6 gêneros: *Edalorhina* Jiménez de la Espada, 1871; *Engystomops* Jiménez de la Espada, 1872; *Physalaemus* Fitzinger, 1826; *Pleurodema* Tschudi, 1838; *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 e *Somuncuria* Lynch, 1978. Esses gêneros foram removidos da sinonímia de Leptodactylidae Werner, 1896, por Grant et al. (2006), e apresentam centros de distribuição desde o México, América Central até o Sul da América do Sul (FROST, 2010).

A espécie *Eupemphix nattereri* (Fig. 1A) apresenta cerca de 4,5 cm de comprimento rostro cloacal, cabeça larga, focinho curto, coloração geral do dorso, com manchas acinzentadas ou castanhas sobre um fundo mais claro, glândulas inguinais ovóides bem evidentes (Fig. 1B). Apresentam comportamento de escavação, permanecendo enterrados em períodos de estiagem (CEI, 1980). A reprodução é prolongada, durante a qual os machos agregam-se e vocalizam em arenas, no interior de corpos d'água, principalmente no início da estação chuvosa (Fig. 1C). O amplexo é axilar (Fig. 1D) e os ovos são depositados em ninhos de espumas, sobre a água (Figs. 1E-F). Para a produção do ninho, o macho bate com as pernas traseiras o muco que é liberado pela fêmea juntamente com os ovos durante a desova, no momento do amplexo (BASTOS et al., 2003).

Apresentam como mecanismo de defesa secundária o comportamento deimático, que consiste em mudanças bruscas na postura: aumento da área corporal quando inflam plenamente os pulmões; o animal abaixa a cabeça, cerra as pálpebras e soergue a parte posterior do corpo, tornando salientes as glândulas inguinais brilhantes, pretas e marginadas de branco, semelhantes a ocelos e que podem ficar recobertas por uma secreção viscosa, de aspecto leitoso (SAZIMA e CARAMASCHI, 1986). O comportamento deimático pode ser interpretado como uma resposta adaptativa, das diversas populações, a diferentes pressões seletivas exercidas pelos predadores (EDMUNDS, 1974).



Figura 1. Aspectos gerais e reprodutivos de *Eupemphix nattereri*. A- Vista lateral direita de *E. nattereri*. B- Glândulas inguinais ovóides. C- Macho em comportamento de vocalização. D- Macho (superior) e fêmea em amplexo. E e F- Ovos depositados em ninhos de espumas nas margens do corpo d'água.

Há contribuições relevantes sobre a herpetologia no país (JIM, 1980; HADDAD, 1991; HADDAD e SAZIMA, 1992; GIARETTA, 1994; POMBAL Jr., 1995; MARTINS, 1996; OLIVEIRA, 1996; ROSSA-FERES, 1997; HADDAD, 1998; ZIERI, 2004; FAIVOVICH et al., 2005; OLIVEIRA, 2007), entretanto estudos da biologia estrutural relacionados com características morfológicas e sobretudo a descrição da pigmentação visceral são incipientes para a maioria dos anuros neotrópicos (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007, FRANCO-BELUSSI et al., 2009;

MORESCO e OLIVEIRA, 2009). Esse panorama enfatiza a necessidade de expandir esses conhecimentos, o que permitirá melhor entendimento sobre questões da biologia reprodutiva e da pigmentação, estabelecendo além da descrição, as relações fisiológicas e adaptativas destes organismos.

1.3. Sistema Pigmentar

Os animais ectotérmicos apresentam, espalhados pelo tegumento, células originadas da crista neural (BAGNARA 1982; SICHEL, 1997), de aspecto dendrítico, dotadas de pigmentos em seu citoplasma (OLIVEIRA e ZIERI, 2005, ASPERGREN et al., 2009), denominadas cromatóforos. Os cromatóforos são classificados em diferentes grupos, dependendo do pigmento que contêm: melanóforos (marrom-escuro ou amarelo-vermelho), xantóforos (amarelo), eritróforos (vermelho) e leucóforos / iridóforos (branco metálico). Os melanóforos, células produtoras de melanina, são os tipos mais comuns de cromatóforos e são responsáveis pela pigmentação da maioria dos vertebrados. Nas aves e mamíferos, os melanóforos são chamados de melanócitos (ASPERGREN et al., 2009).

Os vertebrados, com exceção de aves e mamíferos, podem apresentar a capacidade de adaptação cromática, influenciados pela luz, pelo ambiente e comportamento social. Tal adaptação pode atuar como mecanismo de termorregulação, proteção contra radiação, mimetismo, camuflagem e sinais comportamentais como medo ou raiva (FILADELFI et al., 2005 e BAGNARA e HADLEY, 1973).

As mudanças de cor que ocorrem no tegumento desses animais, podem ser classificadas em morfológicas, que ocorrem em todos os vertebrados, em dias ou semanas, e dependem de alterações na quantidade de pigmento ou no número de células ou fisiológicas, que ocorrem apenas nos ectotérmicos, em segundos ou horas

(HADLEY, 1996; BAGNARA, 1976). As mudanças fisiológicas dependem de mecanismos celulares de dispersão e agregação de pigmentos dentro dos cromatóforos (Fig. 2), resultando respectivamente no escurecimento ou clareamento da pele desses animais (VISCONTI e CASTRUCCI, 1993).

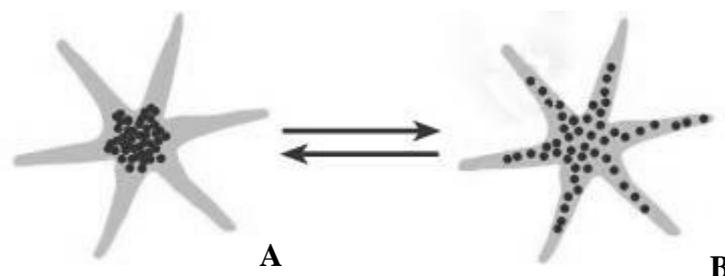


Figura 2 – Mudança de cor fisiológica resultante do deslocamento dos grânulos de melanina no interior dos melanóforos. A- grânulos de melanina agregados ao redor do núcleo, dando à célula aspecto puntiforme. B- grânulos de melanina dispersos pelo citoplasma, dando à célula aspecto dentríptico. (adaptado de Wallin, 2002).

O transporte coordenado de organelas contendo melanina, os melanossomos, pelo citoplasma das células pigmentadas, é o fator responsável pelas mudanças de cor que ocorre no tegumento dos ectotérmicos. Em peixes, a translocação intracelular dos pigmentos é controlada por hormônios e por ação direta do sistema nervoso (FUJII, 2000). Em anfíbios, a adaptação cromática está sujeita exclusivamente ao controle hormonal (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006).

A motilidade dos melanossomos ocorre de forma centrífuga ou centrípeta, pelo citoplasma das células pigmentadas, com o auxílio dos elementos do citoesqueleto como microtúbulos e filamento de actina (ALBERTS et al., 2002). Tais elementos foram observados através de eletromicrografias dos melanócitos testiculares do anuro *Eupemphix nattereri* (ZIERI et al., 2007). A dineína, proteína citoplasmática, está envolvida com a movimentação dos melanossomos pelos microtúbulos, em direção ao núcleo celular, enquanto a cinesina dispersa os grânulos através dos microtúbulos (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006). Em relação aos filamentos de actina, a

motilidade dos melanossomos está sujeita a ação da miosina não muscular, denominada miosina V, relacionada com o transporte dos melanossomos do centro para a periferia da célula (WOLFF, 1973) (Fig. 3).

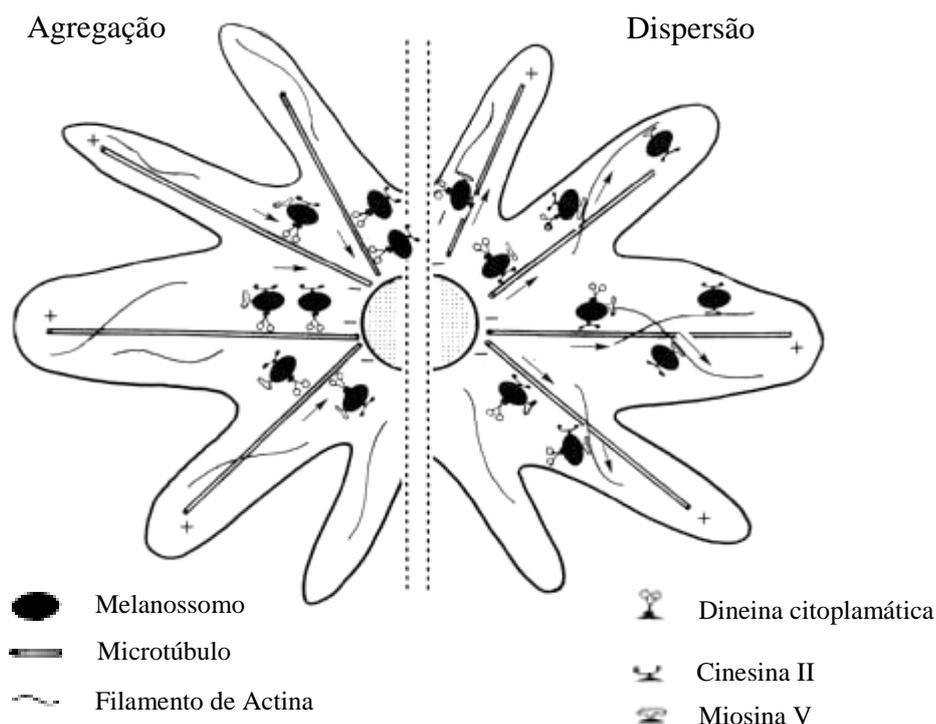


Figura 3 - Esquema ilustrando o mecanismo de translocação dos melanossomos, por ação de proteínas motoras, no interior dos melanóforos de ectotérmicos (adaptado de Bagnara e Matsumoto, 2006).

De maneira geral, alguns hormônios atuam nas células pigmentares, estimulando receptores de membrana da célula, as melanocortinas (MCR), que através de sinais químicos, interferem no comportamento da enzima adenilato ciclase, promovendo alteração na quantidade de cAMP (3', 5'- adenosina monofosfato cíclico). A diminuição nos níveis de cAMP ou aumento de íons Ca^{2+} provocam agregação dos pigmentos, enquanto a dispersão dos pigmentos são induzidas de modo antagônico (FUJII, 2000; SUGIMOTO, 2002). Hormônios como noradrenalina, melatonina e o hormônio

concentrador de melanina (MCH), promovem agregação dos pigmentos, enquanto o hormônio estimulante de melanina (MSH), noradrenalina em alguns animais e a luz, podem ser agentes dispersores de pigmento (ASPERGREN et al., 2009).

Em mamíferos, os melanócitos podem produzir dois tipos de melanina: a eumelanina (marrom ou preta) e a feomelanina (amarela ou vermelha) (ITO e WAKAMATSU, 2003), ambas derivadas da dopaquinona, que é formada quando o aminoácido tirosina é oxidado (Fig. 4). Os animais ectotérmicos não sintetizam a feomelanina (ASPERGREN et al., 2009).

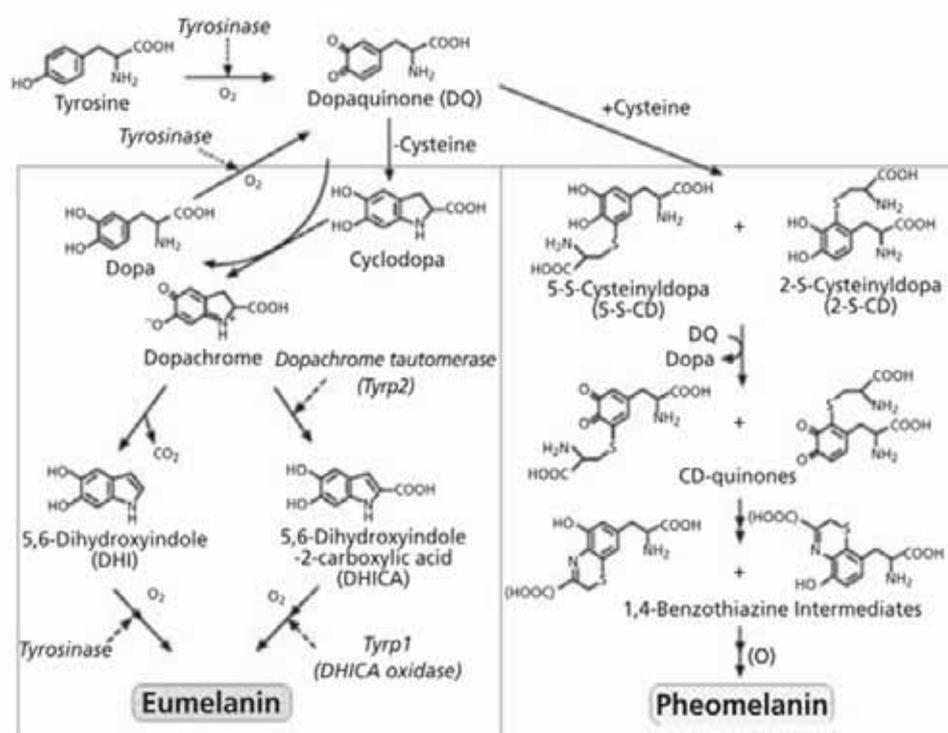


Figura 4 – Via biossintética da eumelanina e feomelanina, proteínas formadoras dos pigmentos melânicos no interior das células pigmentadas (adaptado de Bagnara e Matsumoto, 2006).

1.4. Sistema pigmentar extracutâneo

Nos vertebrados ectotérmicos, células com pigmentos melânicos são encontradas em diversos órgãos e estruturas além da pele (fígado, baço, pulmões, coração, timo, gônadas e tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos e meninges) formando um sistema pigmentar extracutâneo (GALLONE et al., 2002).

Nesses animais, tem sido descritas na epiderme e em diversos órgãos, células semelhantes à melanócitos (AGIUS e AGBEDE, 1984; ZUAST et al., 1998; ZIERI, 2004; OLIVEIRA e ZIERI, 2005; OLIVEIRA, 2007; ZIERI et al., 2007), que produzem e estocam melanina no interior de estruturas esféricas ou ovóides, os melanossomos (AGIUS e ROBERTS, 2003). Esses tipos celulares são grandes e irregulares, com o citoplasma abundante e intensamente pigmentado, mostrando-se ao microscópio estereoscópio com aspecto dendrítico, devido à presença dos melanossomos espalhados pelos prolongamentos citoplasmáticos, ou puntiforme, quando não se observa esses prolongamentos, pela ausência dessas organelas que ficam concentradas na região perinuclear (OLIVEIRA e ZIERI, 2005).

Os melanócitos viscerais, como reportado para *Eupemphix nattereri* (ZIERI et al., 2007) através da análise da ultra-estrutura testicular, apresentam o citoplasma repleto de grãos de melanina e escassez das demais organelas. Nas regiões citoplasmáticas desprovidas de grânulos de melanina, as cisternas do complexo de Golgi podem ser observadas, além de elementos do citoesqueleto, microtúbulos e filamentos de actina.

Adicionalmente aos melanócitos, observa-se em órgãos hematopoéticos (fígado, baço e os rins durante a fase embrionária) de peixes, anfíbios e répteis, a presença de células pigmentadas com atividade macrofágica conhecidas como melanomacrófagos (AGIUS, 1980; AGIUS e AGBEDE, 1984). Em anfíbios, os melanomacrófagos residentes no fígado também são conhecidos como células de Kupffer (SICHEL et al.,

1997; ZUAST et al., 1998; PRELOVSEK e BULOG, 2003) e apresentam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como melanina, hemosiderina e lipofuscina, derivados da degradação de material celular fagocitado (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRAEZ e ZAPATA, 1991).

As células de Kupffer não eram incluídas na classificação de célula pigmentar, pois acreditava-se que os macrófagos presentes no fígado apenas fagocitavam os melanossomos, e não os sintetizavam (FITZPATRICK et al., 1966). Entretanto, análises sobre a função melanogênica das células pigmentares no fígado de *Xenopus laevis* (SICHEL et al., 1997), *Rana esculenta* (SICHEL et al., 1997 e GALLONE et al., 2002) e *Proteus anguinus* (PRELOVSEK e BULOG, 2003) demonstraram que há melanogênese, e segundo Barni et al., 1999 e 2002, esta atividade de melanossíntese em *R. esculenta* pode variar de acordo com a sazonalidade.

A função das células pigmentares nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos não está bem definida e várias hipóteses têm sido propostas. Dentre elas pode-se citar funções citoprotetoras relacionadas aos radicais livres (CESARINI, 1996; RÓZANOWSKA, 1999; MCGRAW, 2005), propriedade antimicrobiana (MACKINTOSH, 2001) e processos de detoxificação por poluentes (FENOGLIO, 2005). Barni et al. (1999) demonstraram um aumento na quantidade de melanina no fígado e modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *R. esculenta* durante o inverno. Outro trabalho correlaciona a ativação da melanogênese hepática com hipóxia em salamandras (FRANGIONI et al., 2000). Cícero et al. (1977) e Kalashnikova (1992) sugeriram uma relação entre o aumento da pigmentação no fígado e a hemocaterese hepática. Com relação aos centros de melanomacrófagos em peixes, o aumento de pigmentos melânicos tem sido descritos com uma condição particular de doença (ROBERTS, 1974). Franco-Belussi (2010) relaciona resposta das células

pigmentares, melanócitos testiculares e melanomacrófagos hepáticos, ao processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS).

Para os anuros, os estudos relativos aos melanócitos viscerais e aos melanomacrófagos são recentes e se referem à poucas espécies: *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA et al., 2002 e 2003; MORESCO e OLIVEIRA 2009), *P. fuscumaculatus* (AOKI et al., 1969; ZIERI, 2004), *Eupemphix nattereri* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007, FRANCO-BELUSSI et al., 2009), *R. esculenta* (CÍCERO et al., 1989; SICHEL et al., 1997; BARNI et al., 1999; GALLONE et al., 2002; BARNI et al., 2002), *R. ridibunda* (AKULENKO, 1998) e *Xenopus laevis* (SICHEL et al., 1997; ZUAST et al., 1998).

1.5. Ação Hormonal

Outro fator de merecido destaque e ainda pouco explorado, se refere aos mecanismos fisiológicos que regulam o sistema melanogênico. A dispersão dos grãos de melanina dentro dos melanócitos responde fortemente à exposição prolongada a alta concentração de MSH - hormônio estimulante dos melanócitos (CASTRUCCI et al., 1984; HADLEY, et al., 1985; FILADELFI e CASTRUCCI, 1994; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006), peptídeo produzido na hipófise e transportado até os cromatóforos pela circulação. Nos melanóforos e eritróforos, e em alguns xantóforos, o MSH dispersa os grânulos de pigmento, promovendo alteração da cor do tegumento em vertebrados pecilotérmicos (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006). O mesmo é verificado nas células de Kupffer de *R. esculenta* (GUIDA et al., 2004), que apresentam um aumento na expressão gênica da tirosinase quando submetidas ao MSH.

Estudos com outros vertebrados demonstram que os hormônios esteróides também influenciam na pigmentação, e seus efeitos em anfíbios foi observado por

Richards (1982) e Hayes e Menendez (1999) em *Hyperolius argus*, demonstrando alteração na expressão dos cromatóforos quando empregado hormônios sexuais.

Sobre a pigmentação extracutânea, além do fígado, outro órgão de merecido destaque que se tornou alvo de estudo por apresentar pigmentação em algumas espécies de anuros são os testículos. Em Leiuperídeos, família da qual a espécie *Eupemphix nattereri* faz parte, a pigmentação testicular parece ser inerente aos integrantes do táxon, como foi observado em *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA et al., 2002 e 2003, MORESCO e OLIVEIRA, 2009), *P. fuscomaculatus* (AOKI, 1969; ZIERI, 2004), *E. nattereri* (ZIERI, 2004; OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007; FRANCO-BELUSSI, et al., 2009), *P. olfersii* e *Pseudopaludicola falcipes* (OLIVEIRA, 2007), os quais apresentam um grande número de células pigmentadas na cápsula e no interstício testicular, conferindo uma tonalidade marrom escura às gônadas.

1.6. Sistema Reprodutor Masculino

Nos vertebrados, de modo geral, os aparelhos reprodutor e urinário se originam a partir da região mesodérmica intermediária. Esse cordão de células mesodérmicas se desenvolve em túbulos pronéfricos, que são os precursores dos rins e ductos genitais (GILBERT, 2002). As gônadas, sobre influência de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais, se desenvolvem em testículos ou ovários e também em seus sistemas tubulares condutores de gametas (ROMER e PARSONS, 1985; DUELLMAN e TRUEB, 1994).

O aparelho reprodutor masculino dos anfíbios é constituído por testículos pares, ligados diretamente aos ductos arquinéfricos, que por sua vez abrem-se na cloaca transportando apenas o esperma, ou então através dos túbulos renais (mesonéfricos) e destes aos ductos arquinéfricos e cloaca, transportando urina e esperma, mantendo em

ambos os casos uma estreita relação com o aparelho urinário (ROMER e PARSONS, 1985 e ORR, 1986).

Nos anuros (Fig. 5), os testículos são arredondados, compactos, de cor geralmente esbranquiçada e podem apresentar variações anatômicas de forma e peso de acordo com o período reprodutivo (DUELLMAN e TRUEB, 1994), além de outras alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução (LOFTS, 1974) ou espécie-específicas (OLIVEIRA et al., 2002), como descrito para algumas espécies (MONTERO e PISANÓ, 1990 e 1992; HUANG et al., 1997; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998). As gônadas estão localizadas na cavidade corporal, aderidas à parede dorsal pelo mesórquio, através do qual transitam ductos eferentes que ganham os ductos arquinéfricos (ductos de Wolf) (LOFTS, 1974).

Na margem anterior dos testículos se encontram os corpos adiposos abdominais, de coloração amarelada e com muitos prolongamentos delgados. Estes corpos adiposos constituem uma característica estrutural comum a todos os anfíbios (DUELLMAN e TRUEB, 1994) e servem como uma reserva nutricional para as gônadas (FITZPATRICK et al., 1966) (Fig. 5).

Histologicamente os testículos são revestidos por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, pela qual percorrem vasos sanguíneos destinados ao estroma testicular. O tecido germinativo está arranjado em lóculos seminíferos delimitados por tecido conjuntivo frouxo, porém não se observa a presença de septos intratesticulares (OLIVEIRA e VICENTINI, 1998; OLIVEIRA et al., 2002; SANTOS e OLIVEIRA, 2008).

No parênquima testicular o tecido germinativo apresenta espermatogônias localizadas na base do epitélio e, na seqüência da citodiferenciação, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides, estes últimos geralmente são encontrados próximos ao

lúmen. Esse epitélio possui organização cística, ou seja, grupos de células germinativas associam-se às células de Sertoli constituindo espermatocistos, característica comum dos anfíbios (WAKE, 1969; LOFTS, 1974; OLIVEIRA et al., 2002 e 2003), bem como em outros anamniotas (GRIER, 1992) (Fig. 6).

Sobre a morfologia dos lóculos seminíferos e o arranjo cístico do epitélio germinativo destacamos alguns trabalhos realizados coma ordem anura: Leiuperidae: *Physalaemus fuscomaculatus* (AOKI et al., 1969), gênero *Physalaemus* (AMARAL et al., 1999a e 1999b), *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA et al., 2002) e *Eupemphix nattereri* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al. 2007 e 2008); Calyptocephalellidae: *Calyptocephalella gayi* (= *Caudiverbera caudiverbera*) (HERMOSILLA et al., 1983); Cycloramphidae: *Odontophrynus cultripes* (BÁO et al., 1991); Bombinatoridae: *Bombina bombina* (GOLLMANN et al., 1993); Bufonidae: *Rhinella ornata* (OLIVEIRA et al., 2007) e Hylidae: gênero *Dendropsophus* (SANTOS e OLIVEIRA, 2007; FRANCO-BELUSSI et al., 2010).

A espécie *E. nattereri* foi adotada como modelo biológico nesse estudo pelas características: 1- possui intensa pigmentação interna, principalmente nas gônadas, tanto na cápsula quanto no interstício; 2- dentre os animais pertencentes à família Leiuperidae encontrados durante a fase reprodutiva na região de São José do Rio Preto, SP, *E. nattereri* é uma das mais abundantes e de fácil captura porque os machos vocalizam em pequenos corpos d'água sem vegetação; 3- a espécie tem sido utilizada como modelo em várias outras pesquisas dessa temática, com estudos relativos à morfologia das células pigmentadas no fígado e nos testículos.

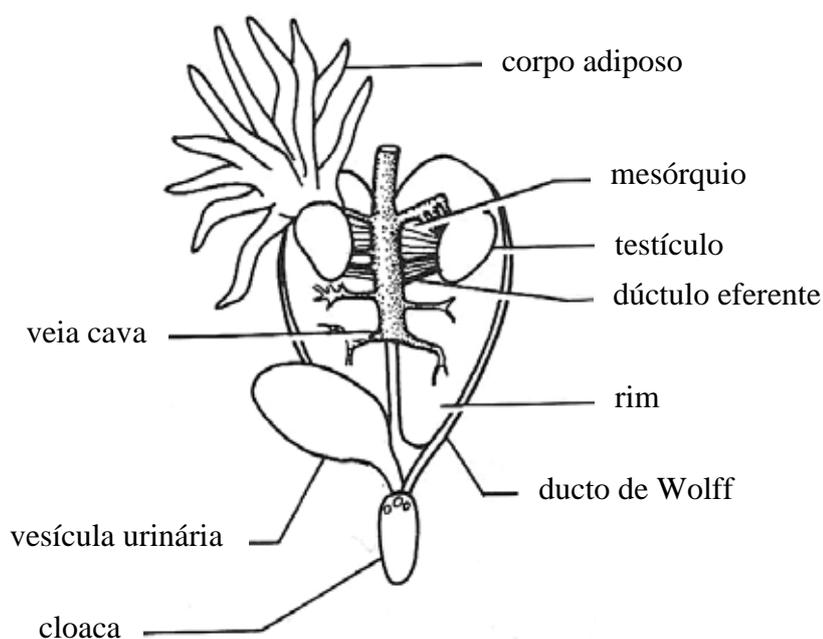


Figura 5- Desenho esquemático do aparelho urogenital masculino de anuro. (adaptado de Duellman e Trueb, 1994).

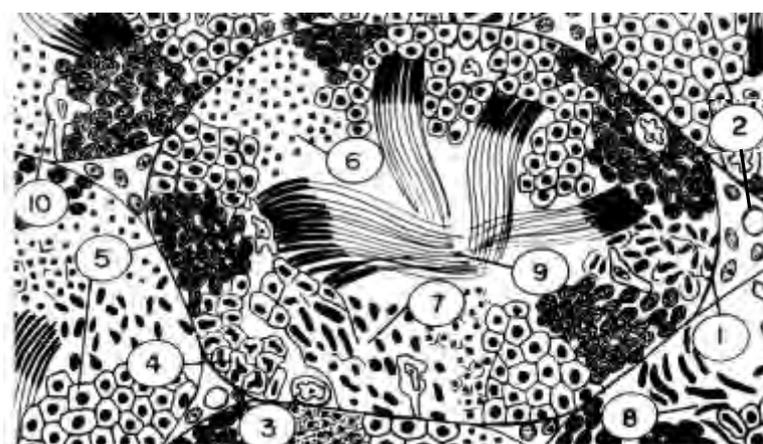


Figura 6 – Representação esquemática generalizada do epitélio germinativo cístico de anuro: parede locular (1); tecido interlocular (2); espermatogônia primária (3) e secundária (4); espermatócito primário (5) e secundário (6); espermátide primária (7) e secundária (8); feixes de espermatozoides (9) e célula de Sertoli (10) (adaptado de Oliveira et al., 2003).

1.7. Referências Bibliográficas

AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish.

Journal of Zoology. 191: 11-31.

AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of**

Fish Biology. 24(4): 471-488.

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology.** 26: 499-509.

AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). **Vestnik Zoologii.** 32(3): 49-53.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. 2002.

Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science. 1616 pp.

AMARAL, M.J.L.V.; FERNANDES, A.P.; BAO, S.N.; RECCO-PIMENTEL, S.M.

1999(a). An ultrastructural study of spermiogenesis in three species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). **Biocell.** 23(3): 211-221.

AMARAL, M.J.L.V.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; CARDOSO, A.J. 1999(b). A

comparison of the sperm nucleoprotein composition in the genus *Physalaemus* (Amphibia, Anura). **Cytobios.** 100: 147-157.

AOKI, A.; VITALE-CALPE, R.; PISANO, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift fur Zellforschung und**

Mikroskopische Anatomie. 98(1): 9-16.

ASPENGREN, S.; HEDBERG D.; SKÖLD, H.N.; WALLIN M. 2009. New Insights into Melanosome Transport in Vertebrate Pigment Cells. **International Review of**

Cell and Molecular Biology. 272: 245-302.

- BAGNARA, J.T. 1976. Color Change. In: **Physiology of the Amphibia**. New York: Academic Press. 1-52 pp.
- BAGNARA, J.T. 1982. Development of the spot pattern in the leopard frog. **Journal of Experimental Zoology**. 224:283-287.
- BAGNARA, J.T.; HADLEY, M.E. 1973. **Chromatophores and Color Change: The Comparative Physiology of Animal Pigmentation**. Prentice-Hall. 6-16 pp.
- BAGNARA J.T.; MATSUMOTO J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues p.11-59. In: **The Pigmentary System**. Oxford University Press. 2^a ed. 1229p.
- BÁO, S.N.; DALTON, G.C.; OLIVEIRA, S.F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. **Journal of Morphology**. 207(3): 303-314.
- BARNI, S.; BERTONE, V.; CROCE, A.C.; BOTTIROLI, G.; BERNINI, F.; GERZELI, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. **Journal of Anatomy**. 195: 19-25.
- BARNI, S.; VACCARONE, R.; BERTONE, V.; FRASCHINI, A.; BERNINI, F.; FENOGLIO, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. **Journal of Anatomy**. 200: 185-194.
- BASTOS, R.P.; MOTTA, J.A. O.; LIMA, L.P.; GUIMARÃES, L.D. **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, estado de Goiás**. 1^a edição. Goiânia. 2003. 82p.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. 1995. Declive de las poblaciones de Anfíbios. **Investigación e Ciencia**. 8-13p.

- CASTRUCCI, A.M.L.; HADDLEY, M.E.; HRUBY, V.J. 1984. Melanotropin Bioassays: In vitro and in vivo comparisons. **General and Comparative Endocrinology**. 55: 104-111.
- CEI, J.M. 1980. **Amphibians of Argentina**. Monitore Zoologico Italiano. Firenze. Monografia. 2: 609p.
- CESARINI, J.P. 1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. **Advances in Space Research**. 18 (12): 35-40.
- CICERO R, SCALIA M, SINATRA F, ZAPPALA C. 1977. Changes in the melanin content in the Kupffer cells of *Rana esculenta* L. induced by parenteral administration of heme. **Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale**. 53: 764-769.
- CICERO, R.; MALLARDI, A.; MAIDA, I.; GALLONE, A.; PINTUCCI, G. 1989. Melanogenesis in the pigment cells of *Rana esculenta* L. liver: evidence for tyrosinase like activity in the melanosome protein fraction. **Pigment Cell Research**. 2: 100-108.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibia**. McGraw-Hill Book Company, New York. 670p.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. 1999. **Biology of Amphibia**. McGraw-Hill Book Company, New York. 670p.
- EDMUNDS, M. 1974. **Defense in Animals**. New York: Longman.
- FAIVOVICH, J.N.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; FROST, D.R.; CAMPBELL, J.A.; WHEELER, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. New York. (294): 240p.

- FEIO, R.N.; BRAGA, U.M.L.; WIEDERHECKER, H.; SANTOS, P. S. 1998. **Anfíbios do Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais)**. Viçosa: UFV, IEF, 32p.
- FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA M.; GANDINI C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G.; BARNI, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 60: 259–268.
- FILADELFI A.M.C.; CASTRUCCI A.M.D. 1994. Melatonin desensitizing effects on the in-vitro responses to MCH, Alpha-MSH, Isoproterenol and melatonin in pigment-cells of a fish (*S. marmoratus*), a toad (*B. ictericus*), a frog (*R. pipiens*), and a lizard (*A. carolinensis*), exposed to varying photoperiodic regimens. **Comparative biochemistry and Physiology A-Physiology**. 109(4): 1027-1037.
- FILADELFI A.M.C.; VIEIRA, A.; LOUZADA, M.L. 2005. Circadian rhythm of physiological color change in the amphibian *Bufo ictericus* under different photoperiods. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 142: 370-375.
- FITZPATRICK, T.B.; QUEVEDO, W.C.JR.; LEVENE, A.L.; MCGORVEN, V.J.; MISHIMA, Y.; OETTLE, A.G. 1966. Terminology of vertebrate melanin-containing cell. **Science**. 52: 88-89.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L. R. S.; MORESCO, R. M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. **Anatomical Record -Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**. 292: 178-182.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger**. (In press).

- FRANGIONI G, BORGIOLI G, BIANCHE S, PILLOZZI S. 2000. Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*. **Journal of Experimental Zoology**. 287: 120-127.
- FROST, D.R. 2010. **Amphibian Species of the World**: an online reference. Version 5.4 (8 April, 2010). <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>.
- FUJII, R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Research**. 13: 300-319.
- GALLONE, A; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CÍCERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. 15: 32-40.
- GIARETTA, A.A. 1994. **Utilização de recursos e potencial reprodutivo dos leptodactilídeos (Amphibia-Anura) de uma floresta semidecídua de altitude no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- GILBERT, S.F. 2002. **Biologia do desenvolvimento**. FUNPEC. Ribeirão Preto. 563p.
- GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GAGLIAROD, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; MEANS, D.B.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E.; WHEELER, W.C. 2006. Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletim of the American Museum of Natural History**. p. 299-362.
- GUIDA, G.; ZANNA P.; GALLONE A.; ARGENZIO E.; CICERO R. 2004. Melanogenic Response of the Kupffer Cells of *Rana Esculenta* L. to Melanocyte Stimulating Hormone. **Pigment Cell Research**. 17: 128–134.
- GRIER, H.J. 1992. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **Journal of Experimental Zoology**. 261(2):151-160.

- GOLLMANN, G., BORKIN, L. J., ROTH, P. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). **Zoologische Jahrbuecher Abteilung Fuer Systematik Oekologie und Geographie Der Tiere.** 120: 129-136.
- HADDAD, C.F.B. 1991. **Ecologia reprodutiva de uma comunidade de anfíbios anuros na Serra do Japi, Sudeste do Brasil.** Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- HADDAD, C.F.B. 1998. Biodiversidade dos anfíbios no Estado de São Paulo. *In:* JOLY, C.A. & BICUDO, C.E.M. (Org.) **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 6: Vertebrados.** São Paulo: FAPESP, 15-26p.
- HADDAD, C.F.B.; SAZIMA, I. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi. *In:* Morellato, L.P.C. (Org). **História Natural da Serra do Japi.** Campinas: Editora UNICAMP/FAPESP. 3: 188-211.
- HADLEY M.E, 1996. **Endocrinology.** Prentice Hall Inc., London.
- HADLEY M.E.; MIEYR J.H.; MARTIN B.E.; CASTRUCCI A.M.L. 1985. [Nle⁴, D-Phe⁷]-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate chromatophores. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology.** 81 (1): 1-6.
- HAYES, T.B.; MENENDEZ, K.P. 1999. The Effect of Sex Steroids on Primary and Secondary Sex Differentiation in the Sexually Dichromatic Reedfrog (*Hyperolius argus*: Hyperolidae) from the Arabuko Sokoke Forest of Kenya. **General and Comparative Endocrinology.** 115: 188-199.

- HERMOSILLA, I.B., URBINA, A.P., CABRERA, J.C.P. 1983. Espermatoxénese en la rana Chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linneu, 1758) (Anura, Leptodactylidae). **Bolletim de la Sociedad de Biología de Concepción**. Concepción. 54: 103-115.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. **European Journal of Morphology**. 29(2): 89-102.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 700p.
- HUANG, W.S., LIN, J.Y., YU, J.Y.L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. **Zoological Science**. 14(3): 497-503.
- ITO, S. WAKAMATSU, K. 2003. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment Cell Research**. 16(5): 523-31.
- JIM, J. 1980. **Aspectos ecológicos dos anfíbios na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 332p.
- KALASHNIKOVA MM. 1992. Erythrophagocytosis and pigment cells of the amphibian liver. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. 113: 82-84.
- LINZEY, D. 2001. **Vertebrate Biology**. McGraw-Hill, New York. 1ª ed. 596p.
- LOFTS, B. 1974. Reproduction. In: Physiology of the amphibia. **Academic Press**. New York. 2: 107-218.
- MARTINS, I.A. 1996. **Biologia Reprodutiva de *Leptodactylus podicipinus* (Cope, 1862) (Anura, Leptodactylidae) na Região Noroeste do Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

- MACKINTOSH, J.A. 2001. The Antimicrobial Properties of Melanocytes, Melanosomes and Melanin and the Evolution of Black Skin. **Journal of Theoretical Biology**. 211: 101-113.
- MCGRAW, K.J. 2005. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? **Review Animal Behavior**. 69: 757-764.
- MITTERMEIER, R.A.; WERNER, T.; AYRES, J.M.; FONSECA, G.A.B. 1992. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**. 14 (81): 20-27.
- MONTERO, R.; PISANÓ, A. 1990. Ciclo espermatogénico de los especies de *Telmatobius* del noroeste argentino. **Amphibia-Reptilia**. 11: 97-110.
- MONTERO, R., PISANÓ, Y.A. 1992. El ciclo espermatogénico anual de *Hyla pulchella andina*: un análisis numérico. **Acta Zoologica Lilloana**. 41: 173-180.
- MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. **South American Journal of Herpetology**. 4(1): 1-8.
- NASCIMENTO, L.B., CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G. 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-De-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**. 63(2): 297-320.
- OLIVEIRA, C. 1996. **Estudo morfológico do testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 131p.

- OLIVEIRA, C. 2007. Tese (Livre Docência). **Anatomia do Aparelho Reprodutor e Sistema Pigmentar Extracutâneo em anuros**. 151f. Universidade Estadual Paulista.
- OLIVEIRA, C., VICENTINI, C.A. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**. 6(1): 79-88.
- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. 20(3): 263-268.
- OLIVEIRA, C.; SANTANNA, A.C.; OMENA, P.M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**. 11(1): 39-46.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22(2): 454-460.
- OLIVEIRA, C.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2007. Variações anatômicas no aparelho reprodutor masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). **Biota Neotropica**. 7(1): 43-48.
- ORR, R.T. 1986. **Biologia dos vertebrados**. 5ª ed. São Paulo: Roca. 508p.
- POMBAL JR., J.P. 1995. **Reprodução em um agregado interespecífico de anuros (Amphibia) em uma poça permanente, na Serra de Paranapiacaba, SP**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. 2008. **A vida dos vertebrados**. 4 ed.. Atheneu, São Paulo. 699p.

- PRELOVISEK, P.; BULOG, B. 2003. Biogenesis of melanosomes in kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). **Pigment Cell Research**. 16: 345-350.
- RABB, G.B. 1990. Declining amphibian population. **Species**. (13-14): 33-34.
- RICHARDS, C.M. 1982. The alteration of chromatophore expression by sex hormones in the Kenyan reed frog, *Hyperolius viridiflavus*. **General Comparative Endocrinology**. 46: 58-67.
- ROBERTS, R.J. 1974. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: Ribelin WR, Mikagi G. **Anatomic Pathology of Teleost Fish**. Madison: University of Wisconsin press. 339-342p.
- ROMER, A.S., PARSONS, T.S. 1985. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 559p.
- ROSSA-FERES, D.C. 1997. **Ecologia de uma comunidade de anfíbios anuros da região Noroeste do Estado de São Paulo: microhabitat, sazonalidade, dieta e nicho multidimensional**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 178p.
- RÓZANOWSKA, M.; SARNA, T.; LAND, E.J.; TRUSCOTT, T.G. 1999. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. **Free radical biology & medicine**. 26(5-6): 518-25.
- SANTOS, S.L.R.; OLIVEIRA, C. 2008. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Micron**. 39(8): 1266-1270.
- SAZIMA, I; CARAMASCHI, U. 1986. Descrição do comportamento de *Physalaemus deimaticus*, e observações sobre comportamento deimático em *P. nattereri* (Steindachner.) – Anura, Leptodactylidae. **Revista de Biologia**. 13:91-101.

- SBH. 2009. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. **Sociedade Brasileira de Herpetologia** (SBH): <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>. (Acesso em Janeiro de 2010).
- SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**. 10: 271-287.
- SUGIMOTO, M. 2002. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology. **Microscopy Research and Technique**. 58: 496-503.
- VISCONTI., M.A.; CASTRUCCI, A.M.L. 1993. Melanotropin receptors in the cartilaginous fish, *Potamotrygon reticulatus*, and in the lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. 106(2): 523-528.
- VITT, L.J.; CALDWELL, J.P.; WILBUR, H.M.; SMITH, D.C. 1990. Amphibians as Harbingers of Decay. **Bioscience**. 40: 418.
- WAKE, M.H. 1969. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. **Journal of Morphology**. 126(3): 291-331.
- WEYGOLDT, P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. 243: 249-155.
- WOLFF, K. 1973. Melanocyte-keratinocyte interactions in vivo: the fate of melanosomes. Yale. **Journal of Biology and Medicine**. 46:384-396.
- ZIERI, R. 2004. **Sistema pigmentar extracutâneo e morfologia testicular em anuro (*Physalaemus nattereri* e *Physalaemus fuscomaculatus*)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 86p.

-
- ZIERI, R.; TABOGA S.R.; OLIVEIRA C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Stereological, and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. 290: 795–800.
- ZIERI, R.; TABOGA S.R.; OLIVEIRA C. 2008. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Aspectos ultra-estruturais. 2008. **Iheringia. Série Zoologia**. 98(2):193-199.
- ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C; FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology**. 61(4): 305-316.
- ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J. P. 2001. **Herpetology**: An introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Second edition, academic press. San diego, California.

1.8. Objetivos

Perante a escassez de estudos morfológicos e funcionais relacionados ao sistema pigmentar extracutâneo de anuros, foram realizados trabalhos cujos objetivos específicos foram:

- 1) Avaliar o efeito dos esteróides cipionato de testosterona, 17- β estradiol e do α -MSH sobre os melanomacrófagos do fígado no anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica e ultraestrutural.
- 2) Efeito dos esteróides cipionato de testosterona, 17 β -estradiol e do α -MSH sobre os melanócitos testiculares do anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica e ultraestrutural.
- 3) Caracterização da via intratesticular de condução de gametas do anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica e ultraestrutural.

Efeitos de curto e médio prazo da administração exógena de esteróides sexuais e do α -MSH sobre as células de Kupffer de *Eupemphix nattereri* (Anura): estudos histológicos e ultraestruturais

Capítulo 1

Efeitos de curto e médio prazo da administração exógena de esteróides sexuais e do α -MSH sobre as células de Kupffer de *Eupemphix nattereri* (Anura): estudos histológicos e ultraestruturais

Rodrigo Zieri¹

Lilian Franco-Belussi¹

Lia Raquel de Souza Santos¹

Sebastião Roberto Taboga²

Classius de Oliveira²

¹Curso de Pós graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP.

²Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP.

Endereço para correspondência:

Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP:15040-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Fax: (55-17) 3221- 2390. E-mail: rodrigozieri@gmail.com / classius@ibilce.unesp.br

Resumo: Este trabalho avaliou o efeito dos hormônios cipionato de testosterona, 17 β -estradiol e α -MSH (Hormônio estimulante de melanócito) sobre a pigmentação hepática do anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica e ultraestrutural. Foram coletados 60 machos adultos, na região de São José do Rio Preto, SP. Após os tratamentos com os esteróides e com α -MSH, os animais foram submetidos às análises morfológicas. No tecido hepático foi encontrado células de Kupffer, contendo inclusões citoplasmáticas e melanossomos. Para o grupo tratado com cipionato de testosterona foi observado um aumento de aproximadamente 2x na área pigmentada ocupada pelas células pigmentadas no fígado, quando comparados o tratamento e o controle. Para o mesmo tratamento, foi observado aumento de 1,8x no fígado dos animais eutanasiados após 15 dias. Os animais tratados com 17- β -estradiol e α -MSH não apresentaram diferenças na pigmentação hepática.

Palavras-Chave: Anura, melanomacrófago, testosterona, estradiol, α -MSH, melanina.

Abstract: The present study aimed to characterize morphological and stereological patterns of pigmented cells in liver of *Eupemphix nattereri* under effect of testosterone cypionate, 17 β -estradiol and α -MSH. Morphological studies with light and transmission electron microscopy were carried out in the groups. In the hepatic tissue were found Kupffer cells, which are characterized by multivesicle bodies in the cytoplasm and large amount of melanosomes. For the groups treated with testosterone cypionate an increase of approximately 2x in the occupied area by the pigmented cells in the liver was observed in the treatment group against the control. Moreover, for the same treatment an increase of approximately 1,8x was observed in the liver of animals euthanized after 15 days when compared to those euthanized after 24 hours.

Keywords: Anuran, melanomacrophages, testosterone, estradiol, α -MSH, melanin.

INTRODUÇÃO

Os vertebrados ectotérmicos apresentam um notável sistema formado por células pigmentadas, localizadas em diversos órgãos e estruturas além do tegumento (GALLONE et al., 2002; GUIDA et al., 2004; ZIERI et al., 2007; MORESCO e OLIVEIRA, 2009 e FRANCO-BELUSSI et al., 2009).

Em peixes, anfíbios e répteis, tem sido descritas em órgão com função hematopoética, células com atividade macrofágica e que apresentam atividade melanogênica, os melanomacrófagos (CHRISTIANSEN et al., 1996; SICHEL et al., 1997; PRELOVSEK e BULOG, 2003 e GUIDA et al., 2004).

Os melanomacrófagos hepáticos, denominados células de Kupffer em anfíbios e répteis ou centros de melanomacrófagos em peixes, são dotados de diversos grânulos citoplasmáticos, que podem indicar a presença de diferentes substâncias químicas como hemosiderina, lipofuscina e grânulos escuros com propriedades histoquímicas e ultraestruturais semelhantes à melanina (AGIUS e AGBEDE, 1984; ZUAST et al, 1990; HERRAEZ e ZAPATA, 1991; SICHEL, 1997; GUIDA 2004).

Estudos sobre a função melanogênica das células de Kupffer comprovam a atividade melanossintética no fígado de *Xenopus laevis* (SICHEL et al., 1997), *Rana esculenta* (SICHEL et al., 1997 e GALLONE et al., 2002) e *Proteus anguinus* (PRELOVSEK e BULOG, 2003), podendo variar de acordo com a sazonalidade (BARNI et al., 1999 e 2002) ou em resposta ao análogo sintético do α -MSH (hormônio estimulante de melanócito) que promove aumento da expressão gênica da tirosinase e da atividade da dopa oxidase (GUIDA et al., 2004).

De maneira geral os hormônios atuam nas células pigmentares promovendo a dispersão ou agregação dos grânulos de pigmentos, ocasionando uma mudança de cor

fisiológica, ou aumentando o número de células ou a quantidade de pigmentos em seu interior, provendo uma mudança de cor morfológica (BAGNARA, 1976). Alguns trabalhos mostram que a dispersão dos grãos de melanina dentro de células pigmentadas é fortemente influenciada pela exposição prolongada à alta concentração de MSH (CASTRUCCI et al., 1984; HADLEY, et al., 1985; FILADELFI e CASTRUCCI, 1994; GUIDA et al., 2004; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006). Efeitos dos hormônios esteróides na pigmentação em anfíbios foi observado por Richards (1982) e Hayes e Menendez (1999) em *Hyperolius argus*, demonstrando alteração na expressão dos cromatóforos quando empregado hormônios sexuais.

Poucos e recentes estudos abordam o sistema pigmentar extracutâneo em anfíbios anuros como reportado para *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA et al., 2002; 2003; MORESCO e OLIVEIRA, 2009), *P. fuscomaculatus* (AOKI et al., 1969), *E. nattereri* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007; FRANCO-BELUSSI et al., 2009), *Rana esculenta* (CICERO et al., 1989; SICHEL et al., 1997; BARNI et al., 1999, 2002; GALLONE et al., 2002), *Rana ridibunda* (AKULENKO, 1998), *Xenopus laevis* (SICHEL et al., 1997; ZUASTI et al., 1998) e gênero *Dendropsophus* (FRANCO-BELUSSI et al., 2010). Este trabalho avaliou o efeito dos esteroides ciproionato de testosterona e 17- β estradiol e do α -MSH sobre os melanomacrófagos do fígado no anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica, estereoscópica e ultraestrutural.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto, SP, em atividade reprodutiva, nas estações chuvosas de 2008 e 2009 (Licença

IBAMA: 14731-1). Os exemplares foram aclimatados durante 7 dias, em terrários individuais, no Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, SP. A manipulação e os experimentos foram feitos de acordo com o procedimento da Universidade Estadual Paulista (UNESP) seguindo o guia de cuidados e uso de animais de laboratório.

Tratamento hormonal

Para o uso dos hormônios esteróides, os animais coletados na estação chuvosa de 2008, receberam injeções subcutâneas de cipionato de testosterona, dissolvido em óleo vegetal e aplicado a cada 48h por sete dias. Na análise de curto prazo da condição hiperandrogênica, cinco exemplares foram sacrificados 24h após a aplicação do hormônio e outros cinco, para análise de médio prazo, no décimo quinto dia. Outro grupo de dez exemplares foi tratado com injeções subcutâneas de 17 β -estradiol (Sigma) dissolvido em óleo vegetal e aplicado a cada 48h por sete dias, nos quais cinco foram sacrificados 24h após a aplicação do hormônio e outros cinco no décimo quinto dia. Para o grupo controle (10 animais para cada tratamento), foram utilizadas injeções subcutâneas somente com óleo vegetal, sendo cinco sacrificados 24h após a última aplicação e o restante no décimo quinto dia.

Para uso do hormônio estimulante de melanina, os animais coletados na estação chuvosa de 2009, receberam injeções subcutâneas de α -MSH dissolvido em PBS e aplicado a cada 48h por sete dias. Para cada espécime, foram utilizados 10 exemplares, nos quais cinco foram sacrificados 24h após a aplicação do hormônio e outros cinco no décimo quinto dia. No grupo controle (10 animais) foram aplicadas injeções subcutâneas contendo apenas PBS. Cinco animais foram sacrificados para análise de curto prazo com 24h e o restante, sacrificados no décimo quinto dia a partir da última aplicação.

Para o uso dos hormônios esteróides, cipionato de testosterona e 17 β -estradiol (Sigma), foi administrado uma dosagem de 0,5 mg/Kg corporal dissolvido em 0,05 ml de óleo vegetal (SANTOS, 2006). Para o α -MSH foi administrado $2,5 \times 10^{-7}$ mmol/10g de α -MSH (Sigma), dissolvido em 0,05 ml de PBS (adaptado de HADLEY et al. 1985).

Coleta e processamento do material biológico

Os animais foram pesados e submetidos a medida do comprimento rostro-caudal. Então foram dissecados por meio de incisão mediana na região ventral, expondo os órgãos. Após esse procedimento, o fígado foi removido, pesado e imediatamente imerso em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%) e encaminhado à rotina histológica (RIBEIRO e LIMA, 2000) para serem desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (Leica-historesin embedding kit). Secções de 3 μ m foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observação em microscopia de luz.

Amostras para observações em microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas durante 2h a 25°C em glutaraldeído 3% e ácido tânico 0.25% pH 7.3 em tampão Millonig. Após lavagem no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas durante 1h em tetróxido de ósmio 1% diluído no mesmo tampão, desidratadas em acetona e incluídas em araldite (COTTA-PEREIRA et al., 1976). Secções ultrafinas (50-75 nm) foram obtidas usando navalha de diamante e coradas com acetato de uranila 2% por 20 minutos (WATSON, 1958) e citrato de chumbo em solução de hidróxido de sódio 1N (VENABLE e COGGESHALL, 1965) durante 8 minutos, e examinados com microscópio eletrônico Leo-Zeiss EM – 906 operando a 80 kV.

Análise morfométrica

Para as análises estereológicas, cortes corados com hematoxilina-eosina foram observados em microscópio Leica DM 4000B. Para cada animal, 25 campos foram

observados, utilizando o software de análise de imagem (Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.) baseando-se na diferença de intensidade de coloração para quantificar a área ocupada pelas células pigmentadas. Para análise dos dados foram identificados *outliers* e posteriormente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos foi realizada análise de variância Two Way – ANOVA. Quando os dados foram não paramétricos, foi realizada a transformação com a utilização de logaritmo, tornando-os paramétricos (ZAR, 1999). Foi utilizado teste de regressão linear para correlacionar o índice hepatossomático (IHS) e o índice gonadossomático (IGS) com a área pigmentada do fígado e testículo, respectivamente.

RESULTADOS

O anuro *Eupemphix nattereri* apresenta comprimento rostro-cloacal de 4,31cm \pm 0,32, medida tomada pelas extremidades anterior até a posterior do animal, e peso de 7,53g \pm 1,08, apresentando o fígado como órgão de grande volume, quando comparado aos demais órgãos, com peso de 0,179g \pm 0,028.

O fígado de *E. nattereri* é constituído por três lobos, apresenta forma irregular e cor vermelha intensa quando analisado *in vivo* devido à grande vascularização nesse tecido. O órgão está disposto anteriormente na cavidade abdominal, estende-se até o terço posterior, sobrepondo a maioria dos órgãos da cavidade.

Anatomicamente, o fígado é formado pelos lobos direito, médio e esquerdo, sendo esses últimos maiores e parcialmente unidos no terço inicial. Entre os lobos direito e médio, está localizada a vesícula biliar, estrutura volumosa e esférica, apresentando-se com uma coloração verde escura, vista por transparência através de sua parede delgada (Fig. 1A).

O órgão mantém sintopia com o coração em sua borda cranial, com os pulmões em suas bordas laterais e face visceral. Está posteriormente relacionado ao estômago, intestino, testículos e corpos adiposos com diferentes condições em razão dos estados funcionais destes órgãos (Fig. 1A).

No parênquima do fígado, quando analisado em secção longitudinal, observa-se fileiras duplas de hepatócitos dispostos em arranjo cordonal, entre os quais são observados uma grande quantidade de vasos sanguíneos intimamente associados às células hepáticas, os sinusóides hepáticos, espalhados pelo tecido e de diâmetro variável, com eritrócitos em seu interior (Fig. 1B). No tecido hepático também há células do sistema imunológico, os melanomacrófagos, que apresentam em seu citoplasma grande quantidade de inclusões de pigmento (Fig. 1B e 1C). Estas células também denominadas células de Kupffer, mantém íntimo contato com as células hepáticas e com os sinusóides (Figs. 1B, D e E).

Os hepatócitos são células de formato poliédrico, com núcleo esférico e centralmente localizado, ocupando grande volume celular. Na região central do núcleo observa-se a presença de um único nucléolo esférico e bem evidente (Figs. 1D e E) e no citoplasma são observados, por meio de eletromicrografia, grande quantidade de mitocôndrias, cisternas do Golgi e retículo endoplasmático liso bem desenvolvidos, além de grande quantidade de glicogênio. Também se observa canalículos biliares, com a superfície revestida por microvilos curtos, os quais se projetam para o lúmen. Junto aos canalículos visualiza-se uma confluência de hepatócitos e a presença de junções celulares, os desmosomos (Fig. 1F).

No tecido hepático foram encontrados dois diferentes tipos de células fagocitárias. Uma delas (Fig. 1G), possui aspecto volumoso, dotadas de pseudópodes, núcleo grande e central com cromatina frouxa, contendo inclusões citoplasmáticas. O

outro tipo celular é aparentemente maior que o primeiro descrito, apresentando o citoplasma com inúmeras vesículas, o que confere à célula uma coloração marrom escura quando observada em microscopia de luz (Figs. 1C e D). A análise da ultraestrutura permite observar uma grande quantidade de pigmentos melânicos no interior de corpúsculos elétron-densos, formando os grânulos de melanina ou melanossomos, em vários graus de melanização (Figs. 1H e I), além de outros corpos de inclusão como vesículas grandes e irregulares contendo lipofuscina e vesículas lisossômicas, típica dos macrófagos.

Foi observada diferença na área ocupada pelos melanomacrófagos no fígado de *E. nattereri* entre os controles e os tratamentos nos animais tratados com cipionato de testosterona, no qual o grupo tratado obteve um aumento da área pigmentada de aproximadamente 1,96 vezes em relação à área pigmentada do grupo controle ($F_{1,12} = 6,395$; $p = 0.026$). Quando os tratamentos são comparados, observa-se um aumento na área pigmentada do grupo com recuperação de médio prazo de 1,82 vezes em relação ao grupo com recuperação de curto prazo ($F_{1,12} = 6,395$; $p = 0.049$) (Figs. 2A, B e 3).

Os animais tratados com 17β -estradiol ($F_{1,16} = 0,07$; $p = 0,794$) e α -MSH ($F_{1,15} = 0,003$; $p = 0,959$) não apresentaram diferenças na pigmentação do órgão quando comparados aos grupos submetidos aos tratamentos hormonais e seus respectivos controles, levando em conta os tempos de recuperação de cada tratamento, obtendo as seguintes médias para 17β -estradiol: $0,0173\mu\text{m} \pm 0,0075$ para o controle com recuperação imediata, $0,0183\mu\text{m} \pm 0,0127$ para o controle com recuperação lenta, $0,0043\mu\text{m} \pm 0,0009$ para tratamento com recuperação imediata e $0,0148\mu\text{m} \pm 0,0060$ para o tratamento com recuperação lenta. As médias para o α -MSH foram: $0,0581\mu\text{m} \pm 0,0405$ para controle com recuperação imediata, $0,0699\mu\text{m} \pm 0,0529$ para controle com

recuperação lenta, $0,0767\mu\text{m} \pm 0,0583$ para tratamento com recuperação imediata e $0,0909\mu\text{m} \pm 0,0414$ para tratamento com recuperação lenta.

No entanto, o fígado apresentou um aumento significativo no índice hepatossomático (IHS) nos animais tratados com 17β -estradiol com recuperação imediata de aproximadamente 1,3x em relação ao tratamento com recuperação lenta e em relação aos grupos controles, com as seguintes médias: IHS = $0,0220 \pm 0,0038$ para o controle com recuperação imediata, IHS = $0,0256 \pm 0,0043$ para o controle com recuperação lenta, IHS = $0,0320 \pm 0,0041$ para o tratamento com recuperação imediata e IHS = $0,0240 \pm 0,0035$ para tratamento com recuperação lenta. No tratamento com 17β -estradiol também foi verificado, utilizando o índice de regressão linear, uma correlação negativa entre o IHS e a área ocupada pelas células pigmentadas no fígado ($R = -0,64$; $R^2 = 0,42$; $F_{1,17}=12,1$; $P=0,003$).

DISCUSSÃO

O fígado do *Eupemphix nattereri* está localizado na região anterior da cavidade abdominal, em íntima associação com os demais órgãos da cavidade. Apresenta-se dividido em três lobos hepáticos, não ocorrendo subdivisão do parênquima hepático em lóbulos, semelhante ao observado para alguns teleósteos (BRUSLÉ e ANADON, 1996; BOMBONATO et al. 2007).

O arranjo dos hepatócitos nessa espécie, em secção longitudinal do fígado, é do tipo cordonal duplo, onde é observada a presença de duas camadas de células (FRANCO-BELUSSI et al., 2010). Esse arranjo em camada dupla de células é relatado para alguns peixes (BRUSLÉ e ANADON, 1996) e répteis (MOURA et al., 2009), em contraste ao observado nos mamíferos onde há predomínio de uma camada celular única (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

Estudos sobre a morfologia de órgãos hematopoiéticos de peixes descrevem a presença de células pigmentadas, com atividade macrofágica, conhecidas como melanomacrófagos (AGIUS, 1980; AGIUS e AGBEDE, 1984; ZUAST et al., 1990; AGIUS e ROBERTS, 2003; JORDANOVA et al., 2008). Estas células, também residentes no fígado de anfíbios (SICHEL et al., 1997; ZUAST, 1998; PRELOVSEK e BULOG, 2003) e répteis (CHRISTIANSEN et al., 1996; RUND et al., 1998; JOHNSON et al., 1999) são conhecidas como células de Kupffer, e apresentam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como melanina, lipofuscina e hemosiderina, derivados da degradação de material celular fagocitado (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRAEZ e ZAPATA, 1991; AGIUS e ROBERTS, 2003; FRANCO-BELUSSI et al., 2010).

As células de Kupffer, também designadas macrófagos pigmentados, apresentam morfologia típica, que garante sua distinção frente as demais células hepáticas. Segundo Corsaro et al., 2000, a presença de atividade enzimática, tais como esterases não específicas e peroxidases endógenas e ainda a habilidade fagocítica são características que reforçam a classificação dessas células como macrófagos, similar aos encontrados nos mamíferos, sendo incluídas no sistema mononuclear fagocitário.

Como tem sido demonstrado em animais ectotérmicos, agrupamentos de células pigmentadas estão presentes no fígado, localizadas principalmente na área portal (CORSARO et al., 2000), e a presença de pigmentos melânicos no interior dessas células depende principalmente da sua habilidade de sintetizar e armazenar melanina no interior dos melanosomos, e uma pequena parte é derivada da fagocitose de melanosomos de outras células pigmentadas (ZUAST et al. 1989; SICHEL et al., 1997).

Além dos grânulos de melanina, foi observada a presença de outras inclusões no citoplasma das células de Kupffer de *E. nattereri* como lipofuscina e hemosiderina, que possivelmente são resultantes da oxidação de ácidos graxos e da degradação de hemácias respectivamente, como proposto para outras espécies (AGIUS e ROBERTS, 2003; FRANCO-BELUSSI et al., 2010), sendo fortes indicadores de atividade fagocitária.

Outras semelhanças entre os melanomacrófagos de anfíbios e as células de Kupffer de mamíferos foram demonstradas através de características histológicas e histoquímicas em *Rana esculenta*, *Xenopus laevis*, *Triturus cristatus* e *Ambystoma mexicanum* (CORSARO et al. 2000), que também identificou dois principais tipos de células de Kupffer no fígado desses animais, as pequenas e grandes células de Kupffer, com morfologia e quantidade de pigmentos distintos, apresentando as pequenas células uma menor quantidade de pigmentos e a superfície celular menos regular quando comparadas às grandes células de Kupffer. Esses dois tipos celulares também foram identificados no tecido hepático de *E. nattereri*.

Análises sobre a função melanogênica das células pigmentares no fígado de *Xenopus laevis* (SICHEL et al., 1997), *Rana esculenta* (SICHEL et al., 1997 e GALLONE et al., 2002) e *Proteus anguinus* (PRELOVSEK e BULOG, 2003), demonstraram que há melanogênese e esta atividade pode variar de acordo com a sazonalidade, como demonstrado em *R. esculenta* (BARNI et al., 1999 e 2002) e temperatura, como demonstrado em *E. nattereri* (SANTOS, 2010).

Estudos sobre mudanças na coloração de vertebrados tem sido investigados, principalmente em relação a pigmentação dos cromatóforos cutâneos, submetidos a tratamentos com melanotropinas (CASTRUCCI et al., 1984; HADLEY, et al., 1985; FILADELFI e CASTRUCCI, 1994; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006), nos quais, a

dispersão dos grãos de melanina dentro dos melanócitos responde fortemente à exposição prolongada a alta concentração de MSH. Em relação à pigmentação interna, principalmente relacionada às células de Kupffer, no que concerne a mudanças no padrão de pigmentação de órgãos por indução hormonal, poucos trabalhos tem sido realizados (GUIDA et al., 2004) e geralmente considera-se que as células pigmentares internas são fracamente responsivas (ASPERGREN et al., 2009).

O presente estudo mostrou que dos animais tratados com esteróides e com α -MSH e submetidos às análises morfológicas, apenas o hormônio cipionato de testosterona promoveu um significativo aumento na área do fígado ocupada pelas células pigmentares, no tratamento com recuperação lenta quando comparado ao tratamento com recuperação imediata. Também foi observado aumento da área pigmentada hepática do tratamento com recuperação lenta em relação ao grupo controle, indicando que as células de Kupffer de *E. nattereri* responderam ao tratamento com cipionato de testosterona e, o aumento da pigmentação, pode ser decorrente do aumento de atividade melanossintética, do aumento do número de células, ou ambos.

Quanto aos hormônios 17β -estradiol e α -MSH, apesar de não terem promovido resposta nas células pigmentadas do fígado, mediante estudos morfológicos e estereológicos, análises bioquímicas podem ser úteis para detectar alterações na atividade da dopa-oxidase ou da tirosinase no fígado (ITO, et al., 2000; PURRELO et al., 2001; GALLONE et al., 2002; GUIDA et al., 2004) em presença desses hormônios.

Trabalhos com α -MSH *in vitro* em *Xenopus*, mostram que o α -MSH possui uma meia vida de cerca de 120 minutos, e que pode decair quando aplicado e analisado no animal *in vivo*, pois a melanotropina está sujeita a ação do soro plasmático que tem efeito degradante sobre o peptídeo, ou pelo efeito sinergista com outros hormônios plasmáticos (CASTRUCCI et al., 1984; HADLEY et al., 1985). A não responsividade

das células de Kupffer de *E. nattereri* frente ao α -MSH pode estar relacionado com tempo mínimo de recuperação dos animais tratados, que foi de 24h.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Luiz Roberto Falleiros Junior pela assistência nos procedimentos morfológicos, ao MSc. Michel Varajão Garey pelo suporte nas análises estatísticas e à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

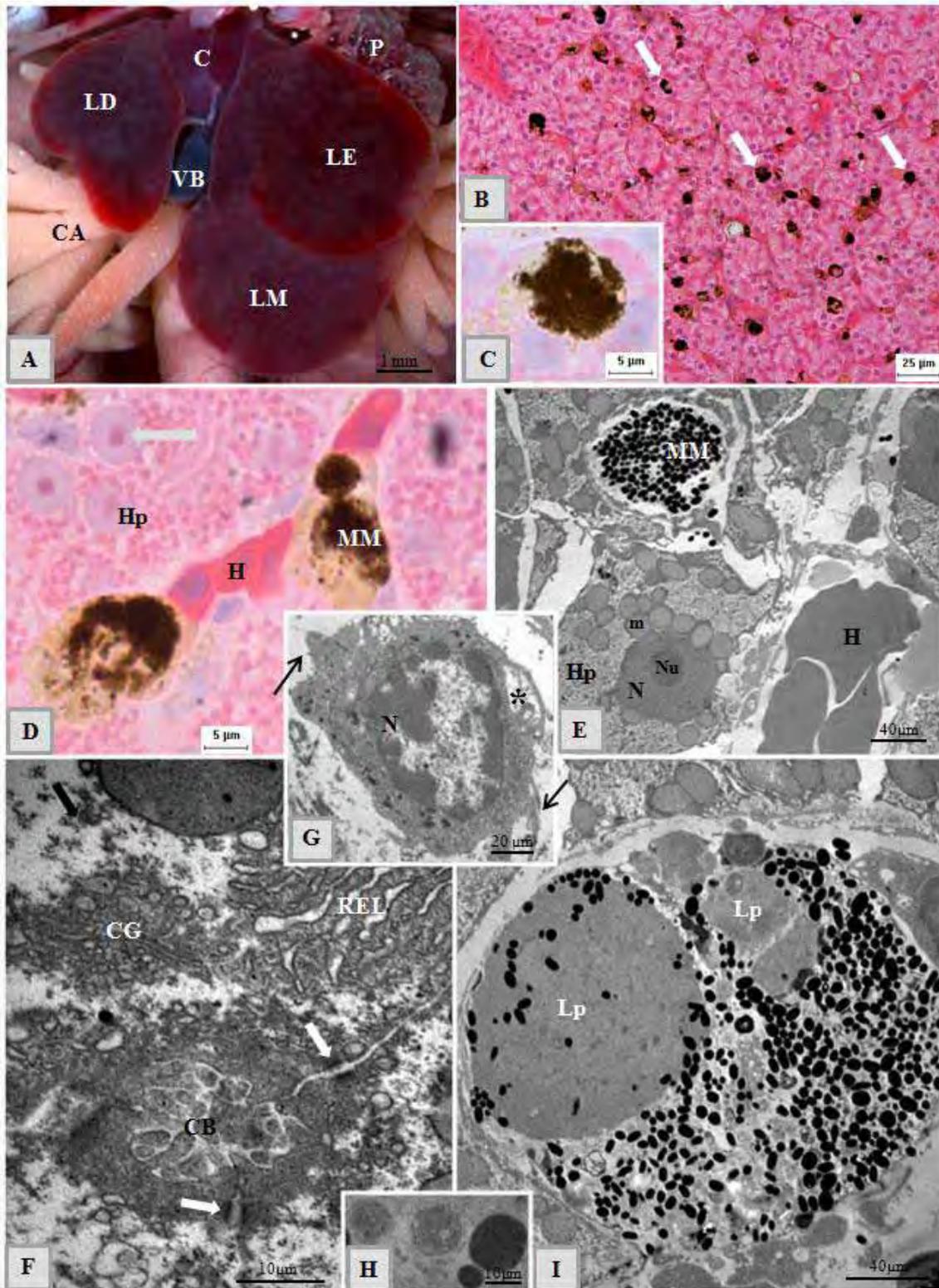


Figura 1. Aspectos anatômicos, histológicos e ultraestruturais do fígado de *E. nattereri*. A- Fígado formado pelos lobos direito (LD), médio (LM) e esquerdo (LE) e vesícula biliar (VB) em sintopia com os demais órgãos da cavidade. Coração (C), pulmão (P) e corpos adiposos (CA). B- Tecido hepático evidenciando o arranjo de suas células e os melanomacrófagos (setas claras). C- Detalhe do melanomacrófago contendo grânulos de pigmentos no citoplasma. D- Proximidade dos melanomacrófagos com os sinusóides hepáticos. Melanomacrófagos (MM), hepatócitos (Hp) e hemácias (H). E- Eletromicrografia mostrando a interação dos melanomacrófagos (MM) com hepatócitos (Hp) e a proximidade com sinusóides contendo hemáceas (H) em seu interior. F- Eletromicrografia dos hepatócitos mostrando os canalículos biliares (CB), desmossomos (seta clara), complexo de Golgi (CG) e retículo endoplasmático liso (REL), G- Macrófago pequeno e pouco pigmentado, evidenciando núcleo (N), pseudópodes (setas) e vesícula fagocítica (*). H- Melanosomos em graus diferentes de melanização. I- Melanomacrófago típico, contendo inúmeros melanosomos e grandes inclusões de lipofuscina (Lp).

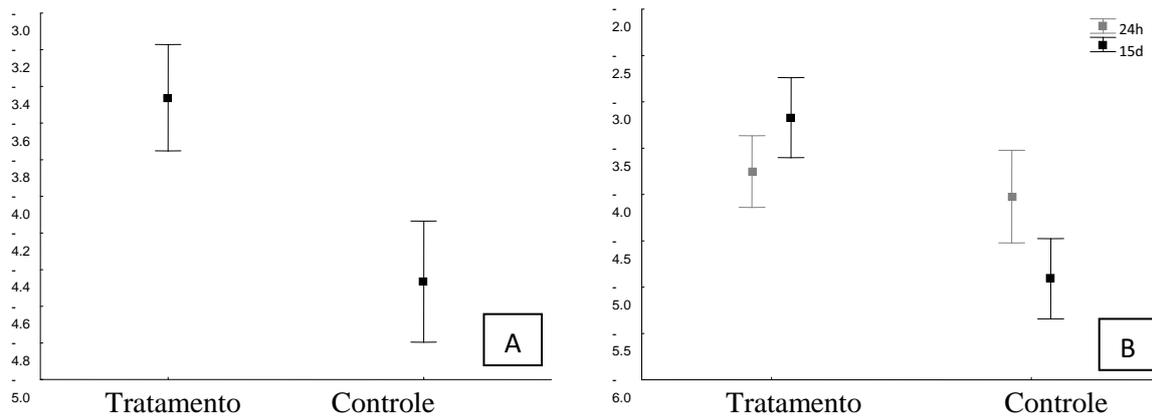


Figura 2. Pigmentação no tecido hepático de *E. nattereri* tratados com cipionato de testosterona. (A) - Diferenças na pigmentação entre o grupo tratado com cipionato de testosterona e o grupo controle. (B) - Interação entre tratamento e o tempo de recuperação em animais tratados com cipionato de testosterona. (Ponto = média; Barra \pm desvio padrão).

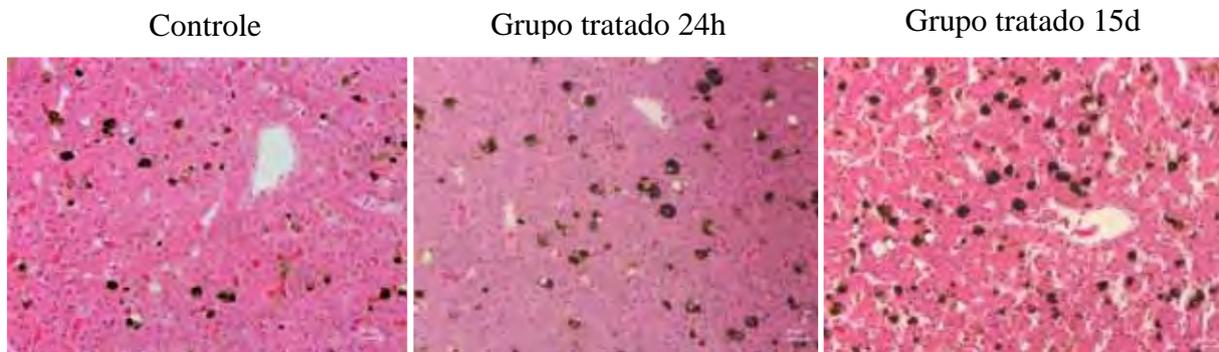


Figura 3. Pigmentação hepática de *E. nattereri* tratado com cipionato de testosterona mostrando aumento da área pigmentada dos tratamentos em relação ao grupo controle e entre o grupo tratado e recuperado durante 15 dias e o grupo tratado e recuperado durante 24 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. **Journal of Zoology**. 191: 11-31.
- AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**. 24(4): 471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. 26: 499-509.
- AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). **Vestnik Zoologii**. 32(3): 49-53.
- AOKI, A.; VITALE-CALPE, R.; PISANO, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. 98(1): 9-16.
- ASPENGREN, S.; HEDBERG D.; SKÖLD, H.N.; WALLIN M. 2009. New Insights into Melanosome Transport in Vertebrate Pigment Cells. **International Review of Cell and Molecular Biology**. 272: 245-302.
- BAGNARA, J.T. 1976. Color Change. In: **Physiology of the Amphibia**. New York: Academic Press. 1-52 pp.
- BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues p.11-59. In: **The Pigmentary System**. Oxford University Press. 2^a ed. 1229p.
- BARNI, S.; BERTONE, V.; CROCE, A.C.; BOTTIROLI, G.; BERNINI, F.; GERZELI, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. **Journal of Anatomy**. 195: 19-25.

- BARNI, S.; VACCARONE, R.; BERTONE, V.; FRASCHINI, A.; BERNINI, F.; FENOGLIO, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. **Journal of Anatomy**. 200: 185-194.
- BOMBONATO, M.T.S.; ROCHEL, S.S.; VICENTINI, C.A.; VICENTINI, I.B.F. 2007. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Science**. 29(1): 81-85.
- BRUSLÈ, J.; ANADON, G.G. 1996. **The Structure and function of fish liver**. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Ed.). Fish morphology horizon of new research. Lebanon: Science Publishers Inc. p. 77-93.
- CASTRUCCI, A.M.L.; HADDLEY, M.E.; HRUBY, V.J. 1984. Melanotropin Bioassays: In vitro and in vivo comparisons. **General and Comparative Endocrinology**. 55: 104-111.
- CICERO, R.; MALLARDI, A.; MAIDA, I.; GALLONE, A.; PINTUCCI, G. 1989. Melanogenesis in the pigment cells of *Rana esculenta* L. liver: evidence for tyrosinase like activity in the melanosome protein fraction. **Pigment Cell Research**. 2: 100-108.
- CHRISTIANSEN, J.L.; GRZYBOWSKI, J.M.; KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). **Pigment Cell Research**. v.9, n.4, p.185-190.
- CORSARO, C.; SCALIA, M.; LEOTTA, M., MONDIO, F.; SICHEL, G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. **Journal of Anatomy**. 196: 249-261.

- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G.; DAVID-FERREIRA, J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technol.** 51: 7-11.
- FILADELFI, A.M.C.; CASTRUCCI, A.M.D. 1994. Melatonin desensitizing effects on the in-vitro responses to MCH, Alpha-MSH, Isoproterenol and melatonin in pigment-cells of a fish (*S. marmoratus*), a toad (*B. ictericus*), a frog (*R. pipiens*), and a lizard (*A. carolinensis*), exposed to varying photoperiodic regimens. **Comparative biochemistry and Physiology A-Physiology.** 109 (4): 1027-1037.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L. R. S.; MORESCO, R. M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. **Anatomical Record -Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology.** 292: 178-182.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger.** (In press).
- GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CÍCERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research.** 15: 32-40.
- GUIDA, G.; ZANNA P.; GALLONE A.; ARGENZIO E.; CICERO R. 2004. Melanogenic Response of the Kupffer Cells of *Rana Esculenta* L. to Melanocyte Stimulating Hormone. **Pigment Cell Research.** 17: 128–134.
- HADLEY M.E.; MIEYR J.H.; MARTIN B.E.; CASTRUCCI A.M.L. 1985. [Nle⁴, D-Phe⁷]-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate chromatophores. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology.** 81(1): 1-6.

- HAYES, T.B.; MENENDEZ, K.P. 1999. The Effect of Sex Steroids on Primary and Secondary Sex Differentiation in the Sexually Dichromatic Reedfrog (*Hyperolius argus*: Hyperolidae) from the Arabuko Sokoke Forest of Kenya. **General and Comparative Endocrinology**. 115: 188-199.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. **European Journal of Morphology**. 29(2): 89-102.
- ITO, S. WAKAMATSU, K. 2003. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. **Pigment Cell Research**. 16(5): 523-31.
- JOHNSON, J.C.; SCHWIESOW, T.; EKWALL, A.K.; CHRISTIANSEN, J.L. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. **Pigment Cell Research**. 12(6): 376-382.
- JORDANOVA, M.; MITEVA, N.; ROCHA, E. 2008 A Qualitative and Quantitative Study of the Hepatic Pigmented Macrophage Aggregates During the Breeding Cycle of Ohrid Trout, *Salmo letnica* Kar(Teloestei, Salmonidae). **Microscopy Research and Technique**. 71: 822–830.
- MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. **South American Journal of Herpetology**. 4(1): 1-8.
- MOURA, L.R.; SANTOS, A.L.Q.; BELLETI, M.E.; VIEIRA, L.G.; ORPINELLI, S.R.T.; De SIMONE, S.B.S. 2009. Morphological aspects of the liver of the freshwater turtle *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae). **Brazilian Journal of Morphological Science**. 26(3-4): 129-134.

- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. 20(3): 263-268.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22(2): 454-460.
- PRELOVISEK, P.; BULOG, B. 2003. Biogenesis of melanosomes in Kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). **Pigment Cell Research**. 16: 345-350.
- PURRELLO, M.; SCALIA, M.; CORSARO, C.; DI PIETRO, C.; PIRO, S.; SICHEL, G. 2001. Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in Kupffer cells from *Rana esculenta*. **Pigment Cell Research**. (14): 126–131.
- RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. 2000. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Belo Horizonte: Segrac Editora. 89p.
- RICHARDS, C.M. 1982. The alteration of chromatophore expression by sex hormones in the Kenyan reed frog, *Hyperolius viridiflavus*. **General Comparative Endocrinology**. 46: 58-67.
- RUND, C.R., CHRISTIANSEN, J.L., JOHNSON, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. **Pigment Cell Research**. 11(2): 114-119.
- SANTOS, F.C.A. 2006. Tese (Doutorado). **Regulação hormonal da próstata de fêmeas do gerbilo: avaliação estrutural, citoquímica e imunocitoquímica**. 154f. Universidade Estadual de Campinas.
- SANTOS, L.R.S. 2010. Tese (Doutorado). **Efeitos da variação térmica no Sistema Pigmentar extracutâneo do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)**.

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
100p.

SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**. 10: 271-287.

VENABLE JH, COGGESHALL R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 25: 407–408.

WATSON ML. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of biophysical and biochemical cytology**. 4: 475–478.

ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.

ZIERI, R.; TABOGA S.R.; OLIVEIRA C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Stereological, and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. 290: 795–800.

ZUASTI, A.; FERRER, C.; AROCA, P.; SOLANO, F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus* and *Dicetrachus labrax* (Pisces, Teleostei). **Pigment Cell Research**. 3: 126-131.

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C; FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology**. 61(4): 305-316.

**Efeitos de Esteróides Sexuais e do alpha-MSH sobre os
Melanócitos Testiculares de *Eupemphix nattereri* (Anura):
Análises Histológicas, Estereológicas e Ultraestruturais**

Efeitos de Esteróides Sexuais e do alpha-MSH sobre os Melanócitos Testiculares de *Eupemphix nattereri* (Anura): Análises Histológicas, Estereológicas e Ultraestruturais

Rodrigo Zieri¹

Lilian Franco-Belussi¹

Lia Raquel de Souza Santos¹

Sebastião Roberto Taboga²

Classius de Oliveira²

¹Curso de Pós graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP.

²Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP.

Endereço para correspondência:

Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP:15040-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Fax: (55-17) 3221- 2390. E-mail: rodrigozieri@gmail.com / classius@ibilce.unesp.br

Resumo: Este trabalho buscou avaliar o efeito do hormônio estimulante de melanina (α -MSH) e dos esteróides cipionato de testosterona e 17 β -estradiol sobre a pigmentação testicular no anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica, estereológica e ultraestrutural. Foram coletados 60 machos adultos, em São José do Rio Preto – SP. Após os tratamentos hormonais, os animais foram submetidos às análises morfológicas e estereológicas. No interstício testicular observou-se melanócitos com inúmeros melanossomos. Para o grupo tratado com cipionato de testosterona foi observado um aumento de aproximadamente 4x na área pigmentada ocupada pelas células pigmentadas nos testículos, quando comparados o tratamento e o controle. Os animais tratados com 17- β -estradiol e α -MSH não apresentaram diferenças na pigmentação testicular.

Palavras-Chave: Anura, melanócito, melanina, testosterona, estradiol, α -MSH

Abstract: The present study aimed to characterize morphological and stereological patterns of pigmented cells in testis of *Eupemphix nattereri* under effect of testosterone cypionate, 17 β -estradiol and α -MSH. Morphological studies with light and transmission electron microscopy were carried out in the groups. In the testis, melanocytes-like cells are present in the interstitium. They presented large and irregular aspect and a great amount of intensely pigmented cytoplasm. For the groups treated with testosterone cypionate an increase of approximately 4x in the occupied area by the pigmented cells in the testis was observed in the treatment group against the control. The animals treated with 17- β -estradiol and α -MSH did not show differences with regard to organs pigmentation.

Keywords: Anuran, melanocyte, melanin, testosterone, estradiol, α -MSH

INTRODUÇÃO

Em vertebrados ectotérmicos, tem sido descritas na epiderme e em diversos órgãos células semelhantes à melanócitos (AGIUS e AGBEDE, 1984; ZUAST et al., 1998; OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007; MORESCO e OLIVEIRA, 2009; FRANCO-BELUSSI et al., 2009; FRANCO-BELUSSI et al., 2010), que produzem e estocam melanina no interior de estruturas esféricas ou ovóides, os melanossomos (AGIUS e ROBERTS, 2003; ZIERI et al., 2007).

Os melanócitos, comumente designados melanofóros quando se trata de animais ectotérmicos, são células grandes e irregulares, com o citoplasma abundante e intensamente pigmentado, mostrando-se ao microscópio estereoscópio com aspecto dendrítico, devido à presença dos melanossomos espalhados pelos prolongamentos citoplasmáticos, ou puntiforme, quando não se observa esses prolongamentos, pela ausência dessas organelas que ficam concentradas na região perinuclear (OLIVEIRA e ZIERI, 2005).

Estas células, quando presentes na epiderme, conferem um importante mecanismo de adaptação cromática aos vertebrados ectotérmicos, caracterizado por mudanças rápidas na coloração dos melanócitos, ocasionadas por movimentos intracelulares de pigmentos, podendo atuar como mecanismo de termorregulação, proteção contra radiação, mimetismo, camuflagem e sinais comportamentais como medo ou raiva (FILADELFI et al., 2005 e BAGNARA e HADLEY, 1973).

A translocação intracelular dos pigmentos, em peixes, é controlada por hormônios e por ação direta do sistema nervoso (FUJII, 2000), já em anfíbios, a adaptação cromática esta sujeita exclusivamente ao controle hormonal (BAGNARA e HADLEY, 1973). Estudos com anfíbios demonstram que os hormônios esteróides influenciam na

pigmentação, e seus efeitos promoveram alteração na expressão dos cromatóforos, como observado por Richards (1982) e Hayes e Menendez (1999) em *Hyperolius argus*.

Em Leiuperídeos, família da qual a espécie *Eupemphix nattereri* faz parte, a pigmentação testicular parece ser inerente aos integrantes do táxon, como foi observado em *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA et al., 2002 e 2003, MORESCO e OLIVEIRA, 2009), *P. fuscomaculatus* (AOKI et al., 1969), *E. nattereri* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007; FRANCO-BELUSSI, et al., 2009), *P. olfersii* e *Pseudopaludicola falcipes* (FRANCO-BELUSSI et al., 2009). Esses animais apresentam um grande número de células pigmentadas na cápsula e no interstício testicular, conferindo uma tonalidade marrom escura às gônadas. Baseado nessa peculiar pigmentação, este trabalho avaliou o efeito dos esteroides cipionato de testosterona e 17 β -estradiol e do hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) sobre os melanócitos testiculares do anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica, estereoscópica e ultraestrutural.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto, SP, em atividade reprodutiva, nas estações chuvosas de 2008 e 2009 (Licença IBAMA: 14731-1). Os exemplares foram aclimatados durante 7 dias, em terrários individuais, no Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, SP. A manipulação e os experimentos foram feitos de acordo com o procedimento da Universidade Estadual Paulista (UNESP) seguindo o guia de cuidados e uso de animais de laboratório.

Tratamento hormonal

Para o uso dos hormônios esteróides, os animais coletados na estação chuvosa de 2008, receberam injeções subcutâneas de cipionato de testosterona, dissolvido em óleo vegetal e aplicado a cada 48h por sete dias. Na análise de curto prazo da condição hiperandrogênica, cinco exemplares foram eutanasiados 24h após a aplicação do hormônio e outros cinco, para análise de médio prazo, no décimo quinto dia. Outro grupo de dez exemplares foi tratado com injeções subcutâneas de 17 β -estradiol (Sigma) dissolvido em óleo vegetal e aplicado a cada 48h por sete dias, nos quais cinco foram sacrificados 24h após a aplicação do hormônio e outros cinco no décimo quinto dia. Para o grupo controle (10 animais para cada tratamento), foram utilizadas injeções subcutâneas somente com óleo vegetal, sendo cinco sacrificados 24h após a última aplicação e o restante no décimo quinto dia.

Para uso do hormônio MSH, os animais coletados na estação chuvosa de 2009, receberam injeções subcutâneas de α -MSH dissolvido em PBS e aplicado a cada 48h por sete dias. Para cada espécie, foram utilizados 10 exemplares, nos quais cinco foram sacrificados 24h após a aplicação do hormônio e outros cinco no décimo quinto dia. No grupo controle (10 animais) foram aplicadas injeções subcutâneas contendo apenas PBS. Cinco animais foram sacrificados para análise imediata com 24h e o restante, sacrificados no décimo quinto dia a partir da última aplicação.

Para o uso dos hormônios esteróides, cipionato de testosterona e 17 β -estradiol (Sigma), foi administrado uma dosagem de 0,5 mg/Kg corporal dissolvido em 0,05 ml de óleo vegetal (SANTOS, 2006). Para o α -MSH foi administrado $2,5 \times 10^{-7}$ mmol/10g de α -MSH (Sigma), dissolvido em 0,05 ml de PBS (adaptado de HADLEY et al. 1985).

Os animais foram pesados e dissecados por meio de incisão mediana na região ventral, expondo os órgãos. Após esse procedimento, o testículo direito foi removido,

pesado e imediatamente imerso em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%) e encaminhado à rotina histológica (RIBEIRO e LIMA, 2000) para serem desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (Leica-historesin embedding kit). Secções de 3µm foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observação em microscopia de luz.

Amostras para observações em microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas durante 2h a 25°C em glutaraldeído 3% e ácido tânico 0.25% pH 7.3 em tampão Millonig. Após lavagem no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas durante 1h em tetróxido de ósmio 1% diluído no mesmo tampão, desidratadas em acetona e incluídas em araldite (COTTA-PEREIRA et al., 1976). Secções ultrafinas (50-75 nm) foram obtidas usando navalha de diamante e coradas com acetato de uranila 2% por 20 minutos (WATSON, 1958) e citrato de chumbo em solução de hidróxido de sódio 1N (VENABLE e COGGESHALL, 1965) durante 8 minutos, e examinados com microscópio eletrônico Leo-Zeiss EM – 906 operando a 80 kV.

Análise em historresina

Para as análises em historresina, cortes corados com hematoxilina-eosina foram observados em microscópio Leica DM 4000B. Para cada animal, 25 campos foram observados, utilizando o software de análise de imagem (Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.) baseando-se na diferença de intensidade de coloração para quantificar a área ocupada pelas células pigmentadas. Para análise dos dados foram identificados *outliers* e posteriormente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos foi realizada análise de variância Two Way – ANOVA. Quando os dados foram não paramétricos, foi realizada a transformação com a utilização de logarítmico, tornando-os paramétricos (ZAR, 1999).

RESULTADOS

As gônadas masculinas do anuro *Eupemphix nattereri* são estruturas ovóides, que apresentam comprimento e peso (gônada direita) de $4,82\text{mm} \pm 0,78$ e $0,17\text{g} \pm 0,06$ respectivamente. Os testículos apresentam uma conspícua coloração marrom escura sob a cápsula testicular, visualizadas por transparência da mesma, e ao redor dos lóculos seminíferos, junto às demais células intersticiais, quando visualizadas pela microscopia de luz (Figs. 1A e B).

A intensa pigmentação testicular se deve à presença de melanócitos que são células de grande tamanho, quando comparadas às demais células intersticiais, e possuem aspecto estrelado ou dendrítico devido às expansões citoplasmáticas. Nos processos dendríticos estão distribuídos grânulos de pigmento marrom, conferindo ao órgão tonalidade marrom escura ou preta em alguns casos. Os melanócitos estão em íntimo contato com as demais células do parênquima testicular (Fig. 1C) e frequentemente são encontradas ao redor dos capilares sanguíneos que nutrem o tecido (Fig. 1D).

A análise da ultraestrutura mostra que os melanócitos apresentam o núcleo grande e irregular, com cromatina condensada na região periférica e nucléolo bem evidente. Espalhados ao redor do núcleo e pelo citoplasma dendrítico, encontra-se grande quantidade de corpúsculos ovais e eletrondensos contendo melanina, denominados melanossomos (Fig. 2A).

Os melanócitos podem exibir melanossomos com diferentes tamanhos e graus de melanização, mostrando diferentes estágios de desenvolvimento e, geralmente, estão em íntimo contato ou proximidade com outras células como fibroblastos (Figs. 2B e C), células de Leydig e células mióides, rodeados por uma grande quantidade de fibras colágenas (Fig. 2C).

A região citoplasmática com ausência de melanossomos, exibe escassez de organelas com algumas cisternas de Golgi (Fig. 2D), e associados aos grânulos de pigmentos há elementos do citoesqueleto como microtúbulos e filamentos de actina (Figs. 2D e E).

Observou-se diferença na área ocupada pelos melanócitos nos testículos de *E. nattereri* entre os controles e os nos animais tratados com cipionato de testosterona, no qual o grupo tratado obteve um aumento da área pigmentada de aproximadamente 2 vezes em relação à área pigmentada do grupo controle ($F_{1,12} = 6,395$; $p = 0.026$) (Fig. 3A). Quando os tratamentos são comparados, não se observa diferenças entre eles. Notável diferença é observada entre o tratamento com recuperação de médio prazo e o controle, com aumento da área pigmentada de aproximadamente 4 vezes ($F_{1,12} = 6,395$; $p = 0.0001$) (Figs. 3B e 4).

Os animais tratados com 17β -estradiol ($F_{1,16} = 0,07$; $p = 0,794$) e α -MSH ($F_{1,15} = 0,003$; $p = 0,959$) não apresentaram diferenças na pigmentação do órgão quando comparados os grupos submetidos aos tratamentos hormonais e seus respectivos controles, levando em conta os tempos de recuperação de cada tratamento.

DISCUSSÃO

Animais ectotérmicos apresentam células com pigmentação citoplasmática, localizadas, além da pele (TREVISAN et al., 1991), em diferentes órgãos e estruturas formando o sistema pigmentar extracutâneo, de função ainda pouco compreendida (ZUASTI et al., 1988; OLIVEIRA e ZIERI, 2005), mas que tem recebido atenção para decifrar seu significado biológico, com estudos avaliando a influencia sazonal (MORESCO e OLIVEIRA, 2009), influência da temperatura e fotoperíodo (MORESCO, 2009), inflamação por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*

(FRANCO-BELUSSI, 2010) e características taxonômicas ou filogenéticas (FRANCO-BELUSSI et al., 2009).

Os melanóforos são os tipos mais comuns de cromatóforos e são responsáveis pela pigmentação dos vertebrados, sendo que em mamíferos, os melanóforos são denominados melanócitos (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; ASPERGREN et al., 2009). Todas as células pigmentadas encontradas nesses animais originam-se a partir da crista neural embrionária, os melanoblastos, que através da atividade migratória atingem o órgão alvo e estão sujeitos a fatores presentes na própria crista neural ou fatores extrínsecos, encontrados durante a migração ou quando alcançam o destino. Esses fatores controlam a expressão das células determinando um padrão de pigmentação típico. Além da origem embrionária, as células pigmentadas dos vertebrados também apresentam em comum a morfologia e o controle hormonal (SICHEL et al., 1997; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006).

Os melanóforos são encontrados em diversas vísceras, e em algumas espécies de anuros há ocorrência nos testículos, na região subcapsular e em íntimo contato com as células intersticiais, como descrito para *Pleurodema fuscomaculatum* (= *Physalaemus fuscomaculatus*) (AOKI et al., 1969), *Bombina bombina* (GOLLMANN et al., 1993), *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella schneideri* (OLIVEIRA et al., 2002, 2003; MORESCO e OLIVEIRA, 2009), *Eupemphix nattereri*, *Physalaemus centralis*, *P. marmoratus*, *P. olfersii* e genus *Pseudopaludicola* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005, ZIERI et al., 2007, FRANCO-BELUSSI et al., 2009). Característica pouco comum em Hilydae e em Leptodactylidae, nos quais há relatos de pouquíssimos melanócitos nas estruturas urogenitais (face dorsal dos rins, mesórquio, corpos adiposos e na cápsula testicular) e quando presentes, a quantidade destas células é muito baixa e de fácil enumeração,

embora ocorram em maior quantidade em outros sistemas orgânicos (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; FRANCO-BELUSSI et al., 2009) .

Os melanócitos/melanóforos são células grandes e irregulares, com o citoplasma pobre em organelas portando grande número de melanossomos e longos processos dendríticos, com abundância de elementos do citoesqueleto como microtúbulos e filamentos de actina, importantes na dispersão e agregação dos pigmentos celulares (AOKI et al., 1969; ZIERI et al., 2007). Os melanóforos testiculares de *E. nattereri*, apresentam melanossomos de diferentes tamanhos e graus de melanização, que sugere a ocorrência de atividade melanogênica como descrito por Sichel et al. (1997) e Gallone et al. (2002) em *Rana esculenta*. A melanogênese nos testículos de *E. nattereri* pode ser evidenciada também pela presença de cisternas do Golgi em associação com vesículas de secreção.

Alterações morfológicas e fisiológicas na coloração dos animais ectotérmicos são primariamente reguladas por hormônios, especialmente o hormônio estimulante de melanócitos (MSH). Melatonina, hormônio concentrador de melanóforo (MCH) comum em peixes, catecolaminas e hormônios sexuais apresentam papéis mais restritos no que concerne à pigmentação. Em *E. nattereri*, foi observado notável aumento na área ocupada pelos melanócitos testiculares mediante a presença do hormônio cipionato de testosterona. Zieri (2010), constatou que o cipionato de testosterona também atua nos melanomacrófagos hepáticos de *E. nattereri*, aumentando a pigmentação do órgão.

Trabalhos com α -MSH *in vitro* em *Xenopus*, mostram que o α -MSH possui uma meia vida de cerca de 120 minutos, e que pode decair quando aplicado e analisado no animal *in vivo*, pois a melanotropina está sujeita a ação do soro plasmático ou o efeito sinergista de outros hormônios plasmáticos (CASTRUCCI et al., 1984; HADLEY et al.,

1985). Essas considerações podem ser uma explicação para a não responsividade dos melanóforos testiculares de *E. nattereri* frente ao α -MSH.

Nos vertebrados, de modo geral, os hormônios esteróides influenciam o padrão de pigmentação cutânea e também podem indicar o aparecimento de características sexuais secundárias, principalmente em animais que possuem dimorfismo sexual, como analisado no anuro *Hyperolius viridiflavus* (RICHARDS, 1982) e em *H. argus* (HAYES e MENEDEZ, 1999). Em machos de *E. nattereri*, a expressão da pigmentação nas células pigmentares dos testículos aumentam de acordo com o desenvolvimento e a maturidade sexual, sendo que nos estádios iniciais de vida, o girino apresenta uma coloração branca das gônada e o seu escurecimento pode estar relacionado com o aumento do nível de andrógeno masculino, indicando também maturidade sexual.

Segundo Bagnara e Matsumoto (2006), hormônios sexuais, podem influenciar o desenvolvimento das células pigmentares, mas não são considerados fatores que determinam ou modificam substancialmente o padrão de pigmentação do adulto. Essas considerações podem explicar a ausência ou fraca responsividade das células pigmentadas nos órgãos dos machos adultos em período reprodutivo, quando analisados apenas seus aspectos morfológicos, frente a aplicação dos hormônios sexuais. Em relação ao 17β -estradiol, também é esperado uma baixa densidade de receptores nas células testiculares para o andrógeno feminino em machos adultos de *E. nattereri*.

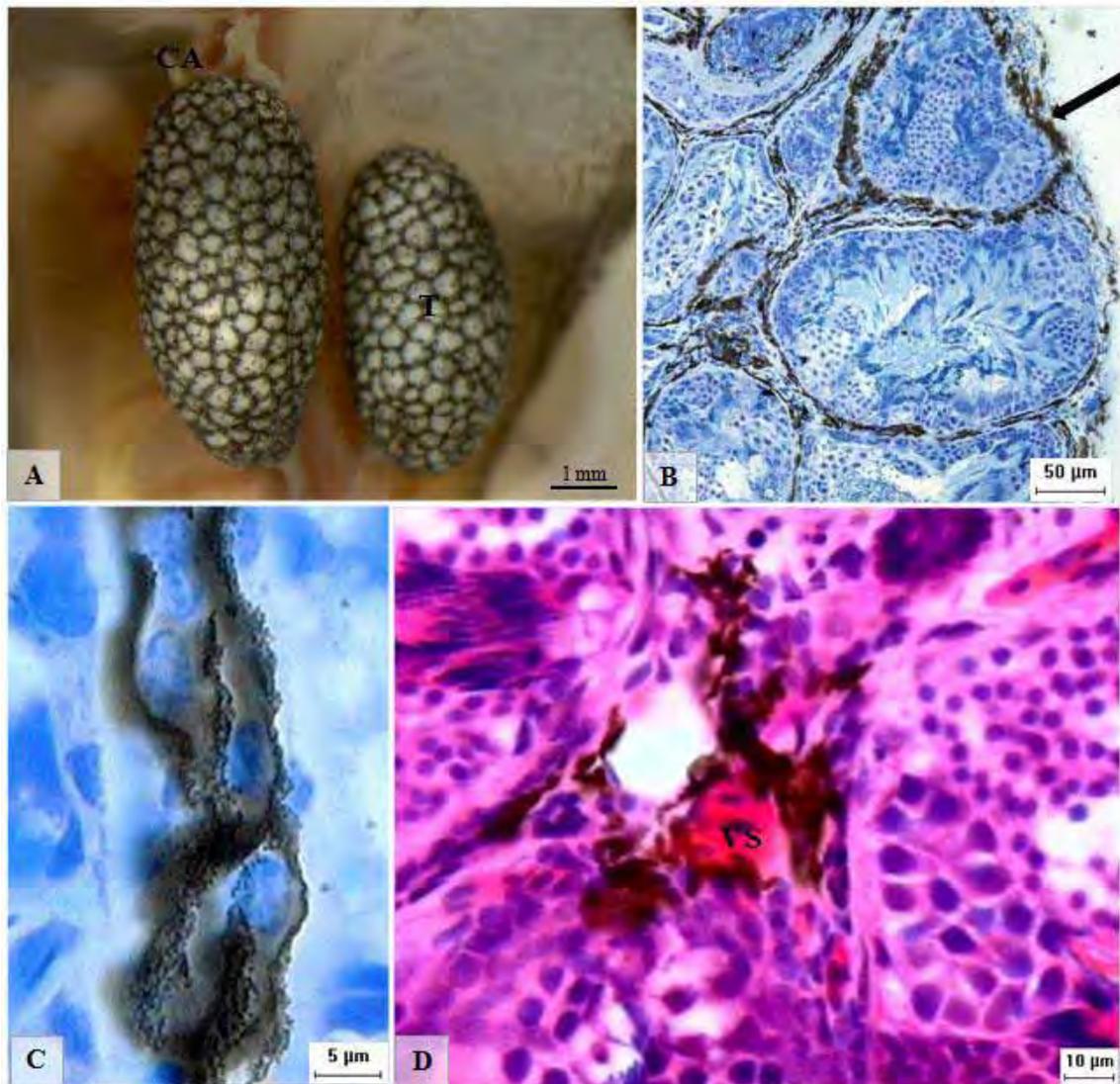


Figura 1. Aspectos anatômicos e histológicos do testículo de *E. nattereri*. A- Coloração escura, vista por transparência da túnica albugínea, na superfície e principalmente na região interocular. Testículo (T), Corpos adiposos abdominais (CA) na região cranial da gônada. B- Secção testicular, mostrando o interstício e superfície gonadal (seta) com células pigmentadas. C- Detalhe de um melanócito testicular de aspecto dendrítico com grãos de melanina espalhados pelo citoplasma. (B e C) Coloração azul de toluidina. D- Melanócitos ao redor de vasos sanguíneos (VS). Coloração HE.

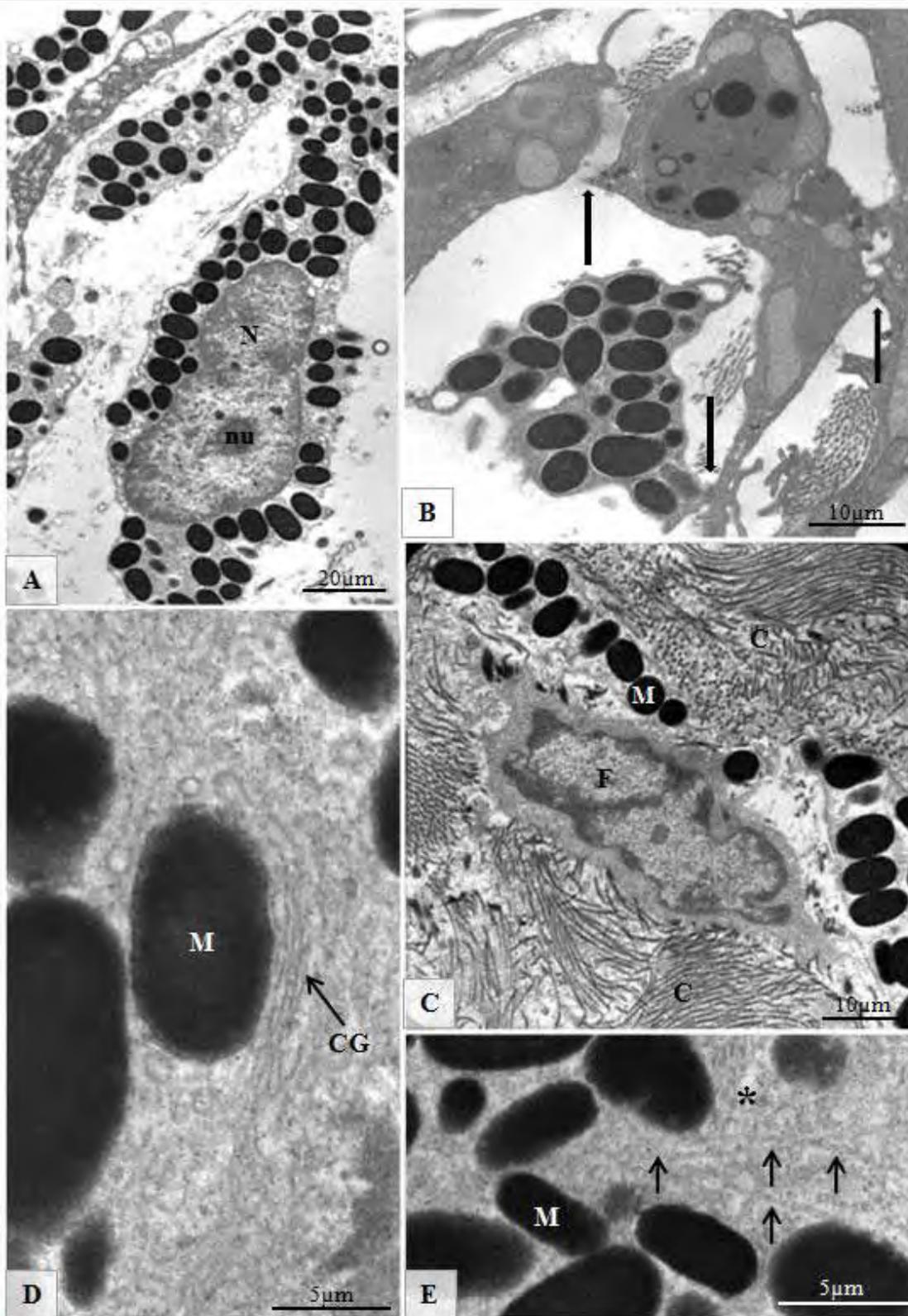


Figura 2. Aspectos ultraestruturais do testículo de *E. nattereri*. A- Melanócito com citoplasma dendrítico, repleto de grânulos de melanina. B- Melanócitos com grânulos de melanina de diversos tamanhos e graus de melanização, apresentando diversos processos citoplasmáticos (setas). C- Fibroblasto (F) com núcleo grande e irregular e cromatina condensada na região periférica, próximo a um melanócito (M), rodeados por grande quantidade de colágeno (C). D- Detalhe do citoplasma do melanócito mostrando Complexo de Golgi. E- Detalhe do citoplasma do melanócito mostrando elementos do citoesqueleto: microtúbulos (setas) e filamentos de actina (asterisco). N, núcleo; Nu, nucléolo; M, melanosomo; F, fibroblastos; CG, complexo de Golgi; C, colágeno.

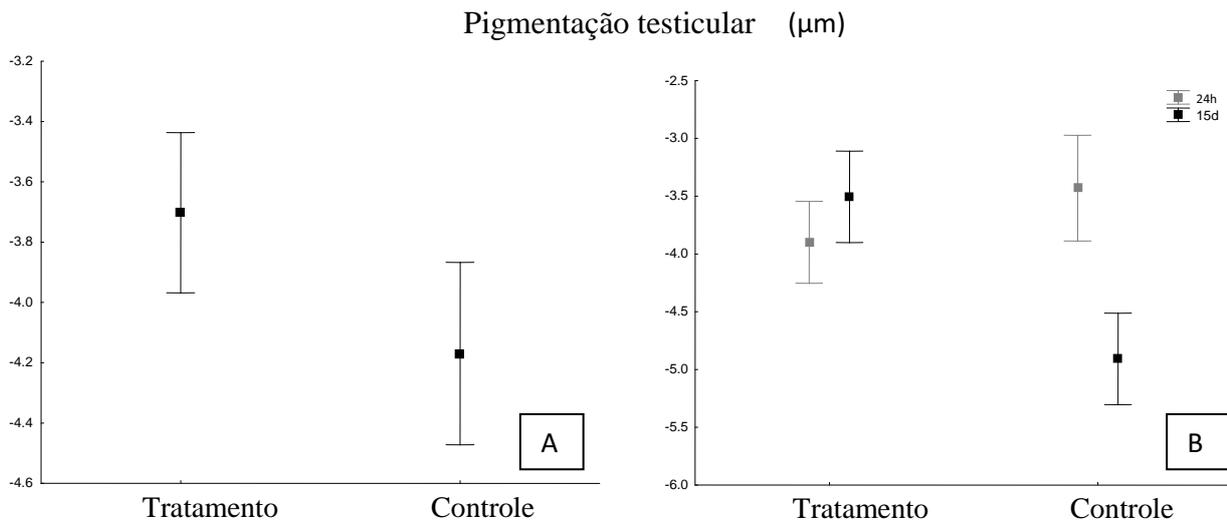


Figura 3. Área ocupada por melanócitos nos testículos de *E. nattereri*, tratados com cipionato de testosterona. (A) - Diferenças na pigmentação entre o grupo tratado com cipionato de testosterona e o grupo controle. (B) - Interação entre tratamento e o tempo de recuperação em animais tratados com cipionato de testosterona. (Ponto = média; Barra \pm desvio padrão).

Tratamento – cipionato de testosterona

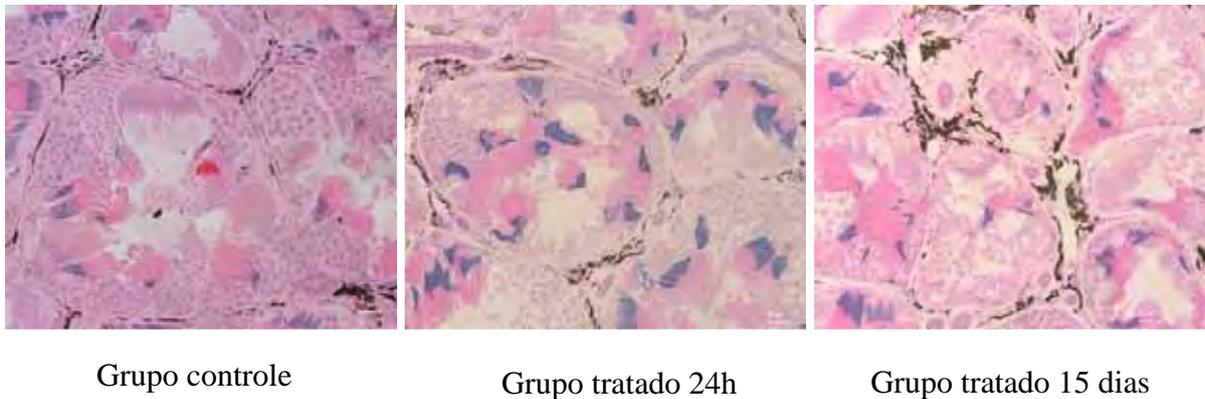


Figura 4. Pigmentação testicular de *E. nattereri* tratado com cipionato de testosterona mostrando aumento da área pigmentada dos tratamentos em relação ao grupo controle com recuperação lenta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Luiz Roberto Falleiros Junior pela assistência nos procedimentos morfológicos, ao MSc. Michel Varajão Garey pelo suporte nas análises estatísticas e à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**. 24 (4): 471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. 26: 499-509.
- AOKI, A.; VITALE-CALPE, R.; PISANO, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. 98 (1): 9-16.
- ASPENGRÉN, S.; HEDBERG D.; SKÖLD, H.N.; WALLIN M. 2009. New Insights into Melanosome Transport in Vertebrate Pigment Cells. **International Review of Cell and Molecular Biology**. 272:245-302.
- BAGNARA, J.T.; HADLEY, M.E. 1973. **Chromatophores and Color Change: The Comparative Physiology of Animal Pigmentation**. Prentice-Hall. 6-16 pp.
- BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues p.11-59. *In: The Pigmentary System*. Oxford University Press. 2^a ed. 1229p.
- CASTRUCCI, A.M.L.; HADDLEY, M.E.; HRUBY, V.J. 1984. Melanotropin Bioassays: In vitro and in vivo comparisons. **General and Comparative Endocrinology**. 55: 104-111.
- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO F.G.; DAVID-FERREIRA J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technol**. 51: 7-11.

- FILADELFI, A.M.C.; VIEIRA, A.; LOUZADA, M.L. 2005. Circadian rhythm of physiological color change in the amphibian *Bufo ictericus* under different photoperiods. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 142: 370-375.
- FRANCO-BELUSSI, L. 2010. **Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo no anuro *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae)**. Dissertação de mestrado. 113p.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L. R. S.; MORESCO, R. M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. **Anatomical Record - Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**. 292: 178-182.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger**. (In press).
- FUJII, R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Research**. 13: 300-319.
- GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CÍCERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. 15: 32-40.
- GOLLMANN, G., BORKIN, L. J., ROTH, P. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). **Zoologische Jahrbuecher Abteilung Fuer Systematik Oekologie und Geographie Der Tiere**. 120: 129-136.
- HADLEY M.E.; MIEYR J.H.; MARTIN B.E.; CASTRUCCI A.M.L. 1985. [Nle⁴, D-Phe⁷]-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate

- chromatophores. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology**. 81(1): 1-6.
- HAYES, T.B.; MENENDEZ, K.P. 1999. The Effect of Sex Steroids on Primary and Secondary Sex Differentiation in the Sexually Dichromatic Reedfrog (*Hyperolius argus*: Hyperolidae) from the Arabuko Sokoke Forest of Kenya. **General and Comparative Endocrinology**. 115: 188-199.
- MORESCO, R.M. 2009. **Análise dos Melanócitos Viscerais em Anuros (*Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* e *Physalaemus cuvieri*) Submetidos a Variações de Fotoperíodo e Temperatura**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 80p.
- MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. **South American Journal of Herpetology**. 4(1): 1-8.
- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. 20(3): 263-268.
- OLIVEIRA, C.; SANTANNA, A.C.; OMENA, P.M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**. 11(1): 39-46.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22(2): 454-460.
- RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. 2000. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Belo Horizonte: Segrac Editora. 89p.

- RICHARDS, C.M. 1982. The alteration of chromatophore expression by sex hormones in the Kenyan reed frog, *Hyperolius viridiflavus*. **General Comparative Endocrinology**. 46: 58-67.
- SANTOS, F.C.A. 2006. Tese (Doutorado). **Regulação hormonal da próstata de fêmeas do gerbilo: avaliação estrutural, citoquímica e imunocitoquímica**. 154f. Universidade Estadual de Campinas.
- SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**. 10: 271-287.
- TREVISAN, P., PEDERZOLI, A., BAROZZI, G. 1991. Pigmentary system of the adults alpine salamander *Salamandra atra atra*. **Pigment Cell Research**. 4: 151-157.
- VENABLE JH, COGGESHALL R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 25: 407-408.
- WATSON ML. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of biophysical and biochemical cytology**. 4: 475-478.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.
- ZIERI, R. 2010. **Influência Hormonal sobre o Sistema Pigmentar em *Eupemphix nattereri* (Anura): Efeitos do Alpha-msh, Estradiol e Testosterona**. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 100p.
- ZIERI, R.; TABOGA S.R.; OLIVEIRA C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Stereological, and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. 290: 795-800.

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C; FERRER, C.
1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology**. 61(4): 305-316.

**Morfologia testicular com ênfase na via seminífera
intratesticular de *Eupemphix nattereri* (anura)**

Morfologia testicular com ênfase na via seminífera intratesticular de *Eupemphix nattereri* (anura)

Rodrigo Zieri¹

Lilian Franco Belussi¹

Juliana Rodrigues de Souza²

Sebastião Roberto Taboga²

Classius de Oliveira²

¹Curso de Pós graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP.

²Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP.

Endereço para correspondência:

Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP:15040-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Fax: (55-17) 3221- 2390. E-mail: rodrigozieri@gmail.com / classius@ibilce.unesp.br

Resumo: De modo geral, os testículos de anuros apresentam epitélio germinativo formado por lóculos seminíferos no interior dos quais encontram-se os cistos espermatogênicos. São órgãos de natureza glandular, atuando na produção de testosterona e de espermatozóides. Este estudo caracterizou a via intratesticular de condução de gametas do anuro *Eupemphix nattereri*, mediante análise histológica e ultraestrutural. Foram utilizados 10 machos adultos de *Eupemphix nattereri*, coletados na região de São José do Rio Preto, SP e submetidos aos procedimentos morfológicos. Em *E. nattereri*, os ductulos apresentam epitélio simples, não ciliado, e um reduzido sistema de endomembranas no citoplasma das células ductulares, as quais apresentam uma fraca coloração com (PAS), indicando que, diferentemente dos mamíferos, os ductulos estão relacionados exclusivamente com a condução de sêmem.

Palavras-chave: Anura, *Eupemphix nattereri*, testículo, ductulos eferentes.

Abstract: In general, the anuran testis present a germ epithelium organized in seminiferous locules, where cystic spermatogenesis occurs. The testis are glandular organs that are responsible for testosterone and sperm production. The present study aimed to characterize the morphology of intratesticular efferent ductules in the anuran *Eupemphix nattereri*. Ten adult males were collected in the region of São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. Morphological studies using light and transmission electron microscopy were carried out. In *E. nattereri*, the ductules present a simple and ciliated epithelium with scarce system of endomembranes inside the ductular cells cytoplasm. These cells exhibit weak PAS staining, indicating that the ductules are exclusively related to semen conduction.

Keywords: Anuran, *Eupemphix nattereri*, testis, efferent ductules

INTRODUÇÃO

Nos anuros, os testículos são descritos como órgãos pares, arredondados, compactos, de cor geralmente amarelada, esbranquiçada ou branco-leitosa. Podem apresentar variações anatômicas de forma e peso de acordo com o período reprodutivo (DUELLMAN e TRUEB, 1994), além de outras alterações morfofuncionais associadas à reprodução (LOFTS 1974), como descrito para algumas espécies (MONTERO e PISANÓ 1990, 1992, LAMPO e MEDIALDEA 1996, HUANG et al. 1997, OLIVEIRA e VICENTINI 1998).

Quanto à arquitetura morfológica, os testículos são revestidos pela túnica albugínea, que confina o parênquima testicular constituído por tecido germinativo arranjado em lóculos seminíferos delimitados por tecido conjuntivo frouxo (OLIVEIRA e VICENTINI 1998, OLIVEIRA et al. 2002, OLIVEIRA et al. 2003, OLIVEIRA e ZIERI, 2005).

Estudos referentes ao sistema reprodutor dos anuros *Eupemphix nattereri* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI et al., 2007) e *Pleurodema fuscomaculatum* (AOKI, 1969) evidenciam a presença de diferentes tipos celulares no interstício testicular, como melanócitos, células mióide e fibroblastos, que ocorrem juntamente com uma grande quantidade de colágeno, além da presença de ductos eferentes e vasos sanguíneos espalhados pelo tecido. Dentre as células intersticiais, destaca-se tipos celulares que possuem organelas comparáveis às descritas para as células de Leydig em mamíferos, evidenciando seu envolvimento na biossíntese de hormônios sexuais (AOKI, 1969).

Em relação à fisiologia testicular, os andrógenos são produtos testiculares de grande importância, sintetizados a partir do colesterol em uma série de reações de hidroxilação e oxirredução, catalisados por enzimas nas membranas mitocondrial e microsomal das células de Leydig (HALL, 1994). Esses hormônios assumem um

importante papel na reprodução, influenciando o processo espermatogênico, além da estreita relação que apresenta durante o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (D'ISTRIA et al., 1974; RASTOGI et al., 1976; SPECKER e MOORE, 1980; ITOH e ISHII, 1990).

A morfologia e fisiologia do sistema reprodutor, principalmente relacionados a via de transporte de gametas e também no que se refere a influência de hormônios na estrutura gonadal dos anfíbios foram realizados em salamandras (WILLIAMS et al., 1984; PUDNEY et al., 1983; FRAILE et al., 1989; SPERONE et al., 2009) e anuros (HIRAGOND e SAIDAPUR, 2000; SAIDAPUR et al., 2001; CANOSA e CEBALLOS, 2001; DENARI e CEBALLOS, 2005; CANOSA et al., 2003; ROSEMBLIT et al., 2006; FERREIRA et al., 2009). Devido ao fato de existirem poucos trabalhos sobre a morfologia dos órgãos e estruturas do aparelho reprodutor masculino dos anuros, especialmente nos animais de regiões neotropicais, o propósito deste trabalho foi caracterizar a via seminífera intratesticular de condução de gametas do anuro *Eupemphix nattereri*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto, SP, em atividade reprodutiva, nas estações chuvosas de 2008 (Licença IBAMA: 14731-1). Os exemplares foram aclimatados durante 7 dias, em terrários individuais, no Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, SP, onde foram anestesiados, eutanasiados e submetidos aos estudos morfológicos. A manipulação e os experimentos foram feitos

de acordo com o guia ético da Universidade Estadual Paulista (UNESP) seguindo o guia de cuidados e uso de animais de laboratório.

Os animais foram pesados e dissecados por meio de incisão mediana na região ventral, expondo os órgãos no interior da cavidade celomática. Após esse procedimento, o testículo direito foi removido, pesado e imediatamente imerso em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%) e encaminhado à rotina histológica (RIBEIRO e LIMA, 2000) para serem desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (Leica-historesin embedding kit). Secções de 3µm foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), periodic acid-Schiff (PAS) e reticulina de Gomori para observação em microscopia de luz.

Amostras para observações em microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas durante 2h a 25°C em glutaraldeído 3% e ácido tânico 0.25% pH 7.3 em tampão Millonig. Após lavagem no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas durante 1h em tetróxido de ósmio 1% diluído no mesmo tampão, desidratadas em acetona e incluídas em araldite (COTTA-PEREIRA et al., 1976). Secções ultrafinas (50-75 nm) foram obtidas usando navalha de diamante e coradas com acetato de uranila 2% por 20 minutos (WATSON, 1958) e citrato de chumbo em solução de hidróxido de sódio 1N (VENABLE e COGGESHALL, 1965) durante 8 minutos, e examinados com microscópio eletrônico Leo-Zeiss EM – 906 operando a 80 kV.

RESULTADOS

As gônadas masculinas do anuro *Eupemphix nattereri* apresentam geralmente formato ovóide, podendo ocorrer assimetrias em relação ao tamanho, coloração e

posição dentro da cavidade corporal. A gônada direita possui cerca de $4,82\text{mm} \pm 0,78$ de comprimento e pesa cerca de $0,17\text{g} \pm 0,06$ (Fig. 1A).

Os testículos apresentam uma conspícua coloração marrom escura sob a cápsula testicular, visualizadas por transparência da mesma, e ao redor epitélio seminífero, em contato com as demais células intersticiais, quando analisadas pela microscopia de luz (Fig. 1A-C).

Histologicamente, os testículos de *Eupemphix nattereri* apresentam, em determinadas regiões, estroma mais desenvolvido, onde são observadas maior quantidade células intersticiais, vasos sanguíneos, melanócitos e o sistema de condução dos espermatozoides formados pelos ductos eferentes intratesticulares (Fig. 1B). O epitélio germinativo é constituído por lóculos seminíferos de diâmetro variável, no interior dos quais observa-se células no mesmo estágio de diferenciação que se agrupam em estruturas denominadas cistos espermatogênicos ou espermatocistos (Fig. 1C).

Quando empregado a técnica de PAS, foi observada uma forte marcação das células de Sertoli, localizadas na base do epitélio germinativo, entretanto, os ductos eferentes, localizados no estroma, apresentaram uma fraca marcação quando analisados com PAS (Figs. 2A, B e D). No estroma, ao redor dos ductos eferentes, também se observa uma grande quantidade de fibras colágenas e reticulares, detectadas pela técnica de reticulina de Gomori (Fig. 2C).

Os ductos seminíferos apresentam-se longos e dispersos no estroma, constituindo uma via muito ramificada (Figs. 2B e C), compondo o sistema de ductos eferentes intratesticulares (Fig. 2A), e quando localizados na região próxima à cápsula testicular, em maior densidade, constituem a via subcapsular (Fig. 2B).

Morfologicamente, os ductos eferentes apresentam um epitélio simples, com altura uniforme, comumente circundados por fibroblastos e melanócitos (Figs. 2D e E). Estes últimos tipos celulares conferem ao testículo uma tonalidade escura (Fig. 1A).

Ultraestruturalmente, o núcleo das células epiteliais é multilobulado, polimórfico, volumoso e localizado na região central da célula, com um nucléolo bem evidente (Figs. 2E e F). No citoplasma observa-se vesículas lipídicas e reduzido sistema de endomembranas de secreção celular, como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Fig. 2F).

DISCUSSÃO

Nos vertebrados, de forma geral, as gônadas são descritas como órgãos pares, de aspecto alongado em animais com corpo delgado (maioria dos peixes, cecílias e urodelos) ou como uma estrutura compacta, ovóide ou cilíndrica e em alguns peixes cartilagosos, anuros e amniotas. Em relação ao par de testículos, não é rara a ocorrência de assimetrias de tamanho, posição e coloração (HILDEBRAND, 1995; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998; OLIVEIRA e ZIERI, 2005; FRANCO-BELUSSI et al., 2009), como observado em *Eupemphix nattereri*.

Histologicamente, os testículos são constituídos por uma rede de estruturas seminíferas convolutas circundadas externamente pela túnica albugínea. Entre os elementos seminíferos, encontram-se no estroma testicular, vasos sanguíneos, nervos, células de Leydig, fibroblastos, melanócitos, ductos eferentes, além de outros elementos do tecido conjuntivo (LOFTS 1974, ROMER e PARSONS 1985, DUELLMAN e TRUEB 1994, HILDEBRAND 1995; ZIERI et al., 2007). Essa arquitetura histológica é verificada em *E. nattereri*, e apresenta similaridades com a morfologia testicular descrita para outras espécies de anuros, dentro da família

Leiuperidae (AOKI et al., 1969; OLIVEIRA et al., 2002), Hylidae (TABOGA e DOLDER, 1991; LEE e KWON, 1992; MONTERO e PISANÓ, 1992; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998; OLIVEIRA et al. 2003; SANTOS e OLIVEIRA, 2008), Bufonidae (OLIVEIRA et al., 2007) e Leptodactylidae (FERREIRA et al., 2009).

Nossos resultados mostram que a via seminífera intratesticular de *E. nattereri*, analisados durante o período reprodutivo, é formada por um proeminente sistema ductular, interligado e distribuído por todo o tecido intersticial. Nas proximidades da região subcapsular, onde o estroma é mais desenvolvido, há ocorrência de maior quantidade de ductos. Em *Dendropsophus minutus* (SANTOS e OLIVEIRA, 2007) e *Scinax fuscovarius* (OLIVEIRA e VICENTINI, 1998) os lóculos seminíferos apresentam elevada proximidade, quando analisados durante o período reprodutivo, dificultando a visualização dos ductulos no escasso tecido intersticial.

Análises da morfologia testicular do anuro *Polypedates maculatus* (Rhacophoridae), mostra que a existência de um desenvolvido sistema de ductulos com disposição longitudinal no interior dos testículos, semelhante ao descrito para *E. nattereri*, pode ter se desenvolvido juntamente com a organização radial dos lóbulos seminíferos de urodélas (LOFTS, 1984), e podem representar uma primitiva rede testicular (KANAMADI e JIRANKALI, 1992).

Quanto a morfologia dos ductulos eferentes, vários trabalhos indicam que existe variações de uma espécie para outra, e ainda entre os segmentos na mesma espécie, podendo em alguns casos existir até três segmentos distintos, com base em seu conteúdo e tipo celular, como ocorre em alguns mamíferos (AIRE e MERWE, 2003). Tais características também são encontradas nos testículos do lagarto *Sitana ponticeriana* (AKBARSHA et al., 2007) e de *Caiman crocodilus* (GUERRERO et al., 2004), os quais compartilham muitas características em comum com outros répteis, aves e

mamíferos. No anuro *E. nattereri*, os ductulos apresentam epitélio simples, não ciliado, e um reduzido sistema de endomembranas no citoplasma das células ductulares, as quais apresentam uma fraca coloração com (PAS), indicando que, diferentemente dos mamíferos, os ductulos estão relacionados exclusivamente com a condução de sêmem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Luiz Roberto Falleiros Junior pela assistência nos procedimentos morfológicos e à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

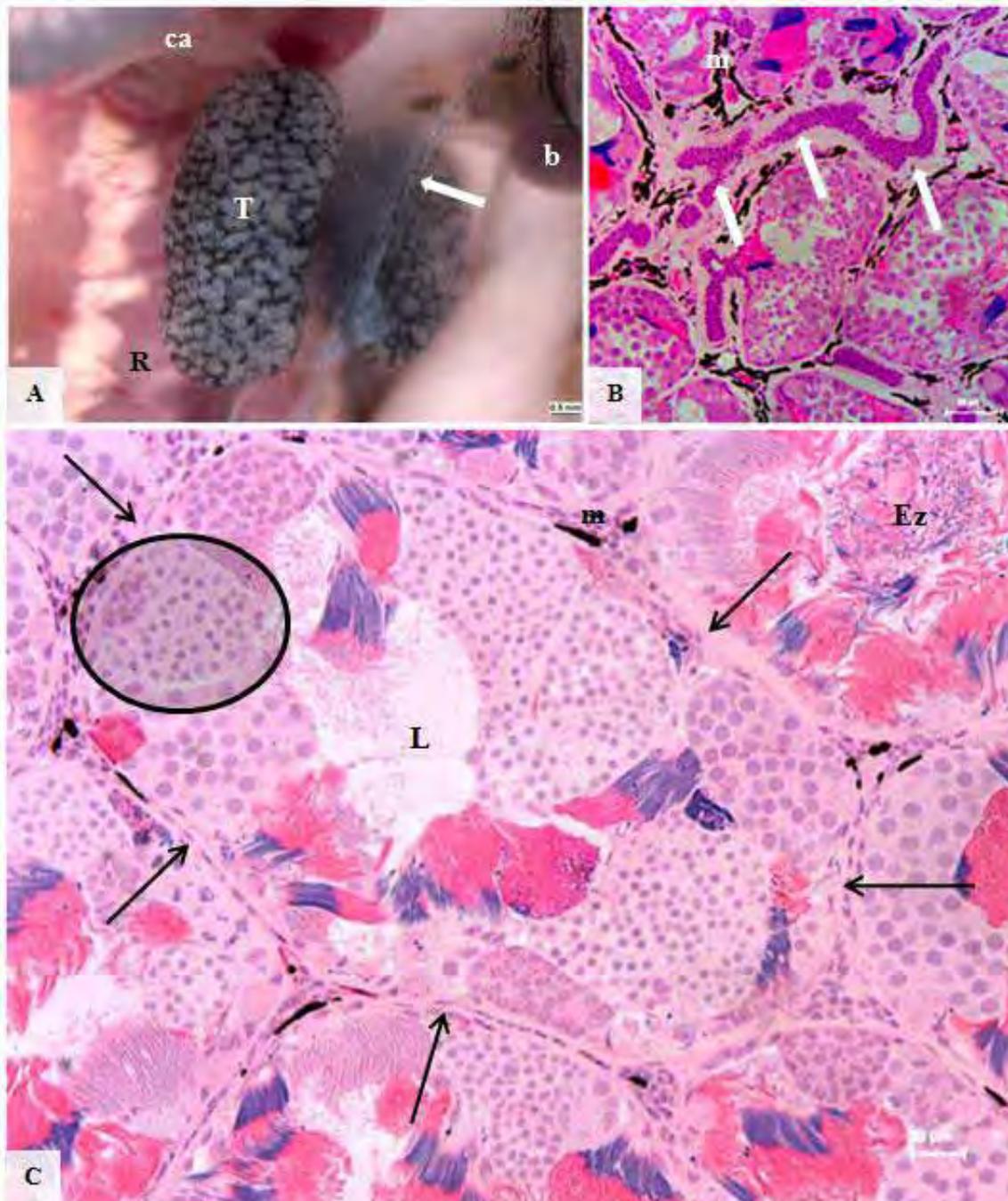


Figura 1. Aspectos anatômicos e histológicos do testículo de *Eupemphix nattereri*. A- Testículos pigmentados (T), localizados na cavidade abdominal e presos pelo mesórquio (seta clara). B- Secção testicular evidenciando os ductulos eferentes intratesticulares (setas claras) e estroma desenvolvido, contendo melanócitos (m). C- Secção testicular mostrando a organização locular do epitélio germinativo (setas) e a presença de cistos espermatogênicos (círculo), com escasso tecido intersticial. (ca)= corpos adiposos; (R)= rim; (b)= baço; (Ez)= espermatozóides; (L)= lúmen.

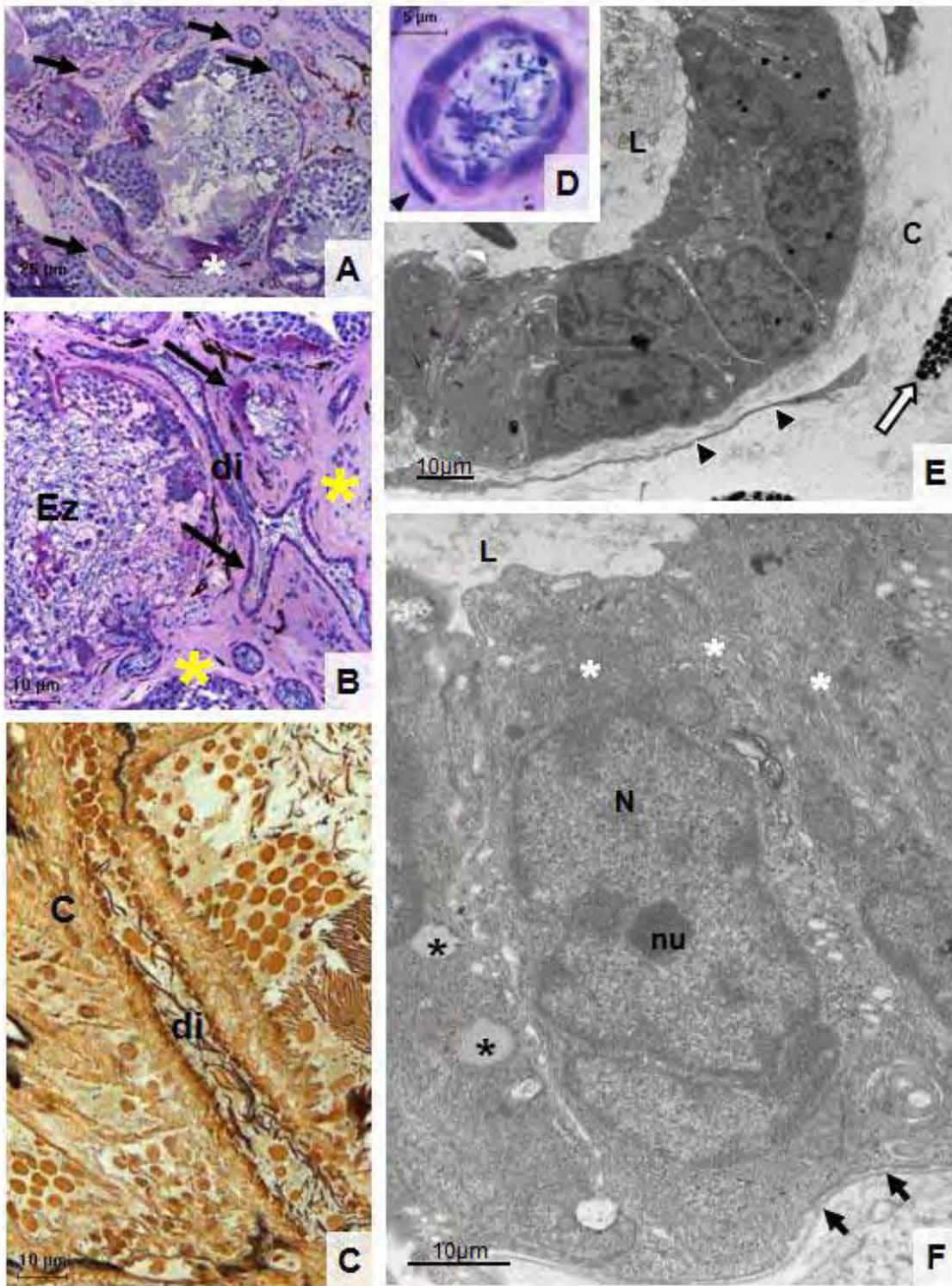


Figura 2. Secções do testículo de *Eupemphix nattereri*. A- Estroma mostrando os ductos intratesticulares (di) (setas) e células de Sertoli marcadas com PAS (asterisco). B- Dúctulos intratesticulares (di) (setas) e estroma desenvolvido (asteriscos) (PAS). C- Dúctulos intratesticulares (di) em corte longitudinal com fibras colágenas ao redor (reticulina de Gomori). D- Secção transversal mostrando fraca marcação com PAS e fibroblasto ao redor do ductulo (cabeça de seta). E- Ultramicrografia do ductulo intratesticular mostrando um epitélio simples e uniforme, rodeado por fibroblastos (cabeça de seta) e melanócitos (seta clara). (L)= lúmen; (C)= colágeno. F- Ultramicrografia do ductulo mostrando a membrana basal (setas) e citoplasma com gotículas de lipídio (asteriscos escuros) e reduzido sistema de endomembranas (asteriscos claros). (N)= núcleo; (nu)= nucléolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRE, T.A.; van der MERWE, M. 2003. The ductuli efferentes testis of the greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*). **Anatomy and Embryology**. 206: 409–417.
- AKBARSHA, M.A.; KADALMANI, B.; TAMILARASAN, V. 2007. Efferent ductules of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana* Cuvier: light and transmission electron microscopy study. **Acta Zoologica**. 88: 265–274.
- AOKI, A.; VITALE-CALPE, R.; PISANO, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. 98(1): 9-16.
- CANOSA, L.F.; CEBALLOS, N.R. 2001. Effects of different steroid-biosynthesis inhibitors on the testicular steroidogenesis of the toad *Bufo arenarum*. **Journal of Comparative Physiology B**. 171: 519-626.
- CANOSA, L.F.; POZZI, A.G.; ROSEMBLIT, C.; CEBALLOS, N.R. 2003. Steroid production in toad. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 85: 227–233.
- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO F.G.; DAVID-FERREIRA J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde um the study of elastic related fibers. **Stain Technol**. 51: 7-11.
- DENARI, D.; CEBALLOS, N.R. 2005. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Bufo arenarum*: Changes in its seasonal activity. **General and Comparative Endocrinology**. 143: 113–120.
- D'ISTRIA, M.; DELRIO, G.; BOTTE, V.; CHIEFFI, G. 1974. Radioimmunoassay of testosterone, 17-oestradiol and oestrone in the male and female plasma of *Rana esculenta* during sexual cycle, **Steroids Lipids Res**. 5: 42–48.

- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibia**. McGraw-Hill Book Company, New York. 670p.
- FRAILE, B.; PANIAGUA, R.; RODRÍGUEZ, M.C.; SÁEZ, F.J.; JIMENEZ, A. 1989. Annual changes in the number, testosterone content and ultrastructure of glandular tissue cells of the testis in the marbled newt *Triturus marmoratus*. **Journal of Anatomy**. 167: 85-94.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L. R. S.; MORESCO, R. M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. **Anatomical Record - Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**. 292: 178-182.
- FERREIRA, A.; ROSA, A.B.S.; MEHANNA, M. 2009. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). **Acta Scientiarum**. 31(4): 447-452.
- GUERRERO, S. M.; CALDERÓN, M.L.; de Pérez, G.R.; Ramirez-Pinilla, M.P. 2004. Morphology of the male duct system of *Caiman crocodilus* (Crocodylia, Alligatoridae). **Annals of Anatomy**. 186: 235–245.
- HALL, P.F. 1994. **Testicular steroid synthesis: organization and regulation**. In “The Physiology of Reproduction”. E. Knobil and J. D. Neill, Eds. (1): 1335–1365.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 700p.
- HIRAGOND, N.C.; SAIDAPUR, S.K. 2000. The Excurrent Duct System of Sperm Transport in *Rana cyanophlyctis*, *Rana limnocharis*, *Polypedates maculatus*, *Microhyla rubra*, *Bufo melanostictus* and *Bufo fergusonii*. **Zoological Science**. 17(4):453-458.

- HUANG, W.S., LIN, J.Y., YU, J.Y.L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. **Zoological Science**. 14(3): 497-503.
- ITOH, M.; ISHII, S. 1990. Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad, *Bufo japonicus*, in association with behavior during the breeding season. **General and Comparative Endocrinology**. 80: 451–464.
- KANAMADI, R.D.; JIRANKALI, C.S. 1992. Testicular activity in *Polypedates maculatus* (Rhacophoridae): seasonal changes in spermatogenesis and fat bodies. **Journal of Herpetology**. 26: 329–335
- LAMPO, M.; MEDIALDEA, V. 1996. Energy allocation patterns in *Bufo marinus* from two habitats in Venezuela. **Journal of Tropical Ecology**. 12(3):321-331.
- LEE, M.S.Y.; KWON, A.S. 1992. Ultrastructure of spermiogenesis in *Hyla japonica* (Anura, Amphibia). **Acta Zoologica**. 73: 49-55.
- LOFTS, B. 1974. Reproduction. In: Physiology of the amphibia. **Academic Press**. New York. 2: 107-218.
- MONTERO, R.; PISANÓ, A. 1990. Ciclo espermatogénico de los especies de *Telmatobius* del noroeste argentino. **Amphibia-Reptilia**. 11: 97-110.
- MONTERO, R., PISANÓ, Y.A. 1992. El ciclo espermatogénico anual de *Hyla pulchella andina*: un análisis numérico. **Acta Zoologica Lilloana**. 41: 173-180.
- OLIVEIRA, C., VICENTINI, C.A. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**. 6(1): 79-88.
- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomía**. 20(3): 263-268.
- OLIVEIRA, C.; SANTANNA, A.C.; OMENA, P.M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of

anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*.

Biociências. 11(1): 39-46.

OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22(2): 454-460.

OLIVEIRA, C.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2007. Variações anatômicas no aparelho reprodutor masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). **Biota Neotropica**. 7(1): 43-48.

PUDNEY, J.; CANICK, J.A.; MAK, P.; CALLARD, G.V. 1983. The differentiation of Leydig cells, steroidogenesis, and the spermatogenic wave in the testis of *Necturus maculosus*. **General and Comparative Endocrinology**. 50: 43-66.

RASTOGI, R.K.; IELA, L.; SAXENA, P.K.; CHIEFFI, G. 1976. The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. **Journal of Experimental Zoologi**. 196: 151-166.

RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. 2000. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Belo Horizonte: Segrac Editora. 89p.

ROSEMBLIT, C.; POZZI, A.G.; CEBALLOS, N.R. 2006. Relationship between steroidogenesis and spermiation in *Rana catesbeiana* and *Leptodactylus ocellatus*. **Journal of Comparative Physiology**. 176: 559-566.

ROMER, A.S., PARSONS, T.S. 1985. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 559p.

SAIDAPUR, S. K.; GRAMAPUROHIT, N. P.; SHANBHAG, B. A. 2001. Effect of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*. **General and Comparative Endocrinology**. 124: 115-23.

- SANTOS, L.R.S.; OLIVEIRA, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 24(26): 64-70.
- SANTOS, S.L.R.; OLIVEIRA, C. 2008. *Histological aspects and structural characteristics of the testes of Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Micron**. 39(8): 1266-70.
- SPECKER, J.L., MOORE, F.L., 1980. Annual cycle of plasma androgens and testicular composition in the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*. **General and Comparative Endocrinology**. 42, 297–303.
- SPERONE, E.; BONACCI, A.; BRUNELLI, E.; TRIPEPI, S. 2009. Male reproductive system in the Italian newt *Lissotriton italicus* (Peracca 1898) (Amphibia, Urodela): ultrastructural and morphological study with description of spermiogenesis, spermatozoon and spermatophore. **Zoomorphology**. 128: 183–195.
- TABOGA, S.R.; DOLDER, M.A. H. 1991. Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**. 2: 66-71.
- VENABLE, J.H.; COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 25: 407–408.
- WATSON, M.L. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of biophysical and biochemical cytology**. 4: 475–478.
- WILLIAMS, A.A. BRANDON, R.A.; MARTAN, J. 1984. Male genital ductis in the salamanders *Eurycea lucifuga* e *Eurycea longicauda*. **Herpetologica**. 40(3): 322-330.

ZIERI, R.; TABOGA S.R.; OLIVEIRA C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Stereological, and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. 290: 795–800.

2. CONCLUSÕES

As mudanças de coloração que ocorrem em todos os vertebrados podem ser classificadas em morfológicas ou fisiológicas. As mudanças fisiológicas dependem de mecanismos celulares de dispersão e agregação de pigmentos dentro dos cromatóforos, resultando respectivamente no escurecimento ou clareamento da pele em curto tempo. Em anfíbios, a adaptação cromática está sujeita exclusivamente ao controle hormonal.

Pouco se sabe a respeito da pigmentação interna e geralmente considera-se que essas células pigmentares são pouco responsivas em comparação aos melanóforos cutâneos. Sendo assim, foram feitas algumas considerações à respeito do sistema pigmentar extracutâneo de *E. nattereri*, submetidos aos experimentos com os hormônios sexuais e α -MSH, e à morfologia dos órgãos nos quais se encontram esses pigmentos.

1. As células de Kupffer presentes no fígado, apresentam morfologia típica e apresentam diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, incluindo a melanina, sendo por essa razão também denominadas de melanomacrófagos.
2. A melanossíntese no interior das células de Kupffer e nos melanócitos testiculares pode ser evidenciada pela presença de grânulos de pigmento com diferentes graus de melanização.
3. As células de Kupffer e os melanócitos responderam ao tratamento com cipionato de testosterona e, o aumento da pigmentação, pode ser decorrente do aumento da atividade melanossintética, do aumento do número de células, ou ambos.
4. Os melanócitos testiculares são células grandes e irregulares, com o citoplasma pobre em organelas portando grande número de melanossomos e longos processos dendríticos, com abundância de elementos do citoesqueleto

como microtúbulos e filamentos de actina, importantes na dispersão e agregação dos pigmentos celulares.

5. A arquitetura histológica dos testículos apresenta similaridades com a morfologia testicular descrita para outras espécies de anuros.
6. A via seminífera intratesticular é formada por um proeminente sistema ductular, interligado e distribuído por todo o tecido intersticial. Em regiões onde estroma é mais desenvolvido, há ocorrência de maior quantidade de ductos.