

**unesp** 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Efeitos da variação térmica no Sistema Pigmentar  
Extracutâneo do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura:  
Leiuperidae)**

**LIA RAQUEL DE SOUZA SANTOS**

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

**Lia Raquel de Souza Santos**

**Efeitos da variação térmica no Sistema Pigmentar Extracutâneo  
do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)**

**Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor(a) em Biologia Animal, área de Biologia Estrutural 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-SP.

**2010**

Santos, Lia Raquel de Souza.

Efeitos da Variação Térmica no Sistema Pigmentar Extracutâneo do anuro  
*Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) / Lia Raquel de Souza Santos –  
São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

126f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Classius de Oliveira

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

1. Células pigmentares viscerais. 2. Anuro - Morfologia. 3. Temperatura.  
4. *Eupemphix nattereri*. I. Oliveira, Classius de. II. Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 597.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

LIA RAQUEL DE SOUZA SANTOS

Efeitos da variação térmica no Sistema Pigmentar Extracutâneo do anuro  
*Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)

**Banca Examinadora**

**Titulares**

Prof. Dr. Classius de Oliveira

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dra. Maria Tercília V. de Azeredo Oliveira

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dra. Eliana Morielle Versute

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto

Prof. Dra. Karina Simões

UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto

**Suplentes**

Prof. Dra. Mary Massumi Itoyama

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni

UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Elias Francisco Lopes de Freitas  
UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto

---

São José do Rio Preto, 02 de junho de 2010.

Este trabalho é dedicado ao meu marido, *Rinneu*; aos meus pais *Maria* e *Carlos*, e as minhas irmãs, *Eli* e *Vânia*, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos!

Também dedico este trabalho ao meu orientador, *Dr. Classius de Oliveira* pelos ensinamentos, compreensão e paciência; e a uma grande amiga, *Lilian Franco-Belussi*, pela participação neste trabalho!

## Síntese da minha vida acadêmica e profissional

Começo minha história com a minha irmã, **Elisângela**, que nem sei mais se ela se lembra disto, mas em casa um dia sentada à mesa, era época de inscrição aos vestibulares, ela, me indicou e incentivou a fazer o Curso de Biologia. Então, em 1999 entrei na faculdade, que alegria, aos meus familiares, afinal era uma Universidade Pública (UFMS- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/MS). A partir daí, começa minha vida acadêmica. Percebi logo no primeiro ano de faculdade, que era a opção certa, estava no curso certo, pois adorava as disciplinas, os **professores**, os quais também agradeço por terem trilhado minha vida profissional, que já começava ali, na sala de aula, sem quase eu perceber! Comecei a criar vínculos de amizade, os amigos de graduação, os quais também fazem parte da minha formação profissional e jamais serão esquecidos! (lembram dos três L, hehehe!). Agradeço em especial a professora. **Dra. Maria José Vilela (Prof<sup>ª</sup>. Zezé)**, a qual despertou minha afinidade com a área de Zoologia, culminando com meu trabalho de conclusão com ecologia e reprodução de peixes, sob sua orientação. Enfim, dezembro de 2002 chegou e com ele a conclusão do curso! Nossa, que alegria e que preocupação! O que fazer depois!?!?. Ao ter vontade em trabalhar na área de Zoologia, procurei alguns professores da minha faculdade, e não tem como esquecer a professora **Dra. Maria Elisabeth Caballero** (*in memorian*), a qual me apresentou o Curso de Pós-graduação em Biologia Animal, da UNESP em São José do Rio Preto-SP, e me incentivou a tentar um contato por lá. Assim aconteceu, e, então, em meados 2003, conheci o professor **Dr. Classius de Oliveira**. Que medo!. O que falar com ele, como agir!. Lembro-me perfeitamente, como se fosse agora.... Entrei em sua sala, e ele começou a fazer algumas perguntas básicas sobre minha formação, área em que eu queria atuar, e a partir daí, me propôs a ficar um ano como aluna especial para conhecer o trabalho dele e também começar a desenvolver projetos na área. Neste ano, entrei então para o grupo do laboratório

de Anatomia, e conheci pessoas maravilhosas, uma delas **Rodrigo Zieri**, meu grande amigo, o qual já fazia seu primeiro ano de Mestrado. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim, o quanto me ajudou naquele primeiro ano, muito difícil, afinal não sabia muita coisa sobre pesquisa científica, e então comecei a aprender e me apaixonar pela área e pelos sapinhos!!! Ao final de 2003, prestei o Mestrado, e novamente que alegria, afinal meus pais sempre me incentivando e investindo em minha formação, claro que com algumas dificuldades, afinal somos três irmãs e todas faziam faculdade. Durante estes dois anos de mestrado, aprendi tantas coisas, que foram imprescindíveis para minha formação profissional. Chegou 2006 e, em março, minha defesa de dissertação. Nossa, que tensão e que alívio!. Afinal foram três anos para estar ali, obtendo um título!. A partir daí, o prof. Dr. Classius, meu orientador, fez o convite para continuar minha formação com o Doutorado, é claro, aceitei instantaneamente e prestei então o Doutorado, aqui mesmo na UNESP no Programa de Pós-graduação em Biologia Animal; e porque não!?. Um programa que só estava em ascendência e com ótimos professores. Bem, na segunda metade deste ano (2006), novamente meu orientador, me indicou para assumir as aulas de Anatomia Geral da UNESP em Jaboticabal, sob aquele regime de professor bolsista, uma vez que o Classius me considerou capacitada para tal função. Assim, então começava minha sólida formação profissional, pois, a partir deste ano, fui convidada por mais 3 anos subsequentes para ministrar esta disciplina nesta IES. Em julho de 2008, já preocupada com minha situação, pois era aluna de Doutorado não-bolsista, e com a situação do “desemprego pós-doutorado”, por incentivo do meu namorado, **Rinneu**, comecei a procurar concursos públicos para tentar prestar e conhecer esta nova etapa que um dia teria que passar. Assim se fez, prestei o concurso do IFG (Instituto Federal Goiano-GO), e passei!. Nossa!. Que susto, pois, realmente tinha prestado para conhecer, pois ainda não me achava capaz de passar em um concurso público; e por ironia do destino, no final de 2008



(novembro) fui contemplada com uma bolsa de doutorado. Bem, ao ser convocada, ao final de 2008, estava ao final do meu terceiro ano de doutorado, tinha apenas coletados os dados, mas não tinha nada analisado e escrito de efetivo sobre minha tese. Com a bolsa em mãos, poderia ter recusado a convocação do concurso e me dedicado integralmente ao Doutorado; mas, e aí?. E depois do Doc.?. Tive muitos incentivos de familiares, amigos (em especial a **Jane**) e de professores da Unesp (em especial a professora **Mary**), para assumir o cargo. Entretanto, novamente o prof. Classius foi um dos meus maiores incentivadores e apoiou minha decisão em assumir esta nova função. Bem, assim pode-se notar o que o prof. Classius representou em minha vida profissional, como meu orientador, como em minha vida pessoal, como amigo. Agradeço pelos ensinamentos, confiança, e amizade que foram trilhados por durante estes 8 anos em que fui sua orientada. Palavras para dizer o quanto sou grata a ele, seriam poucas, apenas posso dizer: *Obrigada Classius!*

Hoje, sou muito feliz na minha escolha profissional, pois descobri que ser professor é a minha vocação, e acredito que: *“não há missão maior e mais nobre no mundo que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro”* (D. Pedro II).

## **Agradecimentos**

- Primeiramente agradeço a **Deus**, por sempre iluminar meus caminhos, e me guiar em cada escolha que fiz em minha vida, tanto profissional quanto pessoal.

- Ao meu orientador, professor Dr. Classius de Oliveira, pela confiança, apoio e incentivo sempre. Obrigada.

- À **Lilian**, a qual conheci quando ela entrou no laboratório de Anatomia e eu já estava cursando o Mestrado. Lilian, sua ajuda tanto nas coletas, procedimentos, discussão e definição deste trabalho foram sinceramente imprescindíveis! Querida amiga, obrigada de coração. Sempre soube que poderia confiar e contar com você!

- Ao **Rinneu**, meu marido e amigo, que sempre se dedicou a me ajudar, que tornou minha vida mais feliz e que me mostrava a cada dia mais motivos para continuar e superar as dificuldades que encontrava no caminho. Obrigada pela compreensão nos momentos em que tive que ausentar das “minhas tarefas de esposa” para que conseguisse conciliar minha profissão, e meu doutorado. Inclusive no primeiro ano, o qual sabemos o quanto foi difícil, aulas e mais aulas, estresse e mais estresse, e ainda o doutorado para concluir. Obrigada também pelas coletas e revisão final da tese.

- Aos meus pais **Carlos** e **Maria**, que me ensinaram a ter uma das qualidades mais importantes na vida, dignidade e humildade. Não posso dizer que foram meus exemplos de estudo, afinal são pessoas que não tiveram esta oportunidade na vida, mas que não mediram esforços para que eu concluísse meus estudos, e ver suas três filhas formadas! São meus exemplos sim, de vida, de luta, de respeito e amor. Hoje, acredito que essa seja a

maior recompensa que vocês, meus amados pais, estão recebendo; afinal sou a última das filhas a terminar efetivamente meus estudos! Parabéns pela conquista e sonho realizado. Somos frutos de seus esforços!

- Agradeço também as minhas irmãs, **Eli** e **Vânia**, que sempre me apoiaram e incentivaram a continuar meus estudos, e entender minha ausência em momentos importantes da nossa família.

- Aos meus sogros, **Ivair** e **Izabel**, por ter ajudado e apoiado minha decisão profissional.

- Ao **Rodrigo Zieri**, amigo de todas as horas! Obrigado pelas coletas, discussões científicas, conselhos, horas alegres, e pelos cafezinhos no laboratório!

- Agradeço também as grandes amizades que ganhei durante estes anos na Pós-graduação, em especial a Jane, Francine, Rita, Natacha, Lu Ortega e Angélica.

- Aos colegas de laboratório: Rafaela, Juliane, Juliana e Mariana pelas coletas.

- Aos colegas do laboratório de Ecologia Animal, por ter ajudado nas coletas. E em especial ao Dr. Vitor Prado pela sugestão em um dos manuscritos.

- Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal por ter contribuído de forma precisa em minha formação profissional.

- Agradeço também a todos os funcionários e técnicos-administrativos que sempre estiveram de prontidão à ajudar.

- A CAPES pela concessão de 4 meses de bolsa e à FAPESP pelo financiamento dos projetos de pesquisa do professor Classius, o qual custeou materiais para o desenvolvimento deste trabalho.

## Reflexão

### O Rio e o Oceano

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas,  
o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos  
povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar  
nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência.

Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.

Porque apenas então o rio saberá que não se trata  
de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento

Assim somos nós. Só podemos ir em frente e arriscar

Coragem !! Avance firme e torne-se Oceano!!!

*Autor desconhecido*

## Sumário

Resumo.....	01
Abstract.....	03
I. Introdução Geral.....	05
II. Objetivos.....	14
III. Material e Métodos.....	15
IV. Agradecimentos.....	22
V. Figuras.....	23
VI. Referências Bibliográficas.....	25
VII. Apresentação dos Trabalhos.....	34
<b>Capítulo 1: Descrição da pigmentação visceral em <i>Eupemphix nattereri</i> (Anura: Leiuperidae) frente à variação de temperatura.</b>	<b>37</b>
Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	43
Resultados.....	46
Discussão.....	48
Agradecimentos.....	52
Figuras.....	53
Referências.....	61
<b>Capítulo 2: Effects of hyperthermia and hypothermia on the hepatic pigmentation of <i>Eupemphix nattereri</i> (Anura: Leiuperidae).</b>	<b>65</b>

Abstract.....	66
Introduction.....	67
Materials and Methods.....	68
Results.....	70
Discussion.....	72
Acknowledgments.....	76
Figures.....	77
References.....	87
<b>Capítulo 3: Variação térmica altera a pigmentação testicular de <i>Eupemphix nattereri</i> (Anura: Leiuperidae).</b>	91
Resumo.....	93
Abstract.....	94
Introdução.....	95
Material e Métodos.....	96
Resultados.....	99
Discussão.....	102
Agradecimentos.....	105
Figuras.....	106
Referências.....	115
VIII. Síntese do Trabalho.....	121
IX. Conclusões.....	124

## Resumo

Os vertebrados ectotérmicos apresentam um desenvolvido sistema de células com pigmentos melânicos em seu citoplasma, localizadas em diversos órgãos e estruturas formando um sistema pigmentar extracutâneo. Esses tipos celulares são grandes e irregulares, com o citoplasma abundante e intensamente pigmentado e variam de um aspecto estrelado ao puntiforme. São encontrados também associados ao aparelho reprodutor de algumas espécies de anuros, conferindo uma tonalidade escura. Esta característica anatômica de coloração testicular faz parte da arquitetura somática do órgão e na literatura não há qualquer dado que aponte para uma inter-relação entre estes componentes. Células contendo pigmentos melânicos são encontradas também no fígado, onde apresentam atividade fagocítica, sendo denominadas melanomacrófagos ou células de Kupffer, e não eram incluídas na classificação de célula pigmentar, pois se pensava que os macrófagos presentes no fígado e baço apenas fagocitavam os melanossomos, e não os sintetizavam. Entretanto, análises sobre a função melanogênica das células pigmentares nesses órgãos em algumas espécies demonstraram que há melanogênese. Para os anfíbios anuros, os estudos relativos aos melanócitos viscerais e aos melanomacrófagos são recentes e se referem à poucas espécies. Alguns estudos demonstraram que alterações do sistema melanogênico pode estar relacionado ao aumento da pigmentação no fígado e a hemocaterese hepática. Há também, trabalhos que relatam modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas durante o inverno, não sendo descritas funções para as células pigmentares presentes nos demais órgãos. Assim, neste trabalho objetivamos analisar a resposta das células do sistema pigmentar extracutâneo do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) mediante a influência de condição de variação térmica, de hipertermia (35,1°C) e hipotermia (18,9°C). Macroscopicamente verificou-se que, as células pigmentares viscerais não manifestam alterações de ocorrência e intensidade frente



à variação térmica. Entretanto, análises histológicas hepáticas e testiculares demonstraram que tanto os melanomacrófagos do tecido hepático quanto os melanócitos testiculares, respondem às variações de temperatura, com diminuição e aumento da pigmentação nestes órgãos, respectivamente. Assim, concluímos que variação térmica promove alteração na pigmentação hepática e testicular

**Palavras-chave:** Sistema pigmentar, temperatura, fígado, testículo, anuro.

### **Abstract**

Ectothermic vertebrates present a well-developed system composed of cells with melanin in its cytoplasm. These cells are distributed in several organs and tissues constituting an extracutaneous pigmentary system. These cells types are big and irregular, with shapes that vary from a star-shaped to a punctiform format. In addition, its cytoplasm is abundantly pigmented. In anuran amphibians this pigmented cells are also found associated to the reproductive system, what gives to the gonads a dark coloration. This coloration makes part of the somatic architecture of the organ, but there is no data in the literature that suggest a function for this pigmentation. Melanin-contemning cells are also found on the liver, where show phagocytic activity, being called melanomacrophages or Kupffer cells, and were not included in the classification of pigmentary cell, since it was thought that the macrophages in the liver and spleen only phagocyted the melanosomes, not synthesizing them. However, some analysis about the melanogenic function of these pigmentary cells in these organs show that melanogenesis indeed takes place. To anuran amphibians, the studies concerning to the visceral melanocytes and to the melanomacrophages are recent and refer to just a few species. Some studies show that changes in the melanogenic system can be related to the increase in the pigmentation on the liver and to the hepatic hemocateresis. Furthermore, some studies report modifications both metabolic and structural in hepatic cells during the winter, but not designating any function for the pigmented cells present in other organs. Our aim in this study was to analyze the response of the cells of the extracutaneous pigmentar system of the anuran *Eupemphix nattereri* to a varying thermal condition of hyperthermia (35.1°C) and hypothermia (18.9°C). In a macroscopic view, we verify that the visceral pigmented cells did not alter its occurrence and intensity in relation to the thermal variation. However, the histological analyses of both hepatic and testicular tissues show that both melanomacrophages and melanocytes are

affected by the thermal variation, demonstrated by the increase and decrease in the pigmentation on these organs, respectively. Thus, we can conclude that the thermal variation promotes alteration on both hepatic and testicular pigmentation.

**Key-words:** Pigmentary system, temperature, liver, testicle, anuran.

## I. INTRODUÇÃO GERAL

### **Panorama geral dos anfíbios**

A classe Amphibia Gray, 1825 foi o primeiro grupo de vertebrados a conquistar o ambiente terrestre, há cerca de 400 milhões de anos e está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Pough *et al.*, 2003; Linzey, 2001). As subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as pioneiras sobre a face da Terra, tendo se extinguido após 200 milhões de anos. Os Amphibia ainda existentes, ou Lissamphibia, surgiram no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 150 milhões de anos (Linzey, 2001).

Esses animais apresentam características peculiares, como permeabilidade cutânea à água e eletrólitos e ciclo de vida dependente do ambiente aquático e do terrestre, que os tornam vulneráveis às alterações ambientais (Duellman e Trueb, 1999; Rabb, 1990). Pelo caráter próprio de certas espécies e seu declínio populacional, o grupo tem sido reconhecido como bioindicador de qualidade ambiental (Blaustein e Wake, 1995; Vitt *et al.*, 1990; Weygoldt, 1989). Também se observa neste grupo uma das maiores diversidades de estratégias reprodutivas entre os vertebrados, seja no comportamento de atração sexual, seja nos tipos e nos locais de postura e nos cuidados com as crias (Pough *et al.*, 2003; Feio *et al.*, 1998).

A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possui os membros posteriores modificados para o salto (Orr, 1986). 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.*, 2003). O Brasil tem a maior biodiversidade mundial (Mittermeier *et al.*, 1992) sendo cerca de 60% das espécies

---

endêmicas (Haddad, 1998). Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2010), foram reconhecidas no país, 849 espécies de anfíbios, das quais 821 pertencem à Ordem Anura e 79 à família Leiuperidae Bonaparte 1850.

A família Leiuperidae inclui dentre outras a espécie *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863, a qual tem como característica coloração dorsal marrom com rajados transversal preto. Estes animais apresentam também um par de manchas escuras, localizadas no dorso próximo a região inguinal as quais denominadas manchas oclares. Estas manchas são utilizadas pelos indivíduos em comportamentos defensivos contra predadores. São animais de porte médio, com cerca de 4 cm de comprimento (rostro-cloacal) e habitam áreas abertas com ocorrência central e sudeste do Brasil, Paraguai e Bolívia (Frost, 2010; Brasileiro *et al.*, 2005). Os machos vocalizam durante a estação chuvosa em bordas de poças temporárias, e são responsáveis por formar o ninho de espuma batendo com as pernas traseiras na secreção gelatinosa expelida pela fêmea (Brasileiro *et al.*, 2005; Rossa-Feres e Jim, 2001).

Contribuições relevantes sobre a herpetologia no país estão em ascendência (Zieri *et al.*, 2007; Oliveira, 2007; Faivovich *et al.*, 2005; Haddad, 1998; Rossa-Feres, 1997; Martins, 1996; Pombal Jr., 1995; Giaretta, 1994; Haddad, 1991; Jim, 1980), entretanto estudos da biologia estrutural relacionados com características morfológicas, e em especial com a descrição da pigmentação testicular e hepática são incipientes para a maioria dos anuros neotropicais. Neste sentido, enfatiza-se a necessidade de explorar e expandir os conhecimentos acerca da pigmentação extracutânea, permitindo melhor entendimento sobre os tipos celulares e possíveis funções deste sistema.

---

## Sistema Pigmentar

Cores magníficas e padrões de cores são difundidos entre os animais e evoluíram através da seleção natural e sexual. As células pigmentares responsáveis pela cor da pele são chamadas de cromatóforos, e se originam do tubo neural durante o desenvolvimento do embrião, migrando para a derme e epiderme (Wallin, 2002). Esses tipos celulares são grandes e irregulares, com o citoplasma abundante e intensamente pigmentado, variam do aspecto estrelado, devido à presença de prolongamentos citoplasmáticos, ao puntiforme, quando não se observa esses prolongamentos (Zieri *et al.*, 2007; Bagnara e Matsumoto, 2006). Os cromatóforos são classificados em diferentes tipos de acordo com o pigmento que contêm: melanóforo, de coloração marrom-escuro, apresenta como pigmento a melanina disposta no interior de estruturas denominadas melanossomos; xantóforos, cujas substâncias pigmentares encontradas são as pteridinas e carotenóides, originando uma coloração amarela; eritróforo, o qual também apresenta como substância pigmentar a pteridina, localizada no interior de estruturas denominadas eritrossomos, e desta maneira apresentam coloração vermelha; os leucóforos apresentam como pigmento as purinas, no interior dos leucossomos, o que confere à célula coloração branca; já os iridóforos possuem a substância purina disposta em cristais refletoras, as quais, com a incidência da luz geram coloração iridescente (metálica). Dentre estes, os melanóforos são amplamente distribuídos entre os vertebrados, visto que ocorrem em todas as classes. Em aves e mamíferos essa variedade de coloração foi perdida restando apenas uma coloração escura (marrom-preta) conferida pelos melanóforos (Aspengren *et al.*, 2009).

A capacidade de mudança de cor observada nos animais ocorre por meio de alterações nos cromatóforos. Esta mudança pode ser de duas formas: a mudança morfológica, que é causada por alterações no número de cromatóforos e deposição de pigmentos na pele (Sugimoto, 2002; Hadley e Quevedo, 1967). É caracterizada como um processo lento que inclui síntese e destruição de uma grande quantidade de pigmento em

---

resposta a um estímulo persistente. Para alguns grupos de peixes a adaptação ao escuro é uma causa comum de mudança morfológica de cor, ou seja, animais mantidos no escuro desenvolvem mais melanina do que aqueles em fundo claro, os quais perdem melanina (Bagnara e Matsumoto, 2006) Em anfíbios e mamíferos, organelas que contêm os pigmentos estão dispersas ao redor das células da pele e a longo prazo esta dispersão estimula a produção de novas células pigmentares (Sugimoto, 2002), contudo, a agregação de pigmento por outro lado, estimula a apoptose em células pigmentares (Sugimoto, 2002; Sugimoto *et al.*, 2000). Embora a mudança de cor seja controlada por ação hormonal, a regulação de diferenciação das células pigmentares, transferência de pigmento e apoptose é dependente dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Sugimoto, 2002).

A mudança fisiológica é definida como uma rápida mudança de cor causada por um movimento intracelular de organelas que contêm pigmentos (Bagnara e Matsumoto, 2006). A manifestação mais comum da mudança de cor fisiológica ocorre em adaptação de fundo. Em um fundo escuro, anfíbios adaptam-se com dispersão dos melanossomos, enquanto aqueles em fundo claro tornam-se pálidos porque seus melanossomos se agregam em uma posição perinuclear na célula. Em peixes, o estímulo para a agregação ou dispersão dos pigmentos pode ser oriundo de inervação direta ou controle hormonal (Fujii, 2000). Nos anfíbios, entretanto, é liderada apenas por controle hormonal (Bagnara e Matsumoto, 2006).

A capacidade dos ectotérmicos para a realização da mudança morfológica e fisiológica de cor em resposta às condições ambientais é baseada na existência de mecanismos de controle precisos que envolvem a hipófise e liberação de hormônios. Um importante hormônio e que tem sua função bem conhecida é o hormônio estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH), o qual age na dispersão de pigmentos das células pigmentares. Outro hormônio relacionado a mudança de cor, é o hormônio concentrador de melanina (MCH),

---

que atua na agregação dos melanossomos em teleósteos (Fujii, 2000), agindo de forma oposta ao  $\alpha$ -MSH. O MCH pode também desempenhar papel no controle pigmentar por deprimir a liberação do  $\alpha$ -MSH pela hipófise (Bagnara e Matsumoto, 2006). Um terceiro tipo hormonal, é a melatonina, um hormônio pineal produzido durante o período de escuro, que está relacionado também a agregação dos melanossomos, sendo responsável pelo clareamento da pele dos vertebrados (Bagnara e Matsumoto, 2006; Aspengren *et al.*, 2003). Outras substâncias relacionadas à mudança de cor são as catecolaminas, como a adrenalina e noradrenalina. De fato, essas mudanças estão relacionadas à translocação sincronizada das organelas que contêm pigmentos, ou seja, do transporte altamente regulado e coordenado dos melanossomos, o qual é considerado o principal produto especializado dos melanócitos (Boissy *et al.*, 2006).

Os melanossomos são formados por uma série de estágios morfológicamente definidos que se iniciam com uma vesícula limitada por membrana que é gradualmente preenchida com melanina (Raposo e Marks, 2007; Kushimoto *et al.*, 2003; Marks e Seabra, 2001). Essas organelas são estruturas móveis, capazes de se movimentar no interior das células pela ação das proteínas motoras, a dineína citoplasmática, a cinesina II, e a miosina V, sendo esse movimento direcionado pelos microtúbulos. Cada proteína tem ações diferentes proporcionando a movimentação dos melanossomos e assim, a agregação e dispersão dos pigmentos. A proteína responsável pela movimentação centrífuga é a cinesina, gerando a dispersão dos melanossomos e conseqüente escurecimento do animal. A proteína cuja ação é antagônica é a dineína, sendo responsável pela movimentação centrípeta dos melanossomos e conseqüente agregação dos pigmentos celulares, gerando o clareamento do animal (Bagnara e Matsumoto, 2006; Nascimento *et al.*, 2003). Já as moléculas de actina são responsáveis pela curta movimentação, ou movimentação cruzada, uma vez que esse tipo de movimento é deslocado do eixo do microtúbulo permitindo maior dispersão do pigmento por todo o citoplasma. Nesse tipo de movimentação, a miosina V se



---

liga ao melanossomo permitindo o deslizamento do conjunto miosina e melanossomo, pelo filamento de actina (Bagnara e Matsumoto, 2006; Nascimento *et al.*, 2003). Em melanócitos cutâneos, essa organela pode ser transferida para os queratinócitos ao seu redor, e em contraste, os melanócitos não cutâneos, ou seja, os de órgãos internos produzem e retêm os melanossomos pigmentados (Boissy *et al.*, 2006).

Em vertebrados ectotérmicos, células pigmentares presentes na derme, e, menos freqüentemente, em órgãos internos tais como fígado, baço, pulmões, coração, timo, gônadas, vasos sanguíneos e meninges, constituindo o sistema pigmentar extracutâneo (Bagnara e Matsumoto, 2006; Gallone *et al.*, 2002). Nesses animais estas células semelhantes à melanóforos, os melanócitos (Franco-Belussi, 2010; Zieri *et al.*, 2007; Zuasti *et al.*, 1998; Agius e Agbede, 1984), são provenientes da crista neural (Sichel *et al.*, 1997), produzem e armazenam melanina nos melanossomos (Agius e Roberts, 2003). Contudo, estes melanócitos internos não têm sido muito estudados até o momento, e pouco se sabe sobre as suas possíveis funções. Embora a morfologia dos melanócitos viscerais seja semelhante aos melanóforos da pele, suas funções e objetivos são presumivelmente diferentes (Boissy e Hornyak, 2006).

Observa-se ainda, em órgãos hematopoéticos dos vertebrados, outro tipo celular que apresentam atividade fagocítica semelhante aos macrófagos (Agius, 1980), as quais são originadas de células tronco hematopoéticas (Sichel *et al.*, 1997) que freqüentemente se agregam formando nódulos pigmentados denominados de centro de melanomacróforos (Agius, 1981). Esses centros são constituintes do sistema fagocitário mononuclear, possuindo funções relacionadas a fagocitose de material celular oriundo do catabolismo (Ellis *et al.*, 1976), sugerindo que esses centros são responsáveis pela detoxificação ou reciclagem de produtos tanto endógenos, quanto exógenos (Herráez e Zapata, 1986). Estas células residentes no fígado de anfíbios também são conhecidas como células de Kupffer (Prelovsek e Bulog, 2003; Zuasti *et al.*, 1998; Sichel *et al.*, 1997) e não eram incluídas na

classificação de célula pigmentar, pois se pensava que os macrófagos presentes no fígado e baço apenas fagocitavam os melanossomos, e não os sintetizavam (Fitzpatrick *et al.*, 1966). Entretanto, análises sobre a função melanogênica das células pigmentares nesses órgãos em *Xenopus laevis* (Sichel *et al.*, 1997), *Rana esculenta* (Sichel *et al.*, 1997; Gallone *et al.*, 2002) e *Proteus anguinus* (Prelovsek e Bulog, 2003) demonstraram que ocorre melanogênese nessas células.

Os melanomacrófagos residentes apresentam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, como melanina, hemosiderina e lipofuscina derivados da degradação de material celular fagocitado (Franco-Belussi, 2010; Herraéz e Zapata, 1991; Agius e Agbede, 1984). Contudo, a melanina é a mais comum e a responsável pela a pigmentação dos vertebrados (Land *et al.*, 2006).

A palavra melanina, é derivada do Grego (*melas*, significando preto) e usada para denotar as formas de pigmentos marrom e preto encontrados em várias espécies de animais e plantas (Lerner e Fitzpatrick, 1950). É um grupo distinto de pigmentos com propriedades físico-químicas distintas, cuja estrutura molecular e funções biológicas são parcialmente conhecidas, sendo descritas dois tipos a eumelanina e feomelanina (Sarna *et al.*, 2008). Este pigmento é um polímero complexo, sintetizado endogenamente em vertebrados e invertebrados (Césarini, 1996), e considerado um poderoso antioxidante e neutralizador de radicais livres, podendo, portanto, proteger as células dos danos oxidativos (Rozanowska *et al.*, 1999). A biossíntese dessa substância é iniciada pela hidroxilação da L-tirosina em L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela ação da enzima tirosinase. A L-DOPA então é oxidada à dopaquinona também pela ação da enzima tirosinase, sendo a partir dessa etapa divergente para a síntese de eumelanina e feomelanina (Hearing, 2006; Prota, 1992). A melanina encontrada nas células pigmentares é formada dentro dos melanossomos, por um

---

processo denominado melanogênese, e como resultado, a melanina está presente na forma de unidades discerníveis tais como grânulos de pigmentos nos melanócitos (Sarna *et al.*, 2008).

Os mecanismos fisiológicos que regulam o sistema melanogênico são amplamente conhecidos. Sabe-se que a dispersão dos grãos de melanina nas células pigmentares dos vertebrados é regulada por distintos fatores, incluindo hormônios, tais como hormônio estimulante de melanina ( $\alpha$ -MSH), o hormônio concentrador de melanina (MCH), melatonina, hormônios sexuais e catecolaminas (Hearing, 2006; Bagnara e Matsumoto, 2006). Entretanto, outros aspectos fisiológicos, ainda pouco explorados, se referem à alteração do sistema melanogênico em resposta a sazonalidade. Barni *et al.* (2002) demonstraram que durante o período em que os animais hibernam os melanomacrófagos alcançam uma maior taxa de proliferação a qual foi acompanhada por uma evidente melanossíntese. Estes autores verificaram ainda que após este período houve diminuição na pigmentação do fígado como consequência de uma perda celular parcial devido a mecanismos apoptóticos, acompanhado também por uma baixa atividade de melanossíntese.

Para os anfíbios anuros, os estudos relativos às células pigmentares viscerais são recentes e se referem a poucas espécies: *Physalaemus cuvieri* (Oliveira *et al.*, 2002 e 2003), *P. fuscomaculatus* (Aoki *et al.*, 1969), *Eupemphix nattereri* (Franco-Belussi, 2010; Zieri *et al.*, 2007), *Rana esculenta* (Gallone *et al.*, 2002; Barni *et al.*, 1999 e 2002; Sichel *et al.*, 1997; Cícero *et al.*, 1989), *R. ridibunda* (Akulenko, 1998) e *Xenopus laevis* (Sichel *et al.*, 1997; Zuasti *et al.*, 1998) resultando portanto, em poucos artigos publicados na área da biologia estrutural.

A função das células pigmentares nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos não está ainda bem definida para todos os grupos, e várias hipóteses têm sido propostas (Gallone *et al.*, 2002). Dentre elas pode-se citar funções citoprotetoras relacionadas aos

---

radicais livres (Mcgraw, 2005), processos de detoxificação por poluentes (Fenoglio *et al.*, 2005) e que os melanócitos funcionem apenas como depósitos de resíduos de melanina (Aspengren *et al.*, 2009). Barni *et al.* (1999) demonstraram um aumento na quantidade de melanina no fígado e modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *Rana esculenta* durante o inverno. Outros correlacionaram a ativação da melanogênese hepática com hipóxia em salamandras (Frangioni *et al.*, 2000). Kalashnikova (1992) e Cícero *et al.* (1977), sugeriram uma relação entre o aumento da pigmentação no fígado e a hemocaterese hepática, sendo também relatada relação dos centros de melanomacrófagos em peixes, aumento de pigmentos melânicos, com condição particular de doença (Roberts, 1975). Estudos recentes relatam também a alteração na pigmentação hepática e testicular frente à agentes infecciosos (Franco-Belussi, 2010).

Trabalhos relacionados à pigmentação realizados em espécies da anurofauna neotropical descrevem apenas características da distribuição e ocorrência das células pigmentadas sem considerar a resposta das células pigmentares frente a condições ambientais. Dentre os trabalhos realizados com anfíbios de regiões temperadas, fatores como a sazonalidade e a altitude ocasionam modificações estruturais nestes tipos celulares. A partir destas informações estabelecemos uma investigação de como responderiam estas células pigmentadas em anuros que vivem em regiões neotropicais, onde a condição climática não oscila tão expressivamente, e, possivelmente a origem das células pigmentadas seria a mesma para os animais de ambas as regiões.

## II. OBJETIVOS

### **Geral**

Descrever a ocorrência e intensidade das células pigmentares viscerais e quantificar a pigmentação hepática e testicular das células do sistema pigmentar do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) sob a influência de condições experimentais de variação de temperatura.

### **Específico**

Com os objetivos propostos no trabalho visamos elucidar as questões:

- 1) A ocorrência e intensidade da pigmentação presente na superfície dos diferentes órgãos podem ser afetadas frente aos experimentos propostos?
- 2) A variação na temperatura é um fator que influencia a pigmentação hepática e testicular?
- 3) A resposta apresentada pelas células pigmentares presentes no tecido hepático e testicular, continua seu processo ou regride à medida que o estímulo é interrompido?
- 4) Se houver resposta pigmentar, qual é a condição experimental (hipertermia/hipotermia) mais influente para promover a alteração das células pigmentares hepáticas e testiculares?

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### Coletas dos exemplares

Foram utilizados 65 machos adultos da espécie *Eupemphix nattereri* (Figura 1A), coletados no município de São José do Rio Preto – SP (20°49'12,65"S e 49°22'46,85" W), em época de atividade reprodutiva, que ocorre no período chuvoso (Novembro de 2007 a Fevereiro de 2008). Neste período, os animais foram coletados em lagoas temporárias e permanentes. Os exemplares capturados foram acondicionados em sacos plásticos, levados e mantidos em terrários no Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde permaneceram em terrários (73x41x52cm) para a habituação em temperatura local antes de iniciar os experimentos. Nos terrários havia uma porção com terra e outra com água para evitar a dessecação, além de folhas secas e galhos quebrados para simular o habitat natural. Durante a aclimação os animais foram alimentados com drosofilídeos e cupins *ad libitum*. Esses recursos visam simular o ambiente natural dos animais e desta maneira diminuir o estresse em laboratório (Figura 1 B).

#### Autorização de Coleta e Comitê de Ética

A coleta dos espécimes (RAN/IBAMA/MMA 18573-1) e todo o manuseio experimental e de eutanásia seguiram recomendações do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Botucatu, seguindo o *Guia de cuidados e uso de animais em laboratório* (Protocolo No. 70/07-CEEA).

---

### **Variação Térmica**

Para testar a condição de variação térmica, sessenta animais foram submetidos a hipertermia e hipotermia por meio de incubação em terrários em estufa incubadora B.O.D. (Modelo 121 FC) com variação térmica. Antes de cada experimento os terrários experimentais (28x21x15cm) foram preparados com 1,200 Kg de terra e 145 ml de água sendo que destes, 45ml foram colocados em um recipiente plástico e os restantes 100 ml foram distribuídos pela terra para umedecê-la (Figura 3A) . Ao iniciar cada experimento, a B.O.D. foi ajustada a fim de controlar a temperatura desejada. Para cada tempo (hora) experimental, foram colocados 2,0 litros de água na parte inferior da B.O.D., para garantir a umidade do ar dentro desta câmara. Além disto, o fotoperíodo foi ajustado respeitando o comprimento do dia na época de realização do experimento ao qual os animais estavam habituados, ou seja, se os animais eram colocados a noite na B.O.D., o fotoperíodo também era noite e ao amanhecer a luz se ascendia dentro da câmara. A cada tempo experimental, os terrários eram higienizados, renovando a terra e a água. O grupo controle (cinco animais) não foi submetido às condições de variação de temperatura (Figura 2 e 3A).

Cabe esclarecer que a metodologia utilizada consistiu em um experimento pioneiro, para estudos com anuros de regiões neotropicais. O cálculo dos 30% (trinta por cento) somados ou subtraídos da temperatura ambiente (27°C) em que os animais estavam acondicionados levou em consideração não somente a temperatura média registrada diariamente (3 vezes ao dia) no período em que os animais permaneceram nos terrários (no mínimo 7 dias) antes do início dos experimentos, como também a temperatura média anual registrada no ano anterior ao desenvolvimento do trabalho, visando observar os valores máximos e mínimos registrados na região. Com base nestes indícios, acreditamos que este percentual seja suficiente para causar respostas fisiológicas nestes animais, especialmente considerando que são organismos ectotérmicos. A faixa de variação da temperatura também procurou respeitar os ritmos biológicos naturais destes animais e sua capacidade

intrínseca de ajustes fisiológicos, pois não há relatos de distribuição estacional de anfíbios que ocorrem em nossa região em temperaturas extremamente elevadas ou baixas.

#### **Procedimentos experimentais:**

**Experimento de Hipertermia:** este foi realizado em três tempos (horas) experimentais, onde 30 animais foram utilizados para testar a condição hipertérmica, a qual consistiu na elevação da temperatura em 30% - medidos em graus Celsius - em relação à temperatura do ambiente (27°C) onde estavam aclimatados, resultando, portanto, uma temperatura de 35,1°C.

Para cada tempo experimental os animais foram mantidos individualmente em terrários dentro da câmara B.O.D. com temperatura de 35,1°C. Na primeira fase, 10 animais foram submetidos à condição de Hipertermia por 12 horas, dos quais 5 foram sacrificados *imediatamente* após o estímulo térmico, e os 5 restantes permaneceram em *recuperação* (a temperatura ambiente - 27°C) pelo mesmo tempo em que sofreram o estresse, ou seja, por 12h e em seguida sacrificados. Outros 10 animais foram colocados na B.O.D. em temperatura alta e permaneceram por 24 horas, onde 5 foram sacrificados *imediatamente* e os restantes ficaram em *recuperação* por 24 horas e em seguida sacrificados (segunda fase). Na terceira e última fase, 10 animais permaneceram por 48 horas com temperatura de 35,1°C e após este tempo, 5 foram *imediatamente* sacrificados e os demais, permaneceram por 48h para *recuperação* do estímulo e em seguida foram sacrificados.

**Experimento de Hipotermia:** este experimento também foi realizado em três tempos, onde outros 30 animais foram utilizados para testar esta condição térmica. Para cada tempo 10 animais foram mantidos em terrários dentro da câmara B.O.D. com temperatura de 30% (medidos em grau Celsius) abaixo da qual eles estavam



acondicionados (27°C), resultando um valor de 18,9°C na hipotermia. Na primeira fase, 10 animais permaneceram nesta condição por 12 horas, onde 5 foram sacrificados *imediatamente* após este período e os restantes ficaram em *recuperação* pelo mesmo tempo em que sofreram o estímulo (ou seja, por 12h) e em seguida sacrificados. Outros 10 animais permaneceram na mesma condição por 24 horas, onde 5 foram sacrificados *imediatamente* e os demais ficaram em *recuperação* por 24 horas e em seguida sacrificados (segunda fase). No terceiro tempo experimental, 10 animais permaneceram por 48 horas na B.O.D. na condição hipotérmica, sendo que 5 foram analisados *imediatamente* após este tempo, os 5 restantes permaneceram em *recuperação* por 48 horas e em seguida sacrificados.

A recuperação dos animais para ambos os experimentos, foi à temperatura ambiente (27°C) (Figura 3B). Para o grupo controle foram utilizados cinco exemplares que não foram submetidos à condição de variação térmica (hipertermia e hipotermia). Os animais do grupo controle foram sacrificados, fotografados e submetidos aos mesmos procedimentos morfológicos adotados para os animais que passaram pelos experimentos.

### **Descrição das Análises**

Antes e após cada condição experimental, os animais foram pesados (g) em balança analítica de precisão (0,01g) e medidos (cm) no comprimento rostro-cloacal. Fragmentos do fígado e os testículos foram pesados, e os eixos dos testículos foram medidos.

Ao término de cada experimento, os animais foram sacrificados por saturação de anestésico Benzocaína (0,5g /500 mL de água) e dissecados por meio de incisão mediana desde a cloaca até a altura da cintura dos membros anteriores, expondo os órgãos da cavidade para análises macroscópicas e fotodocumentação em microscópio estereoscópico (Leica MZ16) acoplado com sistema de captura de imagens (Image Manager-IM50).

## Quantificação das células pigmentares viscerais

Nesta etapa, foram descritas as características de ocorrência e distribuição dos melanócitos e a constituição do sistema pigmentar extracutâneo nos diversos órgãos e tecidos. As características estruturais e qualitativas das células pigmentares viscerais associadas aos órgãos e tecidos foram descritas seguindo o Protocolo de Quantificação das Células Pigmentares Viscerais (Franco-Belussi *et al.*, 2009), o qual é baseado na diferença de intensidade de pigmentação presente nos testículos de anuros, e neste estudo, foi aplicado nos demais órgãos da cavidade abdominal.

A classificação da pigmentação foi baseada na intensidade de pigmentação, presente na superfície do órgão, variando da ausência (Categoria 0) ao inteiramente pigmentado (Categoria 3), apresentando também as categorias 1 e 2 com gradual aumento de pigmentação (Tabela 1 e Figura 4). Neste trabalho, o protocolo de classificação da pigmentação foi aplicado em 12 regiões anatômicas pré-estabelecidas: 1- Pericárdio e vasos da base do coração; 2- Coração; 3- Pulmões; 4- Estômago; 5- Intestino; 6- Reto; 7- Rins e vasos renais; 8- Testículos; 9- Vesícula urinária; 10- Plexo nervoso lombar; 11- Peritônio parietal lombo-sacral e 12- Corpo adiposo.

**Tabela 1: Descrição das categorias de pigmentação**

<b>Categorias de Pigmentação</b>	<b>Descrição</b>
<b>0</b>	Expressa ausência total de células pigmentadas na superfície das estruturas analisadas, sendo evidente a coloração comum do órgão e vascularização evidente.
<b>1</b>	Consiste de poucas células pigmentadas constituindo uma discreta pigmentação
<b>2</b>	Compreende uma quantidade maior de células pigmentadas cuja presença mascara a coloração comumente descrita para o órgão ou estrutura.
<b>3</b>	Nesta, há presença massiva de células pigmentares, o que confere intensa pigmentação e obscurecimento da vascularização superficial com evidente alteração da cor usual descrita à estrutura ou órgão.

---

### **Análise Histológica**

Para esta análise pequenos fragmentos de fígado e testículo foram removidos, pesados, medidos e imediatamente imersos em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7,2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2,5%) e encaminhados à rotina histológica (Ribeiro e Lima, 2000) onde foram desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina (*Leica-historesin embedding kit*). Secções de 2 µm foram obtidas por meio de um micrótomo (*Leica RM 2265*); posteriormente os cortes foram corados com Hematoxilina/Eosina e observados em microscópio de luz (*Leica DM4000 B*) acoplado com sistema de captura de imagens (*Leica DFC 280*). Foram realizadas fotomicrografias dos cortes, e estas utilizadas nas análises da área das células pigmentadas presentes no tecido hepático e testicular.

A quantificação da porcentagem das células pigmentadas no fígado e no testículo, foi realizada com a utilização do programa *Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.* (versão 4.5), de acordo com a proposta de Lehr *et al.* (1997), com adaptações, a qual se baseia na diferença de intensidade de coloração para quantificar a expressão de receptores hormonais. Para a quantificação da pigmentação, foram analisados os 10 animais de cada tempo experimental (12h, 24h e 48h), sendo 5 animais analisados imediatamente ao estresse térmico (I) e 5 animais analisados após recuperar do estresse térmico (R). De cada animal foram selecionados 3 cortes do tecido (hepático e testicular) e destes, aleatorizados 15 campos histológicos. Assim, foi analisado um total de 150 campos histológicos para cada tempo experimental (12, 24 e 48 horas). Desta forma, para testar a hipertermia ou hipotermia foram analisados 450 campos histológicos e, portanto para testar a condição de variação térmica para cada órgão foi analisado um total de 900 campos histológicos (Esquema a seguir).

Órgão analisado: **Fígado**, p. ex.

Condição experimental: **Hipertermia**, p.ex.

12 horas: 5I → 15 campos cada = 75 campos }  
5R → 15 campos cada = 75 campos } n=150

24 horas: 5I → 15 campos cada = 75 campos }  
5R → 15 campos cada = 75 campos } n=150

48 horas: 5I → 15 campos cada = 75 campos }  
5R → 15 campos cada = 75 campos } n=150

n=450 por condição experimental

Portanto para cada órgão (Fígado e Testículo):

Condição de **Hipertermia** = 450 campos histológicos

Condição de **Hipotermia** = 450 campos histológicos

n=900 para testar a condição de variação térmica em cada órgão

Legenda: I = animais analisados *imediatamente* ao estresse térmico; R = animais analisados após *recuperar* do estresse térmico a temperatura ambiente (27°C).

### Análises Estatísticas

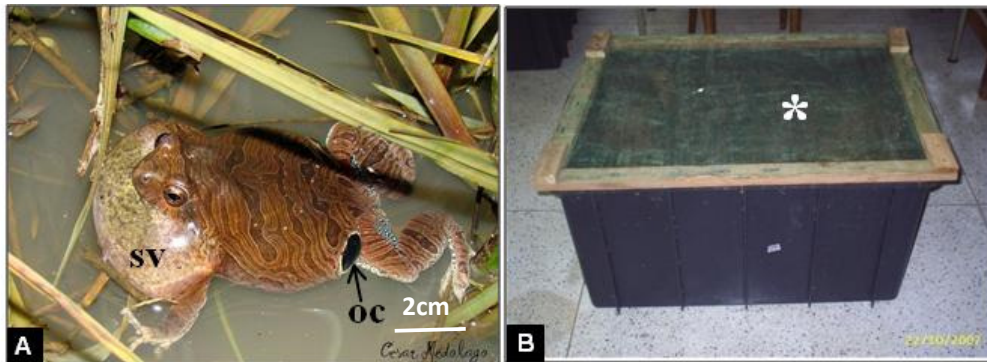
Depois de verificado a existência de valores discrepantes (*outliers*), foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, para testar a normalidade e quando necessário, os dados foram submetidos à normalização  $(x + 0,5)^{1/2}$ . Foram realizados testes de Análise de Variância *One Way* ANOVA para dados paramétricos e teste Kruskal-Wallis ANOVA para dados não-paramétricos. Foi considerado  $p \leq 0,05$  como referência para se atribuir significância estatística (Zar, 1999), sendo todas as análises realizadas no software BioStat (versão 4.5).

---

**IV – Agradecimentos**

Os autores agradecem à MSc. Lilian Franco-Belussi, ao MSc. Rodrigo Zieri, ao Biólogo Rinneu Elias Borges e ao Dr. Vitor Hugo M. Prado pelas contribuições nas revisões, coletas, procedimentos experimentais. Pelo suporte financeiro ao projeto agradecem também à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos: 02/08016-9, 05/02919-5), CNPq (Processo 475248/2007-4) e FUNDUNESP (Processo 01209/08 - DFP).

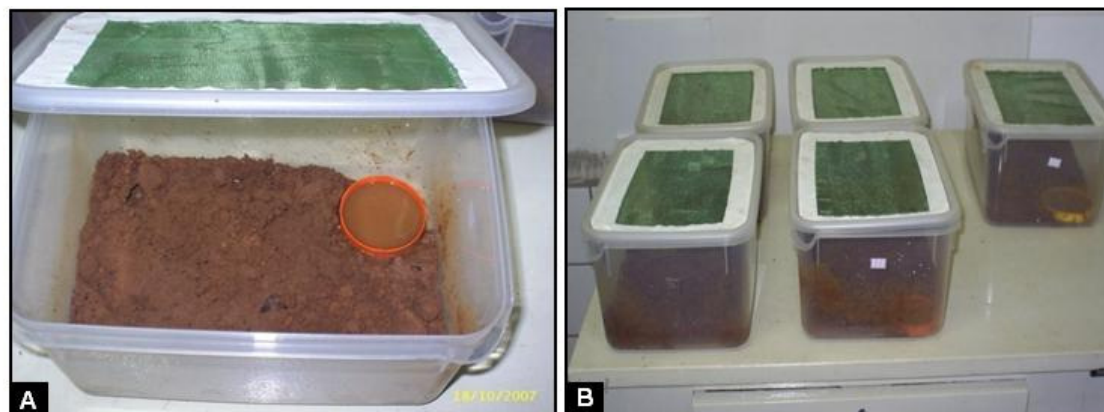
## V. – Figuras



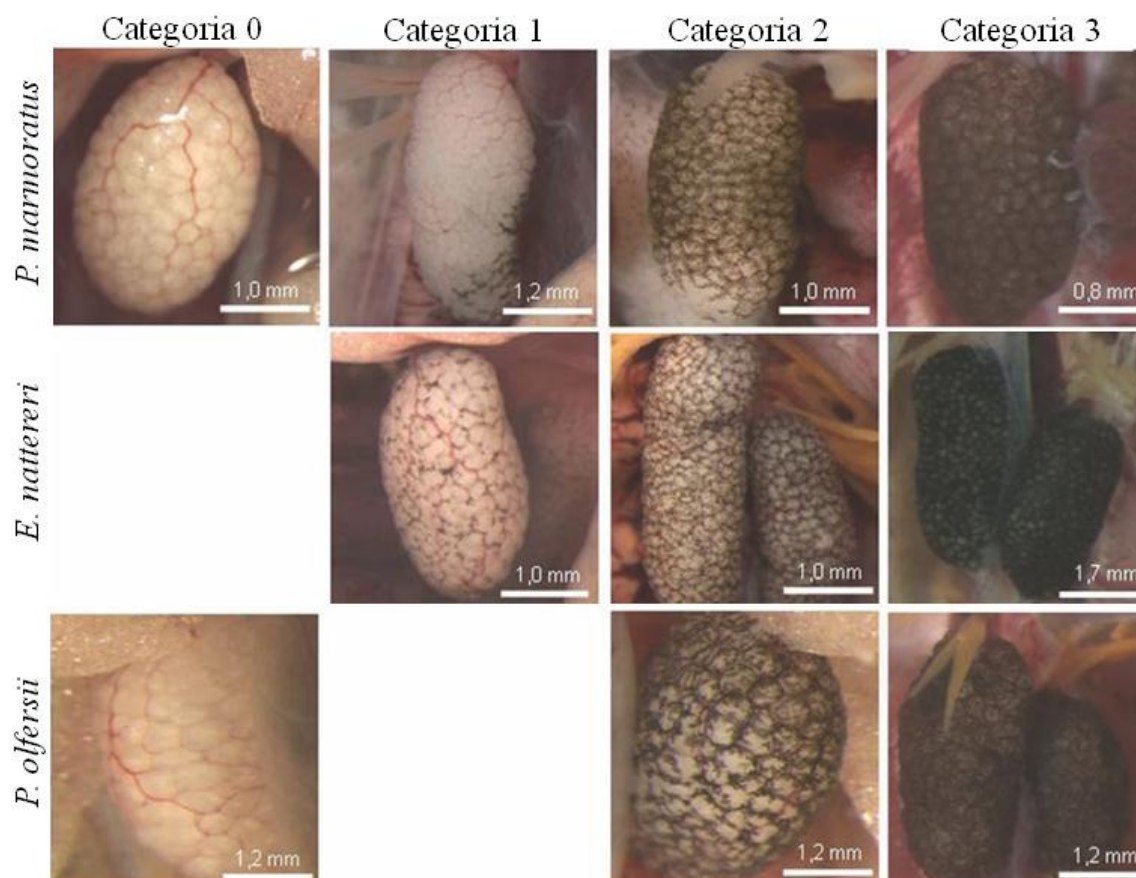
**Figura 1** A: Exemplar adulto macho da espécie *Eupemphix naterreri*. Indicações: saco vocal (sv) e a mancha ocelar (oc) na região inguinal. B: Terrário inicial (73x41x52cm) do período de aclimação em laboratório. Tampa com tela para circulação de ar (\*).



**Figura 2:** Distribuição dos terrários, cada um com um espécime de *Eupemphix naterreri*, dentro da câmara com controle de Temperatura – B.O.D. A: visão lateral da câmara; B: visão mais detalhada da distribuição dos terrários dentro da B.O.D.



**Figura 3:** Terrário onde os animais foram individualizados ao início dos experimentos. A: visão geral da parte interna dos terrários; B: Local de repouso dos animais em *recuperação*



**Figura 4:** Protocolo para a classificação da pigmentação visceral, baseado na diferença de intensidade de coloração dos testículos de representantes da família Leiuperidae. (Franco-Belussi *et al.*, 2009 – The Anatomical Record. v.292, 178-182 ).

---

**VI – Referências Bibliográficas**

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melanomacrophage centers in fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.11-31.
- AGIUS, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melanomacrophages of Teleost hematopoietic tissues and age-related changes. **Developmental and Comparative Immunology**. v.5, p.597-606.
- 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**. v.24, n.4, p.471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.499-509.
- AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). **Vestnik Zoologii**. v.32, n.3, p.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**. v.98, n.1, p.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**. v.272, p. 245-302.
- ASPENGREN, S.; NILSSON SKÖLD, H.; MARTENSSON, L.G.E.; QUIROGA, G.; WALLIN, M. 2003. Noradrenaline and melatonin-mediated regulation of pigment aggregation in fish melanophores. **Pigment Cell Research**. v.16, p.59-64.
- BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. p.11-59. *In: The Pigmentary System:*



- 
- Physiology and Pathophysiology.** New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> 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.** v.195, p.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.** v.200, p.185-194.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. 1995. Declive de las poblaciones de anfibios. **Investigación e Ciencia.** p.8-13.
- BOISSY, R.E.; HORNYAK, T.J. 2006. Extracutaneous melanocytes. p.91-107. In: **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology.** New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.
- BOISSY, R.E.; HUIZING, M.; GAHL, W.A. 2006. Biogenesis of melanosomes. p.155-170. In: **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology.** New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.
- BRASILEIRO, C.A.; SAWAYA, R.J.; KIEFER, M.C.; MARTINS, M. 2005. Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropica.** v.5, n.2, p.1-17.
- CÉSARINI, J.P.1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. **Advances in Space Research.** v.18, n.12, p.35-40.
- 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.** v.2, p.100-108.

- 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**. v.53, p.764-769.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. 1999. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill. 670p.
- ELLIS, A.E.; MUNRO, A.L.S.; ROBERTS, R.J. 1976. Defense mechanism in fish: Fate of intraperitoneally introduced carbon in the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Journal of Fish Biology**. v.8, p.67-78.
- 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. v.294, 240p.
- FEIO, R.N.; BRAGA, U.M.L.; WIEDERHECKER, H.; SANTOS, P.S. 1998. **Anfibios do Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 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**. v.60, p.259-268.
- 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**. v.52, p.88-89.
- FRANCO-BELUSSI, L. 2010. **Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo no anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)**.

- Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto/SP. 113p.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran testes: Anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record**. v.292, p.178-182.
- FRANGIONI, G.; BORGIOLO, G.; BIANCHE, S.; PILLOZZI, S. 2000. Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*. **Journal of Experimental Zoology**. v.287, p.120-127.
- FROST. 2010. Amphibian species of the world, 5.4, an online reference. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>. (Acesso em maio de 2010).
- FUJII, R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Research**. v.13, p.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**. v.15, p.32-40.
- GIARETTA, A.A. 1994. **Utilização de recursos e potencial reprodutivo dos leptodactídeos (Amphibia-Anura) de uma floresta semidecídua de altitude no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 123p.
- 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-SP. 156p.
- HADDAD, C.F.B. 1998. Biodiversidade dos anfíbios no Estado de São Paulo. p.15-26. In: JOLY, C.A. & BICUDO, C.E.M. (Orgs.) **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 6: Vertebrados**. São Paulo: FAPESP,

- HADLEY, M. E.; QUEVEDO, W. C. 1967. The role of epidermal melanocytes in adaptive color changes in amphibians. p.337-358. *In* MONTAGNA, W.; HU, F. (Eds.) *Advances in biology of the skin*. Pergamon Press, Glasgow.
- HEARING, V.J. 2006. The regulation of melanin formation. p.191-212. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1986. Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.12, p.117-126.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. **European Journal of Morphology**. v.29, n.2, p.89-102.
- 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, M.M. 1992. Erythrophagocytosis and pigment cells of the Amphibian liver. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v.113, p.82-84.
- KUSHIMOTO, T.; VALENCIA, J.C.; COSTIN, G.E.; TOYOFUKO, K.; WATABE, H.; YASUMOTO, K.I.; ROUZAUD, F.; VIEIRA, W.D.; HEARING, V.J. 2003. The melanosome: An ideal model to study cellular differentiation. **Pigment Cell Research**. v.16, p.237–244.
- LAND, E.J.; RAMSDEN, C.A.; RILEY, P.A. 2006. Toxicological aspects of melanin and melanogenesis. p.354-394. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.
- LEHR, H.A.; MANKOFF, D.A.; CORWIN, D.; SANTEUSANIO, G.; GOWN, A.M. 1997. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone

- 
- receptor expression in breast cancer. **The journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 45, n.11, p.1559-1565.
- LERNER, A. B.; FITZPATRICK, T.B. 1950. Biochemistry of melanin formation. **Physiology Review**. v.30, p.91-126.
- LINZEY, D. 2001. **Vertebrate biology**. McGraw-Hill, New York. 1ª ed. 596p. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v.113, p.82-84.
- MARKS, M.S.; SEABRA, M.C. 2001. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**. v.2, p.1-11.
- 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. 134p.
- MCGRAW, K.J. 2005. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? **Review Animal Behavior**. v.69, p.757-764.
- MITTERMEIER, R.A.; WERNER, T.; AYRES, J.M.; FONSECA, G.A.B. 1992. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**. v.14, n.81, p.20-27.
- NASCIMENTO, A.A.; ROLAND, J.T.; GELFAND, V.I. 2003. Pigment cells: A model for the study of organelle transport. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.19, p.469-491.
- OLIVEIRA, C. 2007. **Anatomia do Aparelho Reprodutor e Sistema Pigmentar Extracutâneo em anuros**. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP. 151p.
- 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**. v.11, n.1, p.39-46.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. v.20, n.3, p.263-268.
- ORR, R.T. 1986. **Biologia dos vertebrados**. 5ª ed. Editora Roca, São Paulo. 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. 175p.
- POUGH, F.H.; CHRISTINE, M.J.; HEISER J.B. 2003. **A vida dos vertebrados**. 3ª ed. Atheneu, São Paulo. 699p.
- PRELOVISEK, P.; BULOG, B. 2003. Biogenesis of melanosomes in kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). **Pigment Cell Research**. v.16, p.345-350.
- PROTA, G. 1992. Melanins and melanogenesis. **Academic Press**, New York. 290p.
- RABB, G.B. 1990. Declining amphibian population. **Species**. v.13, p.33-34.
- RAPOSO, G.; MARKS, M.S. 2007. Melanosomes: dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature*. v.8, p.786-797.
- RIBEIRO, M.G.; LIMA, S.R. 2000. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Editora Belo Horizonte: Segprac. 89p.
- ROBERTS, R.J. 1975. Melanin-containing cells of Teleost fish and their relation to disease. *In*: Ribelin, W.E.; MIGAKI, G. (Eds.). **The Pathology of fishes**. University of Wisconsin Press, Madison, p.399-428.
- 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.
- ROSSA-FERES, D.C.; JIM, J. 2001. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia.** v.18, n.2, p.439-454.
- ROZANOWSKA, 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 and Medicine.** v.26, p.518-525.
- SARNA, T.; SZEWCZYK, G.; ZADLO, A. 2008. Melanin and oxidative reactions. p.147-158. *In: Free radicals in ophthalmic disorders.* New York. 217p.
- SBH. 2010. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. **Sociedade Brasileira de Herpetologia** (SBH). Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>. (Acesso em maio 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.** v.10, p.271-287.
- SUGIMOTO, M. 2002. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology. **Microscopy Research and Technique.** v.58, p.496-503.
- SUGIMOTO, M.; UCHIDA, N.; HATAYAMA, M. 2000. Apoptosis in skin pigment cells of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei), during long-term chromatic adaptation: The role of sympathetic innervation. **Cell Tissue Research.** v.301, p.205-216.
- VITT, L.J.; CALDWELL, J.P.; WILBUR, H.M.; SMITH, D.C. 1990. Amphibians as harbingers of decay. **Bioscience.** v.40, 418p.
- WALLIN, M. 2002. Nature's palette: How animals, including humans, produce colours. **Bioscience Explained.** v.1, n.2, p.1-12.

- 
- 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**. v.243, p.249-155.
- 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**. v.290, p.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**. v.61, n.4, p.305-316.



## **VII - Apresentação dos trabalhos**

O trabalho sobre efeitos da variação da temperatura no sistema pigmentar extracutâneo, resultou na elaboração de três manuscritos, como segue:

### **Descrição da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) frente à variação de temperatura**

Santos, L. R. S.; Franco-Belussi, L. F.; Zieri, R.; Borges, R. E.; Oliveira, C.

*Revista: Zoologischer Anzeiger*

Síntese: Este trabalho buscou verificar a resposta das células pigmentadas na superfícies dos órgãos frente à variação de temperatura por hipertermia e hipotermia em animais analisados imediatamente após o estresse. É observada conspícua pigmentação na superfície de vários órgãos, e estímulos de temperatura não promovem variação nessa pigmentação visceral superficial. Assim, anatomicamente, foi estabelecido o padrão macroscópico da pigmentação da espécie, bem como o grau de variabilidade anatômica interindividual.

---

**Efeito da hipertermia e hipotermia na pigmentação hepática do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)**

**Effects of hyperthermia and hypothermia on the hepatic pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)**

Santos, L. R. S.; Franco-Belussi, L. F.; Zieri, R.; Borges, R. E.; Oliveira, C.

*Revista: Journal of Experimental Zoology*

Síntese: Este trabalho objetivou a análise das células pigmentares presentes no tecido hepático frente à condição de alta e baixa temperatura. As análises permitiram concluir que o estresse térmico, seja ele devido ao aumento ou diminuição da temperatura, promove uma diminuição da pigmentação hepática, e que o cessar do estímulo promove a restauração da quantidade de pigmentação neste órgão, como observado nos animais do grupo controle.

**Varição térmica e pigmentação testicular de *Eupemphix nattereri* (Anura:  
Leiuperidae)**

Santos, L. R. S.; Franco-Belussi, L. F.; Zieri, R.; Borges, R. E; Oliveira, C.

*Revista: The Anatomical Record*

Síntese: Neste estudo, buscamos verificar a resposta das células pigmentares, melanócitos, presentes no estroma testicular do anuro *E. nattereri*, quando este é submetido a condições de hipotermia e hipertermia, e concluímos que estas células manifestam alterações frente aos estímulos térmicos, com aumento da pigmentação no interstício testicular.

## **Capítulo 1**

### **Descrição da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) frente à variação de temperatura**

**Descrição da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)  
frente à variação de temperatura**

SANTOS, L.R.S.<sup>1,2</sup>; FRANCO-BELUSSI, L.<sup>2</sup>; ZIERI, R.<sup>2</sup>; BORGES, R.E.<sup>3</sup>; OLIVEIRA, C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano - IFG/Campus Rio Verde. Rodovia Km1, s/n. Cep: 75908-000 - Rio Verde - GO, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (UNESP/IBILCE)

<sup>3</sup>Universidade de Rio Verde – GO (FESURV)

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista – Departamento de Biologia (UNESP/IBILCE)

Manuscrito a ser submetido: *Zoologischer Anzeiger*

**\*Corresponding Author:**

Lia Raquel de Souza Santos

Instituto Federal Goiano – IFG/Campus Rio Verde - GO

Rodovia Sul Goiana Km 01 – Zona Rural

Cep: 75.908-000 - Rio Verde, GO, Brasil

Phone: +55 64 3620 5632

e-mail: [liaborges.rv@ifgoiano.edu.br](mailto:liaborges.rv@ifgoiano.edu.br)

**Resumo:** Anfíbios possuem um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos. A função dessas células pigmentares nos órgãos viscerais ainda não está plenamente definida, e algumas hipóteses têm sido apresentadas em trabalhos científicos. Esse estudo visa descrever a pigmentação visceral do anuro *Eupemphix nattereri* submetidos ao frio (hipotermia: 18,9°C) e ao calor (hipertermia: 35,1°C) e, analisa a resposta pigmentar na superfície dos órgãos. Para o estudo, utilizou-se 65 exemplares de *E. nattereri*, coletados em São José do Rio Preto-SP (20°49' 12,65"S e 49°22' 46,85" W). Os animais (n=60), após serem submetidos à condição térmica, foram eutanasiados e a pigmentação visceral analisada de acordo com o protocolo de quantificação que se baseia na intensidade de pigmentação e dividida em categorias. Foi observado uma conspícua pigmentação na superfície dos órgãos, e estes tipos celulares, apresentam desde um aspecto puntiforme ao dendrítico. No aparelho cárdio-respiratório (pericárdio, coração, vasos da base cardíaca e pulmão) houve predominância de aumento gradual de pigmentação (categorias 1 e 2 em ambos os experimentos. No sistema digestório houve pouca pigmentação na superfície dos órgãos, com predominância da categoria 0 no estômago e intestino. O maior grau de pigmentação (categoria 3) foi observado apenas nas gônadas. Em regiões como o peritônio parietal lombossacral e plexo nervoso lombar a pigmentação predominante ocorreu nas categorias 1 e 2 (baixa pigmentação). Já a vesícula urinária e corpos adiposos são desprovidos de pigmentação. Em síntese, a variação encontrada na pigmentação visceral, não diferiu da relatada para esta espécie, sendo possível estabelecer um padrão anatômico de pigmentação extracutânea para a *E. nattereri*, e determinar que a variação térmica não promoveu alterações na ocorrência e intensidade da pigmentação visceral.

**Palavras-chave:** Pigmentação visceral, temperatura, anuro.

**Abstract:** Amphibians bear an extracutaneous pigmentary system, made up of melanin-containing cells, in several tissues and organs. The function of these pigmentary cells in the visceral organs is not fully defined yet, and some hypotheses have been presented. Our aim in this study was to describe the visceral pigmentation of the anuran *Eupemphix nattereri* submitted to low (hypothermia: 18.9°C) and high temperature (hyperthermia: 35.1°C) and, to analyze the response of the pigmentation on the surface of the organs. In this study, it was used 65 specimens of *E. nattereri*, collected in São José do Rio Preto. The specimens (n=60), after being submitted to the thermal variation, were euthanasiated and the visceral pigmentation was analyzed according to the quantification protocol which is based on the intensity of pigmentation, varying from total absence (Category 0) to fully pigmented (Category 3), presenting as well the categories 1 and 2 with a gradual increase in pigmentation. It was observed a conspicuous pigmentation on the surface of the organs and these cellular types, present from a punctiform to a dendritic aspect, easily identified in macroscopic view. In the cardiorespiratory system (pericardium, heart, cardiac base vessels and lungs) there was a prevalence of categories 1 and 2 in the two experiments. In the digestory system there is little pigmentation on the surface of organs, with prevalence of category 0 on the stomach and intestine. The higher degree of pigmentation (category 3) was observed only on the gonads. In regions, such as the parietal lombossacral peritoneum and lumbar nerve plexus, the dominant pigmentation is that of the categories 1 and 2. The urinary vesicle and fatty bodies lack pigmentation. In sum, the variation found in the visceral pigmentation is not different from what is already reported for that species, being possible to establish an anatomical pattern of extracutaneous pigmentation for *Eupemphix nattereri*. We also concluded that the thermal variation does not promote changes in the occurrence and intensity of visceral pigmentation.

**Key-words:** Visceral pigmentation, temperature, anuran.

## **Introdução**

As células pigmentares responsáveis pela cor na pele são chamadas de cromatóforos, se originam do tubo neural durante o desenvolvimento do embrião, migrando para a derme e epiderme (Wallin, 2002). A capacidade de mudança de cor observada nos animais ocorre por meio de alterações nestes tipos celulares. Esta mudança de coloração pode ser de origem morfológica e fisiológica. A mudança morfológica é causada por alterações no número de cromatóforos e deposição de pigmentos na pele (Sugimoto, 2002; Hadley e Quevedo, 1967). Já a mudança fisiológica, é definida como uma rápida mudança de cor causada por um movimento intracelular de organelas que contêm pigmentos (Bagnara e Matsumoto, 2006).

Nos vertebrados ectotérmicos, células pigmentares não estão apenas restritas à derme, sendo frequentemente encontradas em órgãos internos tais como fígado, baço, pulmões, coração, timo, gônadas, vasos sanguíneos e meninges, constituindo o sistema pigmentar extracutâneo (Bagnara e Matsumoto, 2006; Oliveira e Zieri, 2005; Gallone *et al.*, 2002). Nesses animais as células semelhantes aos melanóforos, os melanócitos (Oliveira, 2007; Zieri *et al.*, 2007; Oliveira e Zieri, 2005; Zuasti *et al.*, 1998; Agius e Agbede, 1984), produzem e armazenam melanina no interior de estruturas esféricas ou ovóides denominadas melanossomos (Agius e Roberts, 2003). Ainda constituindo este sistema pigmentar, são observadas em órgãos com função hematopoéticas, células pigmentadas com atividade macrofágica conhecidas como melanomacrófagos (Agius e Agbede, 1984; Agius, 1980). Estas células residentes no fígado de anfíbios são também conhecidas como células de Kupffer (Prelovsek e Bulog, 2003; Sichel *et al.*, 1997; Zuasti *et al.*, 1998) e apresentam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como melanina, hemossiderina e lipofuscina, derivados da degradação de material celular fagocitado (Franco-Belussi, 2010; Herraes e Zapata, 1991; Agius e Agbede, 1984). Outras células como os xantóforos, leucóforos,



eritróforos e iridóforos também contêm pigmentos conferindo diversas cores, como amarelo, branco, vermelha e metálica (Aspengren *et al.*, 2009).

Sabe-se que dispersão dos grãos de melanina nas células pigmentares dos vertebrados é regulada por distintos fatores fisiológicos, incluindo hormônios, tais como  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulante da melanina), o MCH (hormônio concentrador da melanina), a melatonina, hormônios sexuais e catecolaminas (Hearing, 2006; Bagnara e Matsumoto, 2006). Entretanto, a função das células pigmentares nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos não tem sido ainda plenamente definida, e várias hipóteses têm sido propostas (Gallone *et al.*, 2002), tais como funções citoprotetoras relacionadas aos radicais livres (Mcgraw, 2005), detoxificação por poluentes (Fenoglio *et al.*, 2005), alterações estruturais e metabólicas do fígado durante a hibernação (Barni *et al.*, 1999) e proteção contra agentes infecciosos (Franco-Belussi, 2010).

Sobre a pigmentação extracutânea há trabalhos relacionados à atividade fagocítica das células pigmentares do fígado. Contudo, as células pigmentares dos demais órgãos internos não têm sido muito estudadas até o momento e pouco se sabe sobre as suas possíveis funções (Boissy e Hornyak, 2006). Alguns estudos utilizam a pigmentação presente no intestino e testículo de algumas espécies de anuros como um caráter taxonômico (Grant *et al.*, 2006). Outros, como o realizado por Franco-Belussi *et al.* (2009) propõe um protocolo de quantificação que estabelece uma relação entre as células pigmentares presentes no testículo e a coloração que promove ao órgão, características possivelmente associadas às propriedades morfotípicas intrínsecas às espécies da família analisada. Outros aspectos ainda pouco explorados se referem a trabalhos relacionados à alteração das células pigmentares viscerais em resposta a sazonalidade (Moresco e Oliveira, 2009).

Assim, esse estudo visa descrever a pigmentação visceral na superfície dos órgãos do anuro *Eupemphix nattereri* e analisar macroscopicamente a resposta desta pigmentação frente a variações experimentais de temperatura.

### **Material e Métodos**

Foram utilizados 65 machos adultos da espécie *Eupemphix nattereri*, coletados (RAN/IBAMA/MMA 18573-1) no município de São José do Rio Preto – SP (20°49'12,65"S e 49°22'46,85" W), em época de atividade reprodutiva, que ocorreu no período chuvoso (Novembro de 2007 a Fevereiro 2008). Os exemplares foram conduzidos ao Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, e mantidos em terrários (73x41x52cm) para a habituação antes de iniciar os experimentos.

Os animais do grupo controle (n=5) permaneceram nos terrários à temperatura ambiente (27°C), sendo analisados após o período experimental. Todo o manuseio experimental e de eutanásia dos animais seguiu as recomendações do comitê de ética e de experimentação animal da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Botucatu, e o *Guia de cuidados e uso de animais em laboratório* (Protocolo No. 70/07-CEEA).

Para o estresse térmico, os animais (n=60) foram submetidos à variação de temperatura por hipotermia (18,9°C) e hipertermia (35,10°C) em estufa incubadora para B.O.D. (Modelo 121 FC). A elevação ou diminuição da temperatura, para aplicar a condição hipertérmica ou hipotérmica, foi calculada considerando um percentual de 30% acrescido ou diminuído da temperatura ambiente (27°C), a partir da habituação dos animais em terrário. Este cálculo levou em consideração não somente a temperatura média registrada diariamente no período em que os animais permaneceram nos terrários, antes do início dos experimentos, como também a temperatura média anual registrada no ano anterior ao desenvolvimento do trabalho, visando observar os valores máximos e mínimos

registrado, e, portanto, toleráveis para estes organismos. Esta metodologia, pioneira para estudos em anuros, teve como objetivo padronizar valores térmicos compatíveis ao clima regional onde estes organismos são encontrados, respeitando assim seus limites fisiológicos.

### **Procedimentos experimentais:**

**Experimentos de Hipertermia e Hipotermia:** Nestes experimentos, os animais foram submetidos à exposição ao calor (35,1°C) e ao frio (18,9°C), em três tempos diferentes (12h, 24h e 48h). Trinta indivíduos de *Eupemphix nattereri* foram utilizados para testar a condição de elevação de temperatura e outros trinta indivíduos, da mesma espécie, para testar a condição de hipotermia. Para cada tempo experimental, dez animais foram mantidos dentro da câmara B.O.D. sob as temperaturas do experimento (35,1°C e 18,9°C). Destes, cinco animais foram analisados imediatamente após o tempo de exposição à temperatura; e os cinco exemplares restantes foram retirados da B.O.D. e analisados após permanecerem em recuperação à temperatura ambiente (27°C) pelo mesmo período em horas em que foram submetidos ao estresse. Entretanto, para verificar o efeito imediato da temperatura sobre as células pigmentares, foram utilizados apenas os animais analisados imediatamente ao estresse térmico. Os animais recuperados, juntamente com os animais do tratamento imediato foram observados para estabelecer o padrão de descrição anatômico da pigmentação visceral, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos.

### **Análise morfológica:**

Ao término de cada experimento, os animais foram eutanasiados com o anestésico benzocaína e dissecados por meio de incisão mediana, desde a cloaca até a altura da cintura dos membros anteriores, expondo os órgãos da cavidade para análises macroscópicas e fotodocumentação em microscópio estereoscópico (*Leica MZI6*), acoplado com sistema de captura de imagens (*Leica DFC 280*).

Nesta fase, foram descritas as características estruturais e qualitativas das células pigmentares viscerais associadas aos órgãos e tecidos, seguindo o Protocolo de Quantificação das Células Pigmentares Viscerais (Franco-Belussi *et al.*, 2009), o qual é baseado na diferença de intensidade de pigmentação presente na superfície dos testículos de alguns anuros. A classificação da pigmentação é baseada na intensidade de pigmentação, variando da ausência (Categoria 0) ao inteiramente pigmentado, quando uma intensa coloração escura é observada (Categoria 3 - intensidade máxima), apresentando também as categorias 1 e 2 com gradual aumento de pigmentação.

Neste trabalho, o protocolo de classificação da pigmentação visceral foi aplicado em 12 regiões anatômicas pré-estabelecidas: 1- Pericárdio e vasos da base do coração; 2- Coração; 3- Pulmões; 4- Estômago; 5- Intestino; 6- Reto; 7- Rins e vasos renais; 8- Testículos; 9- Vesícula urinária; 10- Plexo nervoso lombar; 11- Peritônio parietal lombosacral; 12- Corpo adiposo.

## Resultados

Em *Eupemphix nattereri*, células contendo melanina foram encontradas, além da pele, na superfície dos órgãos e em alguns tecidos da cavidade abdominal, em diferentes proporções. Ao microscópio estereoscópico, foi possível verificar que esses tipos celulares são grandes e irregulares, variando do aspecto dendrítico (devido à presença de prolongamentos citoplasmáticos), ao puntiforme (quando não se observa esses prolongamentos) (Figura 1).

No aparelho cárdio-respiratório do anuro *E. nattereri* foi observada conspícua pigmentação nas estruturas analisadas (pericárdio e vasos da base cardíaca, pulmões e coração) em todos os animais do experimento de hipotermia quanto de hipertermia, sendo observada pouca pigmentação nessas regiões (categorias 0, 1 e 2). (Figura 2) e (Figuras 5 e 6).

O sistema digestório é o que apresenta menor quantidade de pigmentação, onde o predomínio é de ausência pigmentar no estômago e intestino em todos os animais analisados de ambos os experimentos (hipertermia e hipotermia). Entretanto há conspícua presença de categoria 1 em poucos animais que sofreram estresse hipertérmico e hipotérmico nessa região. A região final do trato digestório, especificamente o reto, apresenta pigmentação nas categorias 1 e 2 em todos os animais analisados de ambos os experimentos (Figura 3) e (Figuras 7 e 8).

No aparelho urogenital é onde se observa maior grau de pigmentação, categoria 3, sendo essa intensa pigmentação encontrada apenas nos testículos, em ambos os experimentos (hipertermia e hipotermia). Na vesícula urinária não há ocorrência de células pigmentares viscerais em nenhum dos animais analisados. Já na face dorsal dos rins e vasos renais, há predomínio de pouca pigmentação (categoria 1) em todos os animais analisados de ambos os experimentos. Na condição hipertérmica, porém, foi observado

também a categoria 2 de pigmentação nessas regiões, em apenas 20% dos animais (Figura 4A, B e C) e (Figuras 9 e 10).

Nas demais estruturas analisadas, verificamos que os corpos adiposos, não apresentam células pigmentares (categoria 0) e o plexo nervoso lombar, apresenta predominância de pouca pigmentação (categorias 1 e 2) em ambos os experimentos. Já no peritônio lombossacral da condição hipertérmica, foi verificada predominância de pigmentação nas categorias 1 e 2; e na condição hipotérmica esta mesma região apresentou apenas categoria 1 (Figura 4B e D) e (Figuras 11 e 12).

Com base na pigmentação apresentada pelos animais dos tratamentos experimentais, foi possível verificar a ocorrência e intensidade desta pigmentação e assim estabelecer um padrão de pigmentação visceral para a espécie *E. nattereri* (Tabela 1).

## Discussão

Células contendo pigmentos melânicos estão presentes em vários órgãos e tecidos, principalmente no tecido conjuntivo (interstício) ou externamente associada às túnicas adventícias ou membranas serosas dos órgãos (Franco-Belussi *et al.*, 2010; Moresco e Oliveira, 2009; Oliveira e Zieri, 2005; Galone *et al.*, 2002). Estas células são grandes e irregulares, observadas ao estereomicroscópio, possuem citoplasma intensamente pigmentado e podem apresentar-se com formato dendrítico ou puntiforme, devido à presença ou ausência de prolongamentos citoplasmáticos, respectivamente (Zieri *et al.*, 2007; Oliveira e Zieri, 2005).

Variações de intensidade de pigmentação visceral em órgãos e tecidos da cavidade abdominal são observadas em várias espécies de anuros (Franco-Belussi *et al.*, 2010; Moresco e Oliveira, 2009), inclusive nos hilídeos, como relatado por Oliveira e Zieri (2005). Nestes organismos, a presença destes tipos celulares é muito menor quando comparado com a espécie *E. nattereri*, representante da família Leiuperidae.

Em regiões do pericárdio, coração, estômago, intestino, rins e vasos renais, a pigmentação encontrada nos espécimes de *E. nattereri* analisado neste trabalho, tratados com variações de temperatura, é semelhante ao relatado por Moresco e Oliveira (2009) para as espécies *Rhinella schneideri* e *Physalaemus cuvieri* durante o período reprodutivo dessas espécies; que apresenta um predomínio de discreta pigmentação (categoria 1) no pericárdio. Nos órgãos do sistema digestório (estômago e intestino) o predomínio da ausência de pigmentação observada em *E. nattereri*, também foi relatada em *R. schneideri* e *P. cuvieri* (Moresco e Oliveira, 2009), e nas espécies do gênero *Dendropsophus* (Franco-Belussi *et al.*, 2010) durante o período reprodutivo. Em adição, a pouca pigmentação observada no coração de *E. nattereri*, submetido à variação térmica, é semelhante à descrita para *Dendropsophus elianeae* e *D. sanborni*; enquanto para a espécie *D. nanus* há

presença de maior grau de pigmentação (categoria 2) nesse órgão (Franco-Belussi *et al.*, 2010).

Em regiões como peritônio parietal lombo-sacral e plexo nervoso lombar, em *E. nattereri*, há ocorrência de pigmentação distribuída nas categorias 1 e 2, é semelhante ao relatado para a espécie *P. cuvieri* (Moresco e Oliveira, 2009), espécies que compartilham o mesmo tipo habitat e praticamente o mesmo período reprodutivo.

Dentre os poucos estudos que descrevem as células pigmentares, destacam-se os que envolvem o aparelho urogenital dos anuros, contudo, para a maioria das espécies, não são descritas células pigmentares nas gônadas. Alguns autores relatam uma íntima relação dos melanócitos viscerais com o sistema vascular de vários órgãos, e também com as membranas conjuntivas associadas (Franco-Belussi *et al.*, 2009; Zieri *et al.*, 2007; Oliveira e Zieri, 2005). Especificamente nas gônadas de *E. nattereri*, assim como relatado em *P. cuvieri* e *P. fuscomaculatus*, tanto no interstício como na túnica albugínea, a ocorrência é intensa, conferindo ao testículo uma coloração preta completa ou mesclada de preto (Zieri *et al.*, 2007; Oliveira e Zieri, 2005; Oliveira *et al.*, 2002 e 2003).

A intensa pigmentação testicular (categoria 3) encontrada em *E. nattereri*, foi igualmente relatada para esta mesma espécie por Franco-Belussi *et al.* (2009) e Oliveira e Zieri (2005), assim como para *P. cuvieri*, durante a estação reprodutiva (Moresco e Oliveira, 2009). Contudo, para *R. schneideri* a pigmentação é discreta (categoria 1) variando durante o período reprodutivo (Moresco e Oliveira, 2009). Em espécies como *D. nanus*, *D. minutus*, *D. elianae* e *D. sanborni* não foi relatada pigmentação nas gônadas em animais coletados durante o período reprodutivo (Franco-Belussi *et al.*, 2010). Em *E. nattereri*, animais infectados com *Escherichia coli* foi constatada diminuição na pigmentação na superfície testicular (Franco-Belussi, 2010); já no presente estudo, não foi constatada alterações na ocorrência da pigmentação gonadal em *E. nattereri*.



A presença e o modo de ocorrência dos tipos celulares viscerais contendo pigmentos são muito variáveis e estão associados com diversos órgãos e estruturas manifestando evidentes variações anatômicas interespecíficas e intra-individuais (Oliveira e Zieri, 2005). Em nosso estudo, foi possível verificar que a pigmentação na superfície dos órgãos de *E. nattereri*, varia da categoria 0 à 3, sendo esta última observada somente nas gônadas, conferindo uma coloração escura a este órgão.

Embora a função das células pigmentares viscerais nestes órgãos ainda seja desconhecida, Franco-Belussi *et al.* (2009), utilizaram esta pigmentação para diferenciar anuros de duas famílias (Leptodactylidae e Leiuperidae), gerando um padrão para a classificação pigmentar desse órgão, e desta maneira sugerindo um caráter filogenético para a pigmentação. Estudos realizados por Grant *et al.* (2006) também usaram a pigmentação gonadal e a pigmentação do reto como um caráter filogenético para anuros da família Dendrobatidae.

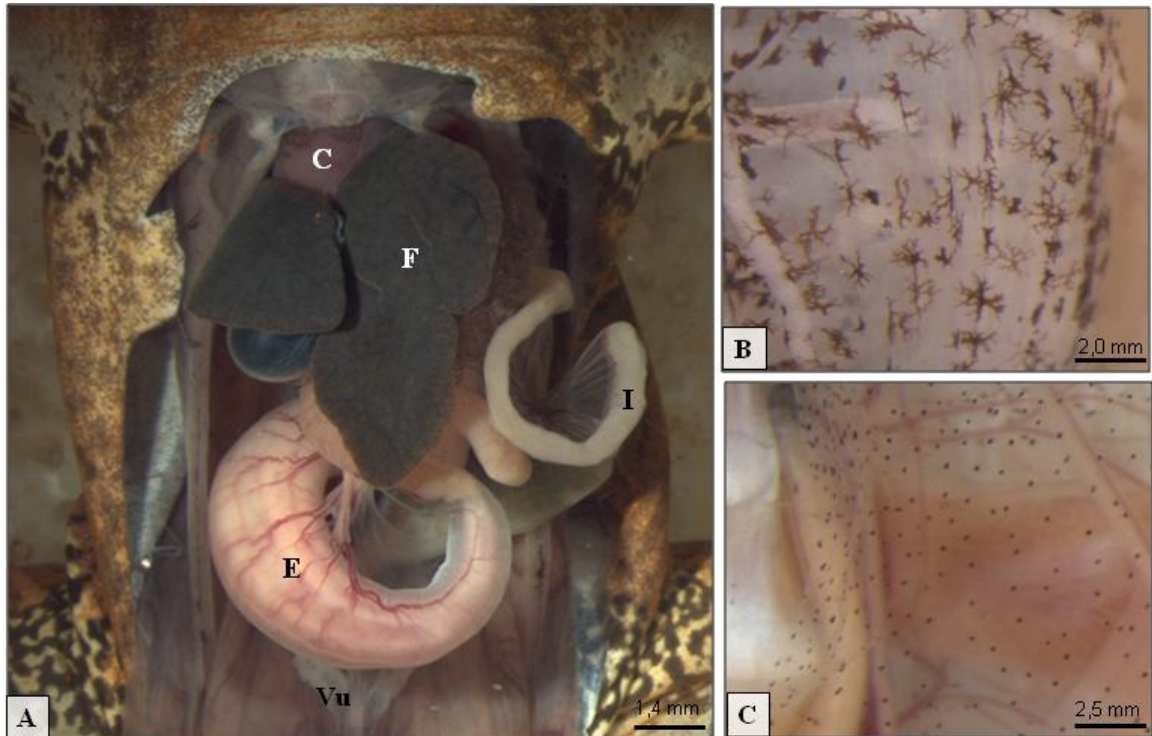
Neste trabalho, verificou-se que o efeito da variação térmica não promoveu modificações notórias na intensidade de pigmentação de alguns órgãos do anuro *E. nattereri*, sendo interpretado que estas variações estão de acordo com padrão descrito para esta espécie por Franco-Belussi *et al.* (2009) e Oliveira e Zieri (2005). Em adição, verificou-se também que apenas o intestino, passou a apresentar uma discreta pigmentação mais intensa que o padrão anatômico, mas não ao ponto de afirmar qualquer relação com os experimentos. Os estudos realizados por Franco-Belussi (2010) e Moresco e Oliveira (2009) verificaram que fatores como agentes infecciosos e ciclos reprodutivos interfere na pigmentação visceral superficial, principalmente das gônadas. Entretanto, inferimos que o padrão anatômico de pigmentação extracutânea, sob análise macroscópica não pode ser modulado por variação de temperatura, e desta forma pode-se estabelecer um padrão de descrição anatômica do sistema pigmentar extracutâneo para *E. nattereri*. Contudo, este sistema deve ser melhor estudado para entender a sua possível função à luz da morfologia

microscópica, já que este mesmo estudo detectou diferença na área pigmentar do testículo (Santos, 2010). Assim, contrapondo estudos de resolução macroscópica com análises morfológicas microscópicas (Santos, 2010), podemos afirmar que esse sistema de pigmentação visceral pode ser modulado por fatores abióticos.

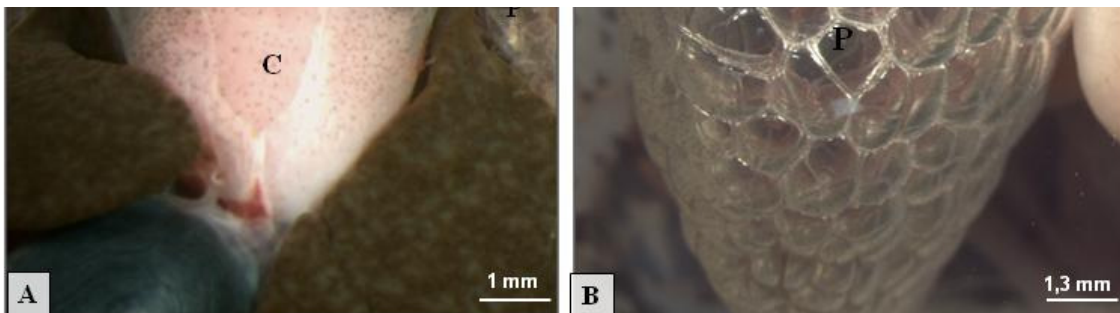
## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 02/08016-9, 05/02919-5), CNPq (Processo 475248/2007-4) e FUNDUNESP (Processo 01209/08 - DFP) pelo suporte financeiro ao projeto.

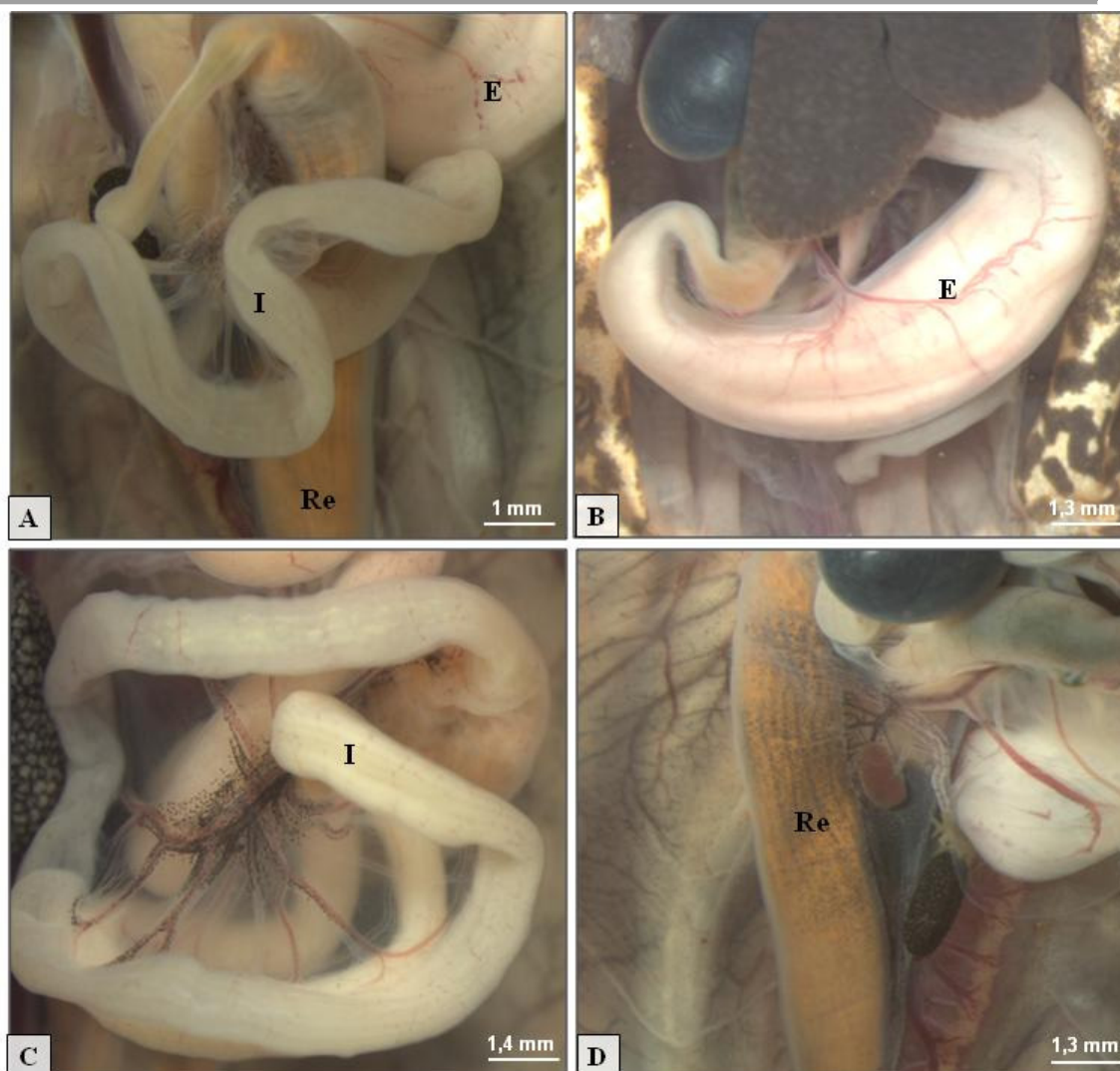
## Figuras



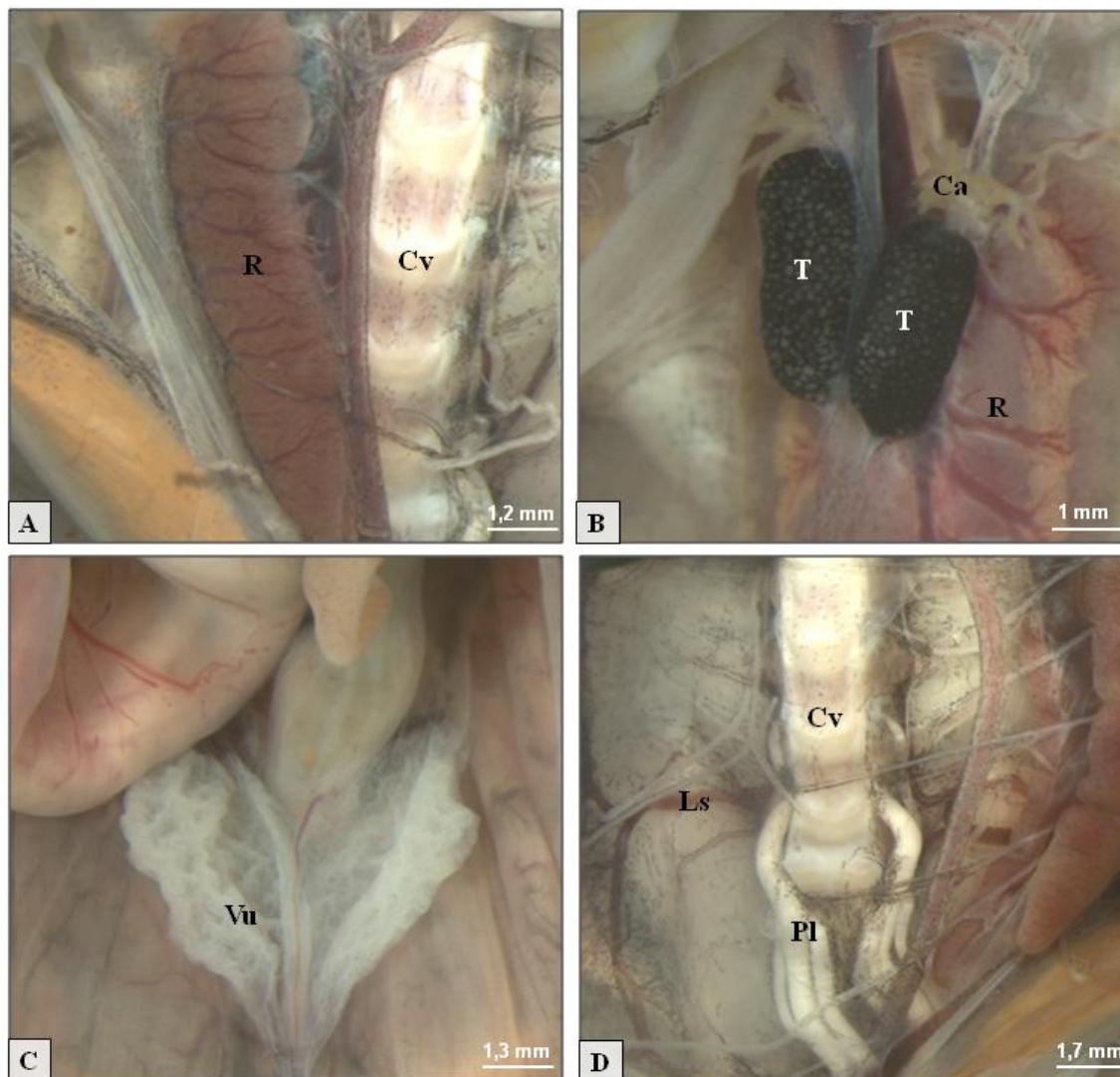
**Figura 1:** A: Vista geral da cavidade abdominal do anuro *Eupemphix nattereri* evidenciando os órgãos. B: Aspecto dendrítico das células pigmentares viscerais no peritônio parietal. C: Aspecto puntiforme das células pigmentares no peritônio parietal. C: Coração. F: Fígado. I: Intestino. E: Estômago. Vu: vesícula urinária.



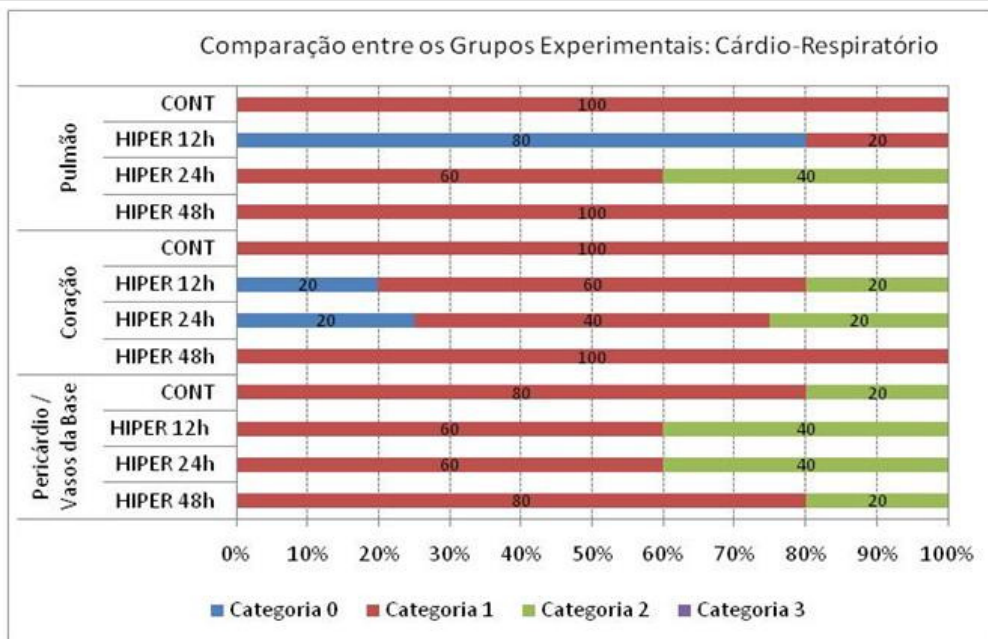
**Figura 2:** Detalhe dos órgãos e estruturas do aparelho cardíaco-respiratório. A: Coração (C), Pericárdio (Pc) e Pulmão (P). B: Detalhe do Pulmão (P).



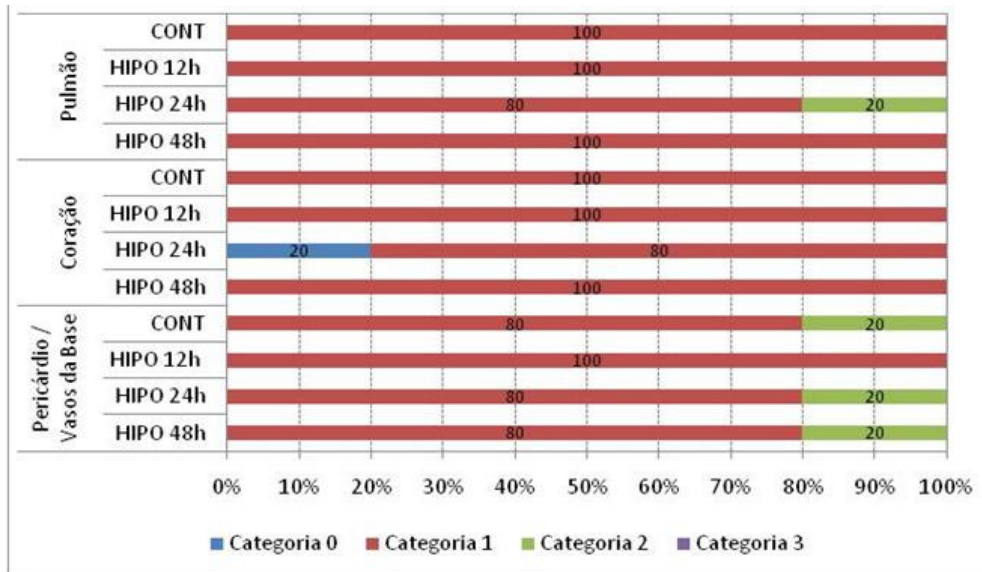
**Figura 3:** A: Vista geral do sistema digestório do anuro *Eupemphix nattereri*. B: Detalhe do estômago. C: Intestino; D: Reto (porção final do intestino) . E: Estômago. I: Intestino. Re: Reto.



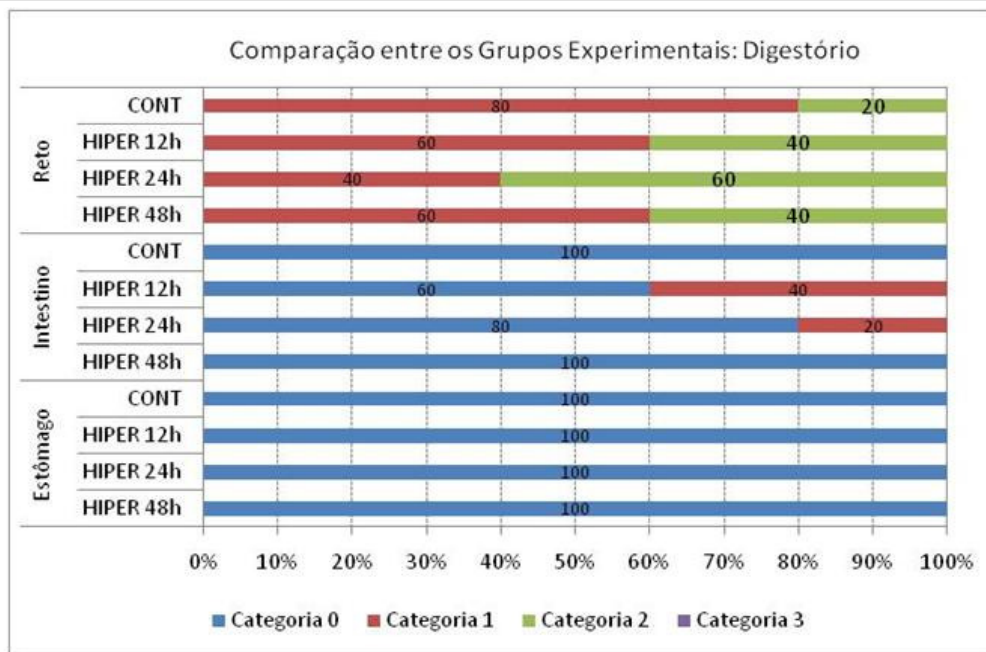
**Figura 4:** Detalhe dos órgãos e estruturas da cavidade abdominal do anuro *E. nattereri*. **A**, **B** e **C**: Aparelho Urogenital. **D**: Outras regiões em que as células pigmentares são encontradas. R: Rim. Cv: Coluna vertebral. Ca: Corpos adiposos. T: Testículo. Vu: Vesícula urinária. Ls: Peritônio lombossacral. Pl: Plexo nervoso lombar.



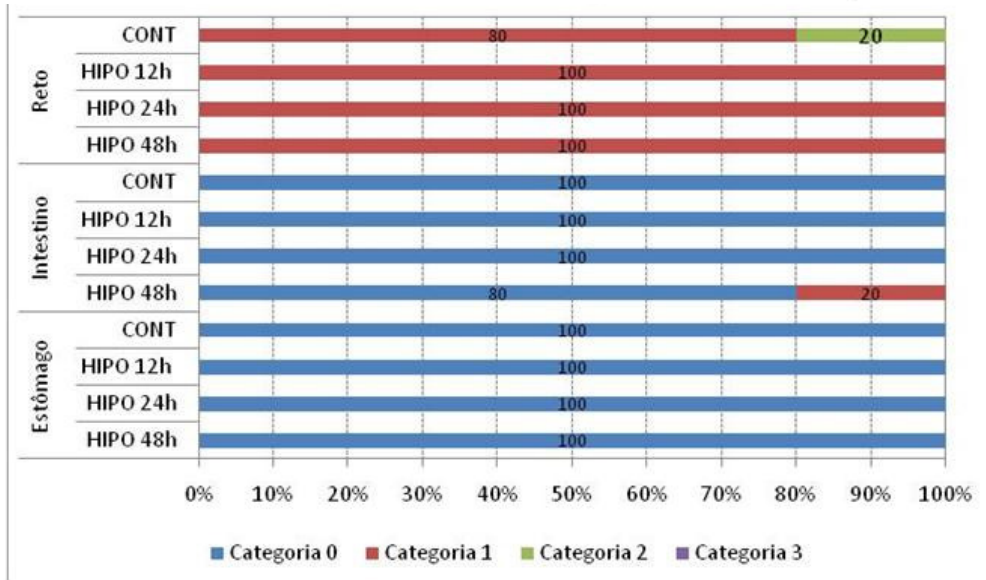
**Figura 5:** Análise da pigmentação dos órgãos e estruturas do aparelho cardíaco-respiratório de *Eupemphix nattereri* submetidos hipertermia (HIPER). CONT: Animais do grupo controle; HIPER 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipertérmico; HIPER 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPER 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse hipertérmico .



**Figura 6:** Análise comparativa da pigmentação dos órgãos e estruturas do aparelho cardíaco-respiratório de *E. nattereri* submetidos à hipotermia (HIPO). CONT: Animais do grupo controle; HIPO 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipotérmico; HIPO 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPO 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse hipotérmico .

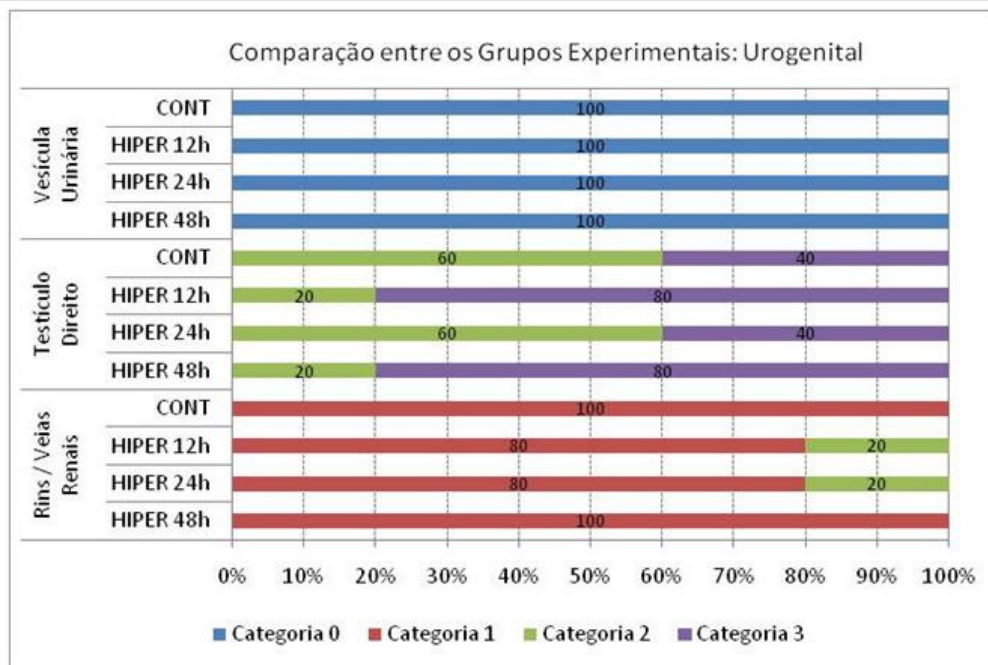


**Figura 7:** Pigmentação dos órgãos e estruturas do sistema digestório de *E. nattereri* submetidos hipertermia. CONT: Animais do grupo controle; HIPER 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipertérmico; HIPER 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPER 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse hipertérmico.

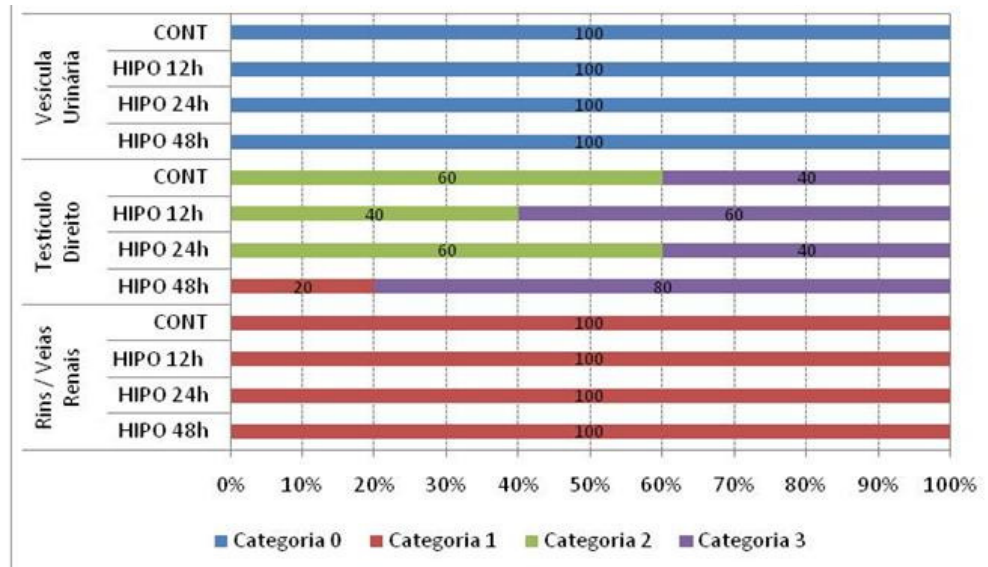


**Figura 8:** Análise comparativa da pigmentação visceral em *E. nattereri* submetidos hipotermia. Órgãos e estruturas do sistema digestório. CONT: Animais do grupo controle; HIPO 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipotérmico; HIPO 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPO 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse.

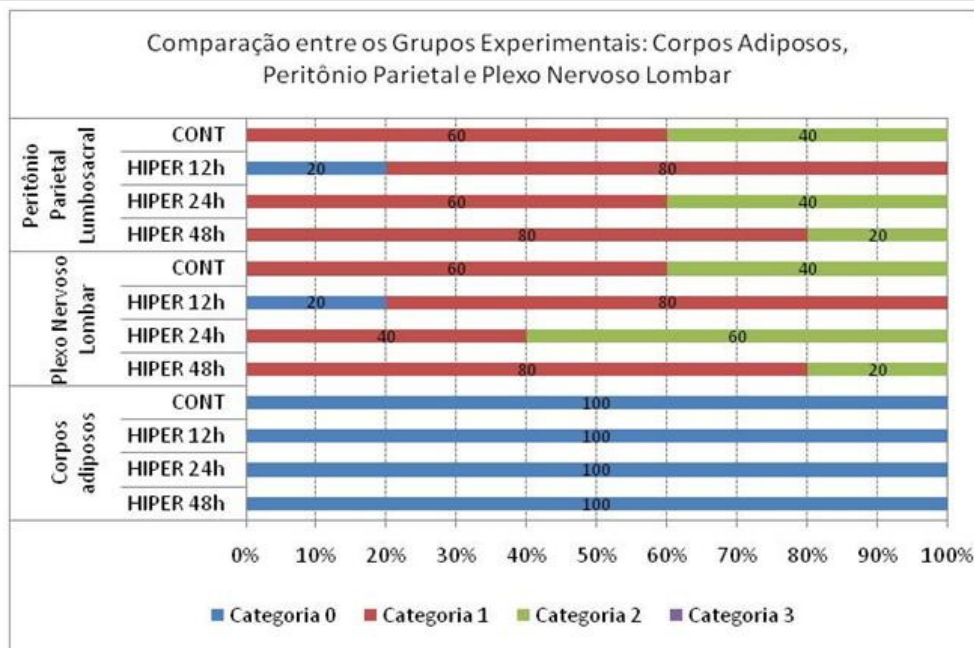




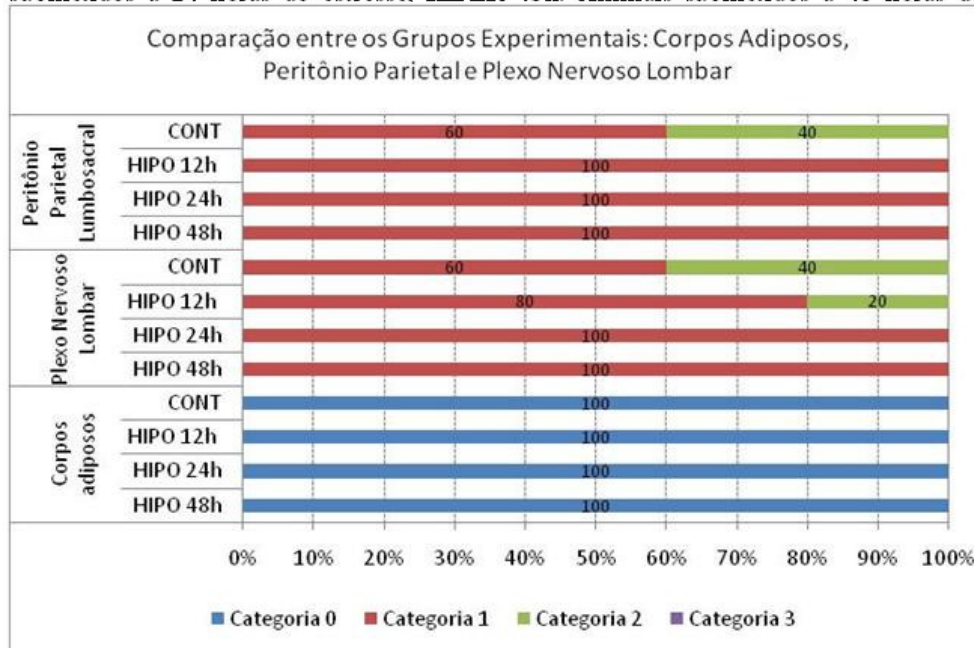
**Figura 9:** Análise da pigmentação dos órgãos e estruturas do aparelho urogenital, submetidos a hipotermia. CONT: Animais do grupo controle; HIPO 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipotérmico; HIPO 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPO 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse.



**Figura 10:** Análise da pigmentação visceral em *E. nattereri* submetidos à hipotermia. Órgãos e estruturas do aparelho urogenital. CONT: Animais do grupo controle; HIPO 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipotérmico; HIPO 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse hipotérmico; HIPO 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse hipotérmico.



**Figura 11:** Análise do mesentério, peritônio parietal e plexo nervoso lombar de *E. nattereri* submetidos à hipertermia. CONT: Animais do grupo controle; HIPER 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipertérmico; HIPER 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPER 48h: Animais submetidos a 48 horas de



**Figura 12:** Análise da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* submetidos à hipotermia. CONT: Animais do grupo controle; HIPO 12h: Animais submetidos a 12 horas de estresse hipotérmico; HIPO 24h: Animais submetidos a 24 horas de estresse; HIPO 48h: Animais submetidos a 48 horas de estresse hipotérmico.

**Tabela 1:** Padrão anatômico da pigmentação visceral do anuro *Eupemphix nattereri* (n=60). Os valores representam a porcentagem (%) de cada categoria de pigmentação presente nos órgãos e estruturas da cavidade abdominal.

Estruturas	Categorias de Pigmentação			
	0	1	2	3
1 - Pericárdio e vasos da base do coração	0	78,33	21,66	0
2 - Coração	11,66	85	3,33	0
3 - Pulmões	6,66	73,33	20	0
4 - Estômago	100	0	0	0
5 - Intestino	88,33	11,66	0	0
6 - Reto	0	76,66	23,33	0
7 - Rins e veias renais	0	90	10	0
8 - Testículos	0	5	38,33	56,66
9 - Vesícula Urinária	100	0	0	0
10 - Plexo nervoso lombar	1,66	78,33	20	0
11 - Peritônio parietal lombossacral	1,66	85	13,33	0
12 - Corpo adiposo	100	0	0	0

## Referências

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melanomacrophage centers in fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.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**. v.24, n.4, p.471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.499-509.
- 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**. v.272, p. 245-302.
- BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. p.11-59. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> 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**. v.195, p.19-25.
- BOISSY, R.E.; HORNYAK, T.J. 2006. Extracutaneous melanocytes. p.91-107. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.
- 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**. v.60, p. 259–268.

- FRANCO-BELUSSI, L. 2010. **Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo no anuro *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto/SP. 113p.
- 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).**
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran testes: Anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record.** v.292, p.178-182.
- 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.** v.15, p.32-40.
- 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.
- HADLEY, M. E.; QUEVEDO, W. C. 1967. The role of epidermal melanocytes in adaptive color changes in amphibians. p.337-358. *In* MONTAGNA, W.; HU, F. (Eds.) *Advances in biology of the skin.* Pergamon Press, Glasgow
- HEARING, V.J. 2006. The regulation of melanin formation. p.191-212. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology.* New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.

- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. **European Journal of Morphology**. v.29, n.2, p.89-102.
- MCGRAW, K.J. 2005. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? **Review Animal Behavior**. v.69, p.757-764.
- 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**. v.4, n.1, p.1-8.
- OLIVEIRA, C. 2007. **Anatomia do Aparelho Reprodutor e Sistema Pigmentar Extracutâneo em anuros**. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP. 151p.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A.; TABOGA, S.R. 2003. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia**. v.56, n.1, p.75-83.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. v.20, n.3, p.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**. v.22, n.2, p.454-460.
- PRELOVISEK, P.; BULOG, B. 2003. Biogenesis of melanosomes in kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). **Pigment Cell Research**. v.16, p.345-350.
- 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**. v.10, p.271-287.

- SUGIMOTO, M. 2002. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology. **Microscopy Research and Technique**. v.58, p.496-503.
- WALLIN, M. 2002. Nature's palette: How animals, including humans, produce colours. **Bioscience Explained**. v.1, n.2, p.1-12.
- 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**. v.290, p.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**. v.61, n.4, p.305-316.

## Capítulo 2

### Effects of hyperthermia and hypothermia on the hepatic pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)



**Effects of hyperthermia and hypothermia on the hepatic pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae)**

SANTOS, L.R.S.<sup>1,2</sup>; FRANCO-BELUSSI, L.<sup>2</sup>; ZIERI, R.<sup>2</sup>; BORGES, R.E.<sup>3</sup>; OLIVEIRA, C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano - IFG/Campus Rio Verde. Rodovia Km1, s/n. Cep: 75908-000 - Rio Verde - GO, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (UNESP/IBILCE)

<sup>3</sup>Universidade de Rio Verde – GO (FESURV)

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista – Departamento de Biologia (UNESP/IBILCE)

Manuscrito a ser submetido: *Journal of Experimental Zoology*

**\*Corresponding Author:**

Lia Raquel de Souza Santos

Instituto Federal Goiano – IFG/Campus Rio Verde - GO

Rodovia Sul Goiana Km 01 – Zona Rural

Cep: 75.908-000 - Rio Verde, GO, Brasil

Phone: +55 64 3620 5632

e-mail: [liaborges.rv@ifgoiano.edu.br](mailto:liaborges.rv@ifgoiano.edu.br)

**Abstract:** Ectothermic vertebrates show a well-developed system of pigmentary cells with melanin in its cytoplasm, located in several organs and structures (liver, spleen, lungs, heart and gonads) comprising an extracutaneous pigmentary system. The functional role of these cells on the majority of organs and tissues is not known, however for the liver there are a number of studies relating these cells to immunological functions. Our aim in this study was to describe the hepatic pigmentation in the anuran *Eupemphix nattereri* submitted to a varying thermal condition. To test how this condition affects the pigmentary system of *E. nattereri*, 30 specimens were submitted to hyperthermia experiments (35.1°C) and another 30 ones to hypothermia experiments (18.9°C). In each experiment, animals were analyzed in two different treatments (*immediately* after stress and those *recovered* from this stimulus). The animals in each treatment were analyzed in three distinct times (12h, 24h and 48h). For the control, 5 specimens were kept at room temperature (27°C). After all treatment times, animals were euthanized and the hepatic pigmentation was quantified. The melanomacrophages were observed between the hepatic plates, associated to sinusoids. These cells bear several granules in its cytoplasm, including melanin, which confers dark coloration to the cells. Frequently, these cells are organized in groups, forming the melanomacrophage centers. Both hyperthermia and hypothermia decreased hepatic pigmentation in animals analyzed after thermal stress. The recovered animals showed as much pigmentation as control animals in both experimental groups. In conclusion, the thermal variation promotes changes on the hepatic pigmentation, being influenced by stress regime and stimulus time to which animals were exposed.

**Keywords:** Temperature, liver, pigmentation, anuran.

## Introduction

In ectothermic vertebrates, pigment-containing cells are found in several organs and structures, such as liver, spleen, kidney, heart, thymus, gonads, peritoneum, and lungs (Gallone *et al.*, 2002; Zuasti, 1990) constituting an extracutaneous pigmentary system (Zieri *et al.*, 2007; Gallone *et al.*, 2002). These pigmentary cells present in the liver of amphibians and reptiles are resident macrophages named Kupffer cells (KCs), or melanomacrophages (Christiansen *et al.*, 1996; Agius, 1980), originated from the hematopoietic stem cell (Gallone *et al.*, 2002; Sichel *et al.*, 2002). According to Corsaro *et al.* (2000), there are studies concerning the immunological functions of macrophages, focused mainly on its phagocytic activity (Guida *et al.*, 1998; Sichel *et al.*, 1997). In addition, some authors report that the melanin found in the cytoplasm of KCs is derived from phagocytosis, since these cells are not capable of producing melanin (Andrews, 1969). However, Sichel *et al.* (2002 and 1997) had confirmed in further studies that this melanin is not phagocytosed, but synthesized by these cells.

Melanin is a polymer related to the neutralization of free radicals (Zuasti *et al.*, 1989) and synthesized inside melanosomes (Bagnara and Matsumoto, 2006). According to Tonosaki *et al.* (2004), some hormones (e.g.,  $\alpha$ -MSH) stimulate the dispersion of melanosomes in pigmentary cells, therefore these mobile organelles are involved in color change (Bagnara and Matsumoto, 2006). Recent studies investigate the role not only of the activity of the Melanin Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH) and steroids (17- $\beta$ -estradiol and testosterone cypionate), but also the response of the pigmentary system when infected with bacteria (Zieri, 2010; Franco-Belussi, 2010). Anatomical studies carried out by Franco-Belussi *et al.* (2009) developed a protocol to quantify the visceral pigmentary cells present on the gonads, aiming to identify an anatomical pattern for the occurrence of pigmentation in anurans.

Other aspects still little explored are the response of the pigmentary system to the environmental conditions and the metabolic activity. According to Frangioni *et al.* (2000), there is a relationship between the hepatic melanogenesis and the respiratory activity. In the liver, Barni *et al.* (2002) found that during the period of natural hibernation the pigmentary cells undergo drastic structural changes in response to seasonality. Our aim with this study is to verify if variations in the thermal conditions influence the hepatic pigmentation of the anuran *Eupemphix nattereri*.

### **Material and Methods**

It was collected 65 adult males of *Eupemphix nattereri* during the reproductive period (from November 2007 to February 2008) in temporary and permanent ponds in the municipality of São José do Rio Preto-SP, (20°49'12,65"S e 49°22'46,85" W) Southeastern Brazil. The collecting permit was provided by IBAMA (RAN/IBAMA 18573-1). All the experimental procedures and euthanasia were carried out in accordance with the recommendations of the Ethics and Animal Experimentation Committee of the UNESP-State University of São Paulo, *Campus* Botucatu (Protocol 70/07-CEEA). The specimens remained in terraria (73x41x52cm) with soil from place where they were collected, receiving water and food *ad libitum* for seven days. The specimens from the control group (n=5) remained in terraria and at room temperature. They were analyzed after the experimental period.

### **Thermal variation experiments**

To induce the thermal stress, the specimens (n=60) were submitted to conditions of hypothermia and hyperthermia in a B.O.D. incubator (Model 121 FC). It was imposed the hyperthermia (35.1°C) or hypothermia (18.9°C) by rising or reducing by 30% the room temperature (27°C). It was took into account not only the mean room temperature recorded

three times a day in the time specimens were in the terrarium, but also the mean annual temperature recorded one year before the beginning of the experiment. In doing so, it was tried to observe the maximum and minimum values tolerated by these organisms. This methodology, used for the first time with anurans, aimed to standardize the temperatures compatible with the climate where the species is found.

### **Experimental design**

**Hyperthermia:** This experiment was carried out in three different times (12h, 24h and 48h), using 30 specimens to verify the effects of the increase in temperature on the pigmentary cells. In each time, ten specimens were kept at a temperature of 35.1°C, where five specimens were analyzed immediately after the period of 12 hours and the other five were taken from the BOD incubator and remain in recovering, at room temperature (27°C), by the same time in hours in which were submitted to the stress, and then were analyzed. To the other times (14h and 48h), the procedures were the same.

**Hypothermia:** This experiment was carried out in three different times (12h, 24h and 48h), using 30 specimens to verify the effects of the decrease in temperature on the pigmentary cells. For each time, ten specimens were kept at a temperature of 18.9°C in the BOD incubator. In the first time, ten specimens remained in hypothermia for 12 hours, of which five were analyzed after this period and the other five remained in recover, at room temperature, for 12 hours and were then analyzed. To the other times (24h and 48h), the procedures were the same.

To the control group in the two experiments it was used 5 specimens which remained in terraria, but at room temperature (27°C)

### **Morphological analyses**

The liver fragments were fixed in the Karnovisky solution (Sörensen phosphate buffer 0.1M, phosphate buffer pH 7.2 with paraformaldehyde 5% and glutaraldehyde 2.5%), for 24 hours at 4°C. Later, the samples were washed in distilled water, dehydrated in a series of alcohols and embedded in historesine (Leica-historesin embedding kit). Sections of 2µm were obtained in the microtome (Leica RM 2265), and then were mounted in microscope slides and stained with Hematoxylin-eosin. The images were captured of these sections with a microscope (Leica DM4000 B) with an image capture system (Leica DFC 280).

We analyzed ten animals for each experimental group (12h, 24h e 48h). These experimental groups were divided in animal analyzed immediately thermic stress (I) and animals analyzed after recovery the stress (R). Three histological sections of each animal were selected and 15 histological fields analyzed. Therefore 150 histological regions were analyzed for each experimental time totalizing 900 histological fields to establish if there is a relationship between the hepatic pigmentation and the experimental treatments. It was used computadorized morphometrical analyses to quantify the pigmentation with the software Image Pro-Plus (Media-Cybernetics Inc., version 4.5), according to Lehr *et al.* (1997) with modifications. The quantification technique is based on the color difference, in histological sections of the hepatic parenchyma stained with Hematoxylin-eosin.

### **Statistical analyses**

To the data analysis, firstly it was identified outliers and later it was tested for normality of the data using the Shapiro-Wilk test. For parametric data, it was used a one-way ANOVA and when the data was not parametric, it was submitted to normalization

$(x+0.5)^{1/2}$ . In case of the data not became parametric, it was used the Kruskal-Wallis test. It was assumed a significance level of  $p \leq 0.05$ , being all the analyses based on Zar (1999). The statistical program used for analysis was the Biostat (version 4.5)

## **Results**

### **Location and Morphology**

The liver is made up of three hepatic lobes (right, left and middle) and presents a brown-reddish coloration, due to the high amount of blood vessels and pigmentary cells. These cells bear melanin and are dark colored. In addition, they are generally arranged in groups, forming the melanomacrophages centers, which are observed in macroscopic view (Figures 1 A and B).

The hepatic parenchyma is made up of two layers of hepatocytes arranged in a double plate surrounded by sinusoids. The sinusoids are irregular, narrow and vary in size. The hepatic cells are polyedric and also have a high nucleus-cytoplasm rate. The nucleus is spherical and occupies a central position in the cell. The melanomacrophages were observed among the cells of the tissue, specifically between the hepatocyte plates. The melanomacrophages are near the sinusoids and confer a dark brown color to the tissue (Figure 2 A and B).

### **Experiment Hyperthermia**

It was verified a decrease in the hepatic pigmentation with hyperthermic stress in specimens analyzed immediately after the thermal stress and exposed to a greater period of time (48h) when compared to the control group ( $F=10.74$ ;  $p \leq 0.01$ ). Although it was not found a statistical difference between the 12h and 24h experimental times ( $F=10.74$ ;  $p \leq 0.05$ ), but both did not differ from the control ( $F=10.74$ ;  $p \geq 0.05$ ). It was found a gradual increase in the pigmentation in recovered specimens. In recovered specimens after 24 and

48 hours, the pigmented area was similar to the control group ( $F=31.61$ ;  $p\geq 0.05$ ) (Figure 3).

When the effect of the treatments (immediate and recovered) was compared in each experimental time, it was observed a decrease in the hepatic pigmentation in specimens recovered after 12 hours, with a significant difference between the treatments ( $F=34.35$ ;  $p\leq 0.01$ ). The pigmented area did not differ in specimens analyzed immediately after 24h of hyperthermia when compared to the recovered ones ( $F=3.46$ ;  $p\geq 0.05$ ). The hepatic pigmentation decreased in specimens analyzed immediately after 48h, when compared to the control and the recovered specimens ( $F=15.41$ ;  $p\leq 0.01$ ) (Figure 4 and 5).

### **Experiment Hypothermia**

In the experiment with the decrease of temperature, it was verified to specimens analyzed immediately after the thermal stress that there was a decrease in the area of hepatic pigmentation when compared to the control ( $F=6.04$ ;  $p\leq 0.05$ ). However, the amount of pigmentation present in specimens from different experimental times was similar ( $F=6.04$ ;  $p\geq 0.05$ ). When the pigmentation was analyzed in specimens recovered at room temperature for the same time by which were submitted to stress, it was found a decrease in the hepatic pigmentation in the first times (12h and 24h) of this treatment, when compared to the control ( $H=13.89$ ;  $p\leq 0.05$ ). With a greater experimental time (48h), It was found an increase in the hepatic pigmentation, which was similar to that found in the control ( $H=13.89$ ;  $p\geq 0.05$ ) (Figure 6).

When the effect between the treatments (immediate and recovered) was compared in each experimental time, it was observed that the pigmentation was similar in all experimental times (12h, 24h and 48h) ( $F=6.70$ ;  $p\geq 0.05$ ). However, the pigmentation in both treatments is lower in the 12h and 24h, when compared to the control (12h:  $F=6.70$ ;  $p\leq 0.05$ ; 24h:  $F=9.21$ ;  $p\leq 0.01$ ). In the 48h time, although the recovered specimens were



similar to the specimens analyzed immediately after the thermal stress ( $H=9.17$ ;  $p \geq 0.05$ ), it was observed a tendency to increase the amount of hepatic pigmentation in the specimens, remaining similar to the control ( $H=9.17$ ;  $p \geq 0.05$ ) (Figure 7 and 8).

### **Effects of the Experiment**

When the effect of the experiments was analyzed on the specimens analyzed immediately after the thermal stress, it was found a difference only in the specimens analyzed after 12h, with a decrease in the pigmented area with hypothermia ( $F=6.67$ ;  $p \leq 0.05$ ). It was not found differences between hyperthermia and hypothermia in the other experimental times (24h:  $F=6.63$ ;  $p \geq 0.05$ ; 48h:  $F=10.91$ ;  $p \geq 0.05$ ). However, in hypothermia the specimens from all experimental times (12h, 24h and 48h) showed a decrease in the hepatic pigmentation when compared to control ( $F=6.04$ ;  $p \leq 0.05$ ). With the increase in the temperature, it was not detected a difference between the specimens analyzed immediately after 12 hours, in relation to the control group; but in specimens analyzed with 24 hours of stress, although they were similar to the control group and the experimental time of 48 hours ( $F=10.74$ ;  $p \geq 0.05$ ) there was a tendency to a decrease in the hepatic pigmentation in the hyperthermia, although this decrease in only evident with 48h experimental time in relation to the control group ( $F=10.74$ ;  $p \geq 0.05$ ) (Figure 9 and 10).

When specimens recover from the thermal stress (hyperthermia or hypothermia), there was a difference between the experiments in all times (12h:  $F=19.03$ ;  $p \leq 0.05$ ; 24h:  $F=8.94$ ;  $p \leq 0.01$ ; 48h:  $H=6.69$ ;  $p \leq 0.05$ ). There was a decrease in the hepatic pigmentation with 12h in the two experiments (Hyperthermia:  $F=31.61$ ;  $p \leq 0.01$ ; Hypothermia:  $F=6.04$ ;  $p \leq 0.05$ ). With 24h, only the hypothermic stress promoted a decrease in the pigmented area (24h:  $H=13.89$ ;  $p \leq 0.05$ ). The pigmentation in 48h was similar to the control (Figure 11 and 12).

## Discussion

The liver of *Eupemphix nattereri* is made up by lobes, anatomically described by Franco-Belussi (2010) and in *Lithobates catesbeianus* by Junior (2008). The lobes are composed by hepatic cells, also named hepatocytes, which are the functional centers of this organ. The hepatic tissue presents several sinusoids, which are anastomotic vessels, and are localized in the space between the double plates of hepatocytes. The arrangement in double plates of the hepatocytes is different from the “simple wall” described for mammals. This arrangement is a single cellular plate which separates the sinusoids (Bruslè and Anadon, 1996) and it is different from that described by Junior (2008) for *L. catesbeianus*. In the later species, the hepatocytes are arranged in a tubular form and not in a plate, as observed in *E. nattereri*. However, the hepatic architecture in double plates shown in our study is in agreement with the data reported by Franco-Belussi (2010), as well as with those studies describing the hepatic morphology of several species of fish (Bertolucci *et al.*, 2008; Bombonato *et al.*, 2007; Akiyoshi and Inoue, 2004). Between the plates there is an massive network of blood vessels, as reported by Franco-Belussi (2010). This feature is related to the physiology of the organ, i.e., the metabolism of carbohydrates and fatties, elimination of both blood cells and toxic substances, besides the production of the bile (Hildebrand, 1995).

Near to the sinusoids and among the hepatocytes there are pigmented cells, the melanomacrophages, which are macrophages that bear melanin (Barni *et al.*, 1999). The melanomacrophages are organized in melanomacrophage centers, easily observed in macroscopic view. These melanomacrophages also reported by Hartley *et al.* (1996) are members of the immune system of fishes due to the properties of the melanin. The melanomacrophages can vary in size and number according to the age, nutritional state and environmental conditions (Hartley *et al.*, 1996).

The thermal variation promoted a decrease in the hepatic pigmentation, suggesting changes in the melanomacrophages of the liver of *E. nattereri*. Those cells are very plastic and are susceptible to changes due to seasonal variations (Barni *et al.*, 1999). Thus, it could be inferred that these cells are responsive to the stimulus as a way to adapt to the stressful condition. Frangioni *et al.* (2000) showed that the variation in the amount of hepatic melanin is related to the temperature, since the melanin in their studies was less abundant in low temperatures than in warm ones. These data are in accordance with Barni *et al.* (2002), who showed that the decrease in the hepatic pigmentation, related to the seasonal variations, is due to apoptotic mechanisms, as well as the decrease in both the melanosomes by autophagy and the synthesis of melanin.

The pigmentary reduction in hyperthermia can be attributed to the function of the melanin in the thermoregulation system, since it strongly absorbs the radiation being the energy transformed in heat (Césarini, 1996). As the melanin is one of the components of the melanomacrophages, the decrease in the pigmentation causes lower energy absorption and, consequently a reduction in heat absorption by hepatic pigmentary cells. Thus, the decrease of the pigmentation probably occurs to keep the body balance by mean of thermoregulation aiming the homeostasis of the organism. This decrease occurs by means of the inactivation of the protein phosphatase, which promotes several changes inhibiting the transcriptional regulator and the synthesis of melanin (Kim *et al.*, 2004).

In hypothermia as well as in hyperthermia, it was observed a decrease in the hepatic pigmentation. This decrease is different from that which occurs in hyperthermia, since it is related to the inhibition of the activity of tyrosinase, in low temperatures, which by its turn reduce the synthesis of melanin (Kim *et al.*, 2003). At 27°C, the synthesis of melanin is not affected (Kim *et al.*, 2003), therefore the return to the room temperature promoted an increase in the hepatic pigmentation of specimens in the two experiments.

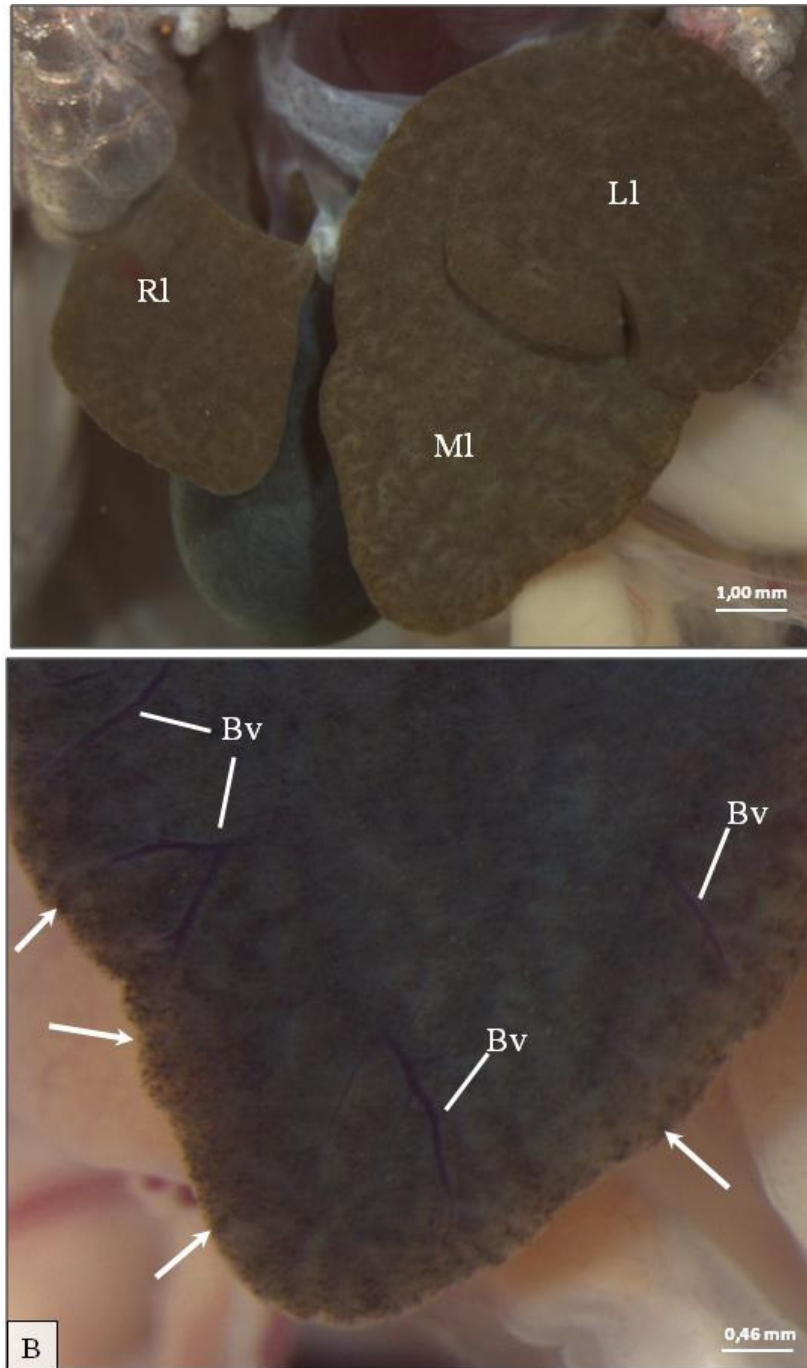
According to Tonosaki *et al.* (2004), in ectothermic animals drastic changes in the environmental temperature leads to physiological changes, with the release or inhibition of the Melanin Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH) as a response to the stress. On the contrary, there is a gradual physiological response when the variation in the environmental temperature is also gradual. Thus in the two experiments, the exposure time influenced the pigmentation, showing that not only the experiment, but also the experimental times influenced the hepatic pigmentation.

In conclusion, this study has shown that the variation in temperature influences the hepatic pigmentation in anurans. Thus, the increase and decrease in this pigmentation is related to the thermal variation to which these organisms are susceptible.

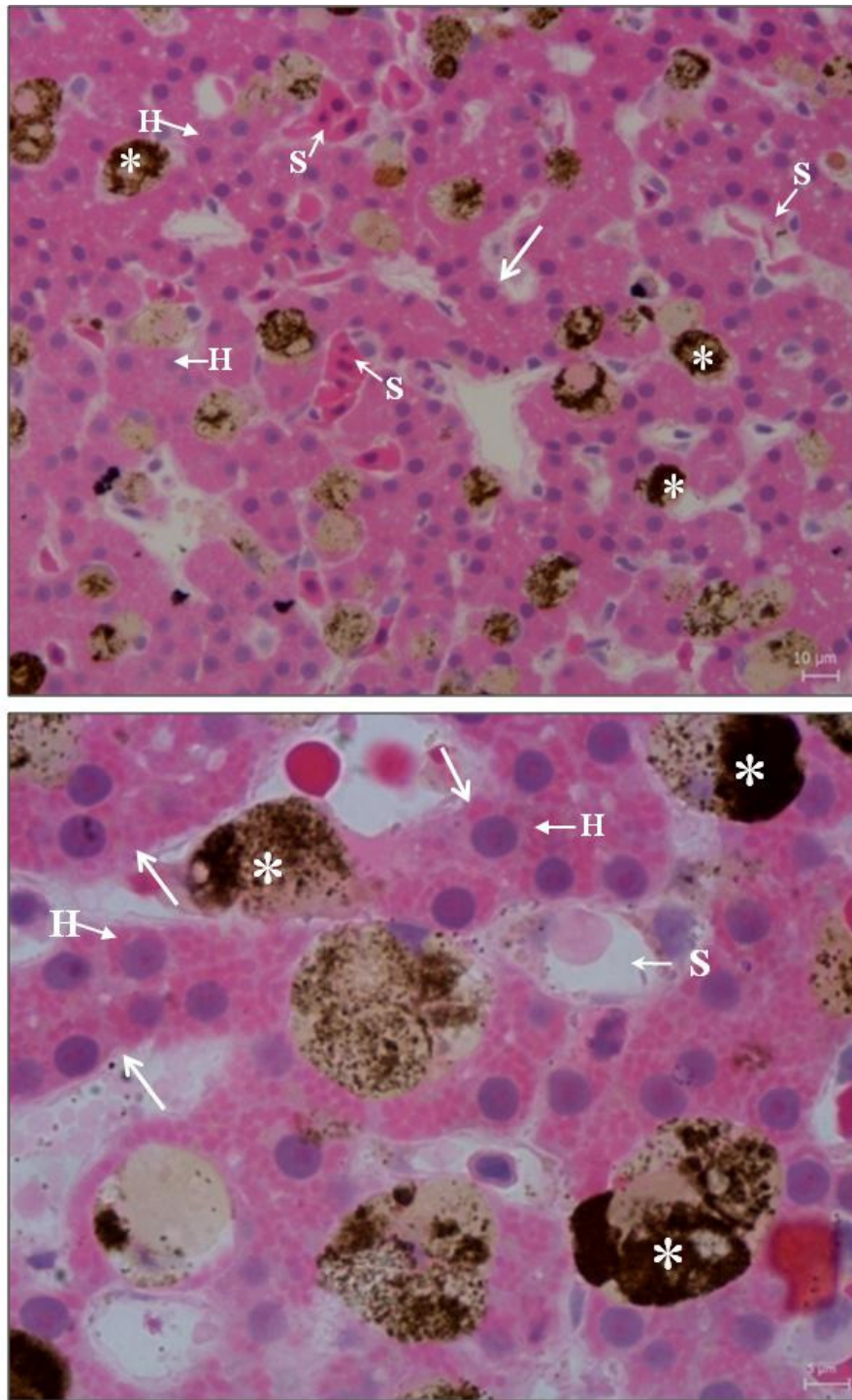
### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr. Vitor Hugo M. Prado and to MSc. Diogo Borges Provete by helpful suggestions on the manuscript. This study was supported by funding from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process 02/08016-9, 05/02919-5), CNPq (Process 475248/2007-4) and FUNDUNESP (Process 01209/08-DFP).

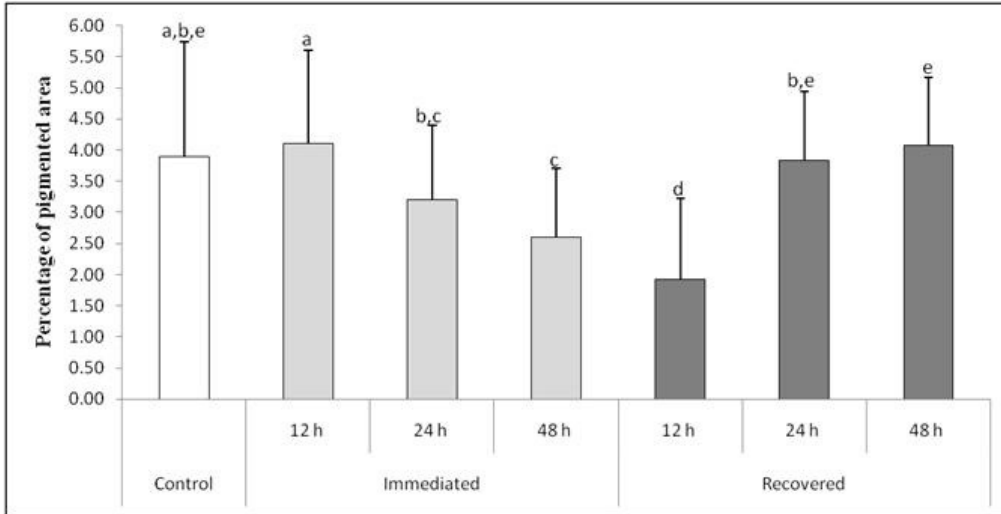
**Figures**



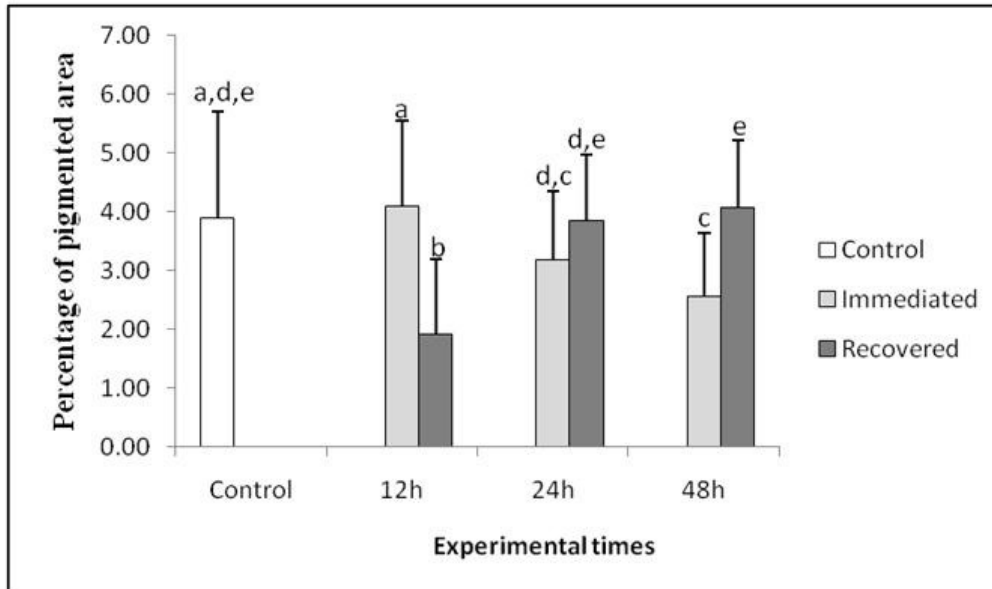
**Figure 1:** A: Liver of *Eupemphix nattereri*, showing the division in hepatic lobes. B: Detail of the middle hepatic lobe, where it is possible to notice blood vessels (Bv) and the melanomacrophage centers (Arrows). Rl: Right lobe. Ll: Left lobe. Ml: Middle lobe.



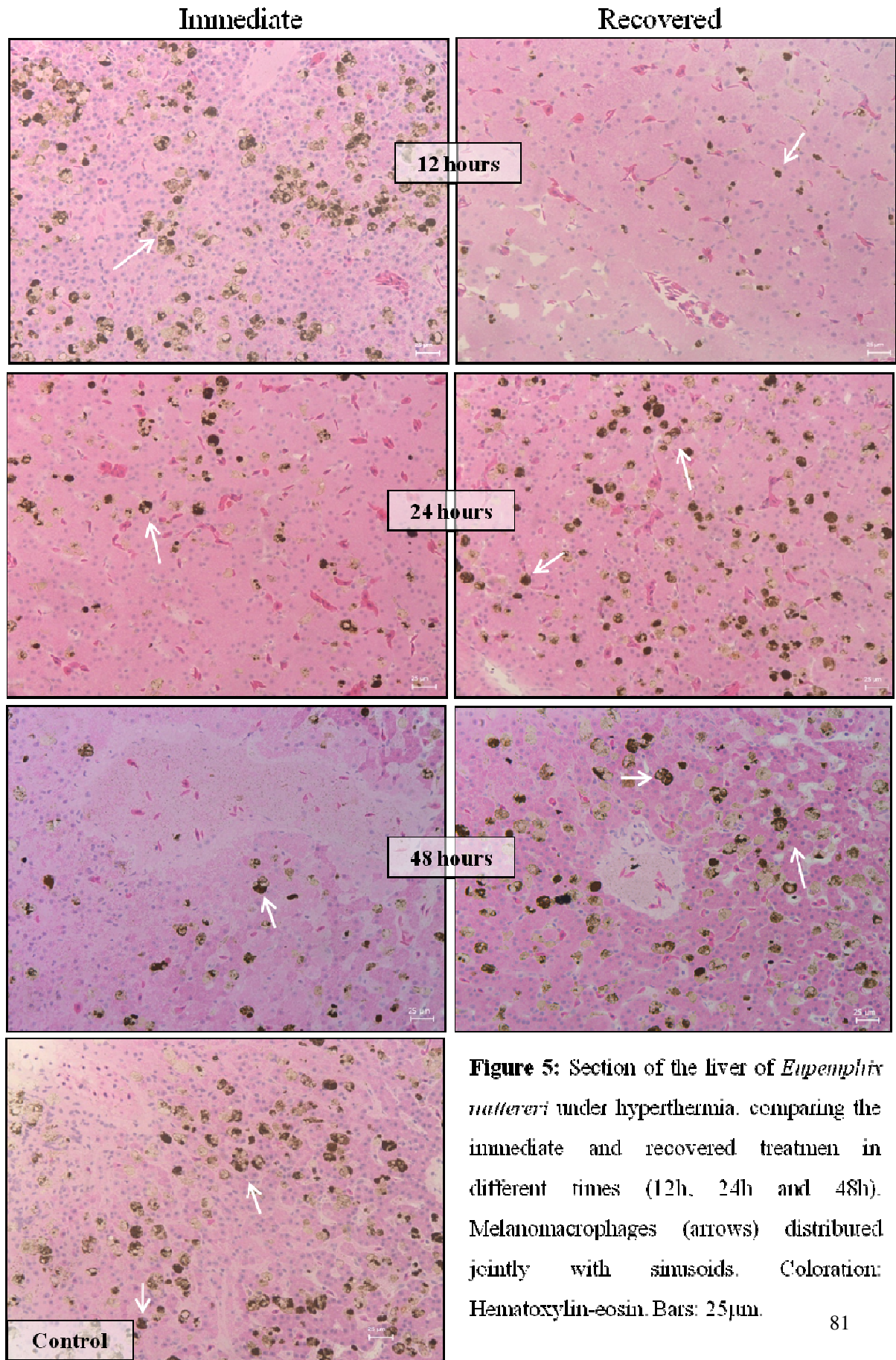
**Figure 2: A and B:** Histological section of the liver of *Eupemphix nattereri*, showing the presence of melanomacrophages (\*) between hepatocytes. H: hepatocytes in a double plate arrangement. S: hepatic sinusoids. Arrow: plate arrangement. Coloration: Hematoxylin-eosin. Bars: 10μm (Figure A) and 5μm (Figure B).



**Figure 3:** Percentage of pigmented area on the liver of *Eupemphix nattereri* submitted to hyperthermia. Different letters represent significant statistical differences between experimental times of a single treatment and between treatments (immediate and recovered) in the same experimental time (hours) ( $p \leq 0.05$ ).

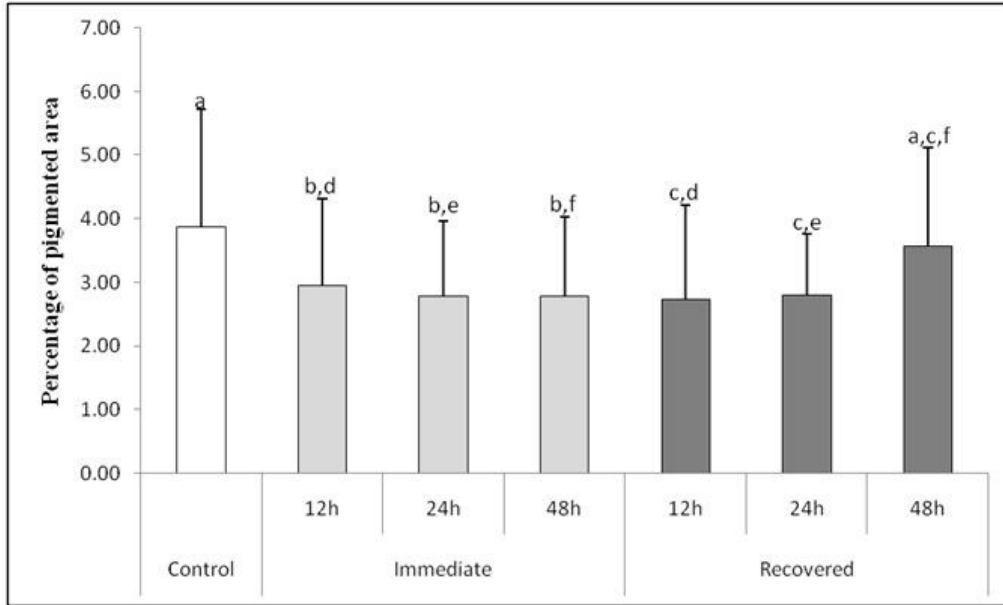


**Figure 4:** Hyperthermia experiments with *Eupemphix nattereri*. Percentage of pigmented areas in different experimental times and between different treatments and the control group. Different letters represent significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ).

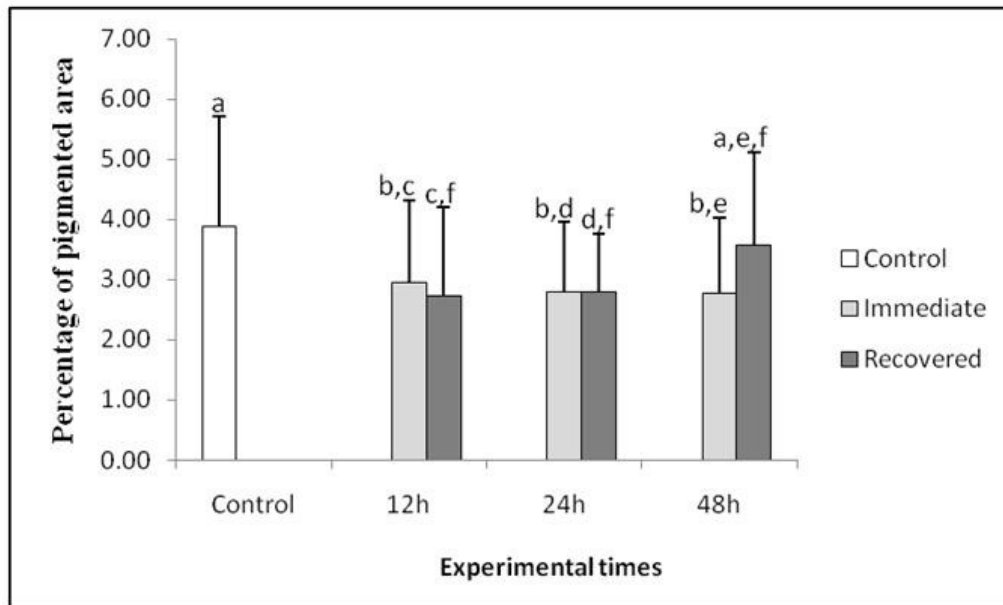


**Figure 5:** Section of the liver of *Eupemphix nattereri* under hyperthermia, comparing the immediate and recovered treatments in different times (12h, 24h and 48h). Melanomacrophages (arrows) distributed jointly with sinusoids. Coloration: Hematoxylin-eosin. Bars: 25µm.

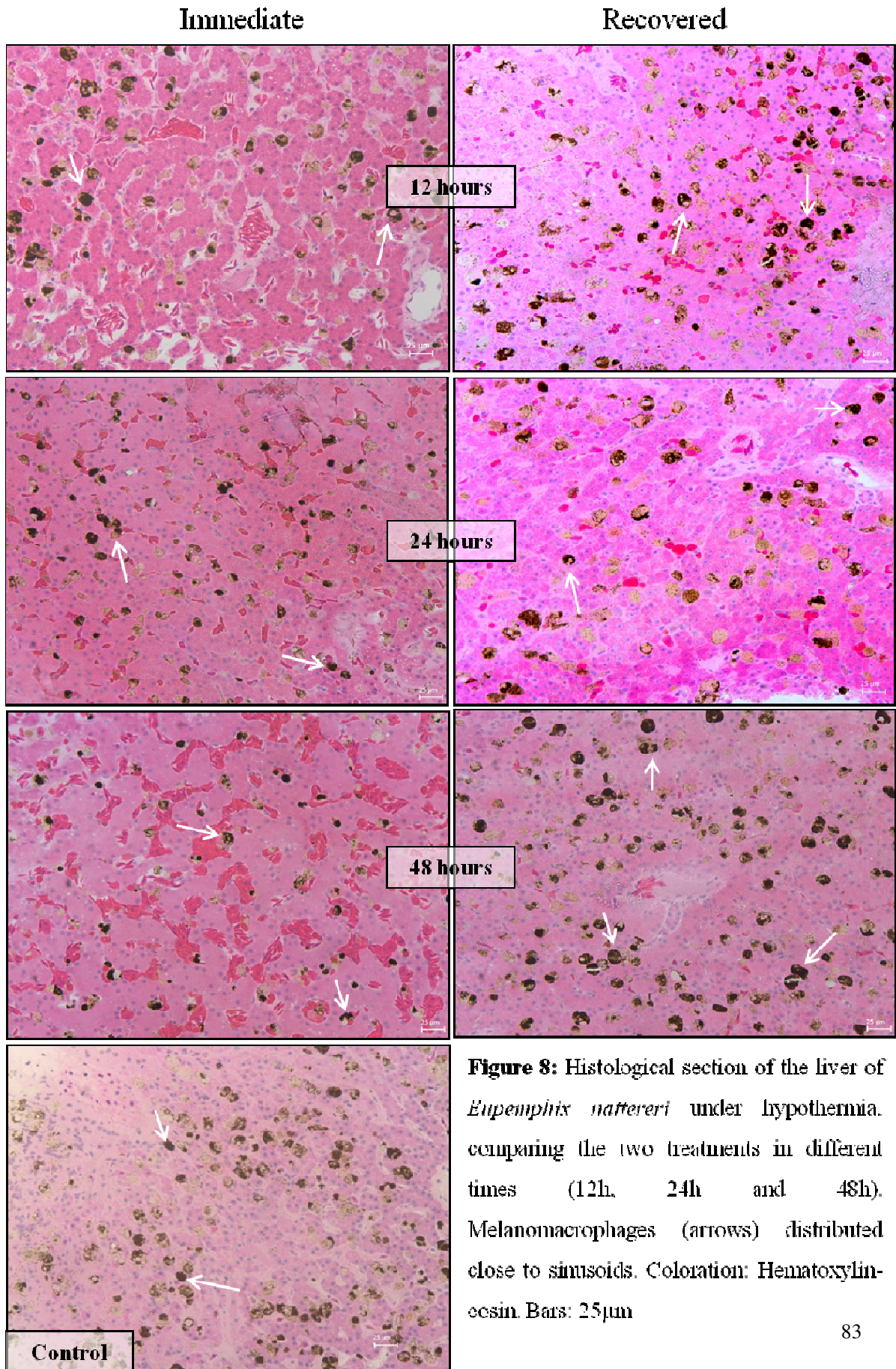




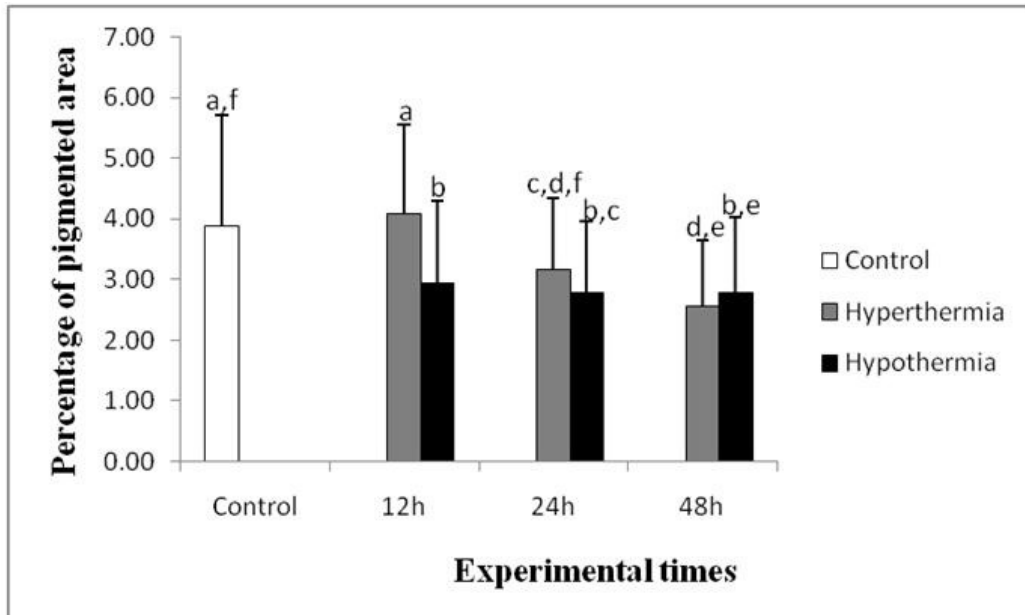
**Figure 6:** Difference in the percentage of the pigmented area of the liver of *Eupemphix nattereri* under hypothermia. Different letters represent significant statistical differences among the experimental times of a same treatment and between treatments (immediate and recovered) at the same time ( $p \leq 0.05$ ).



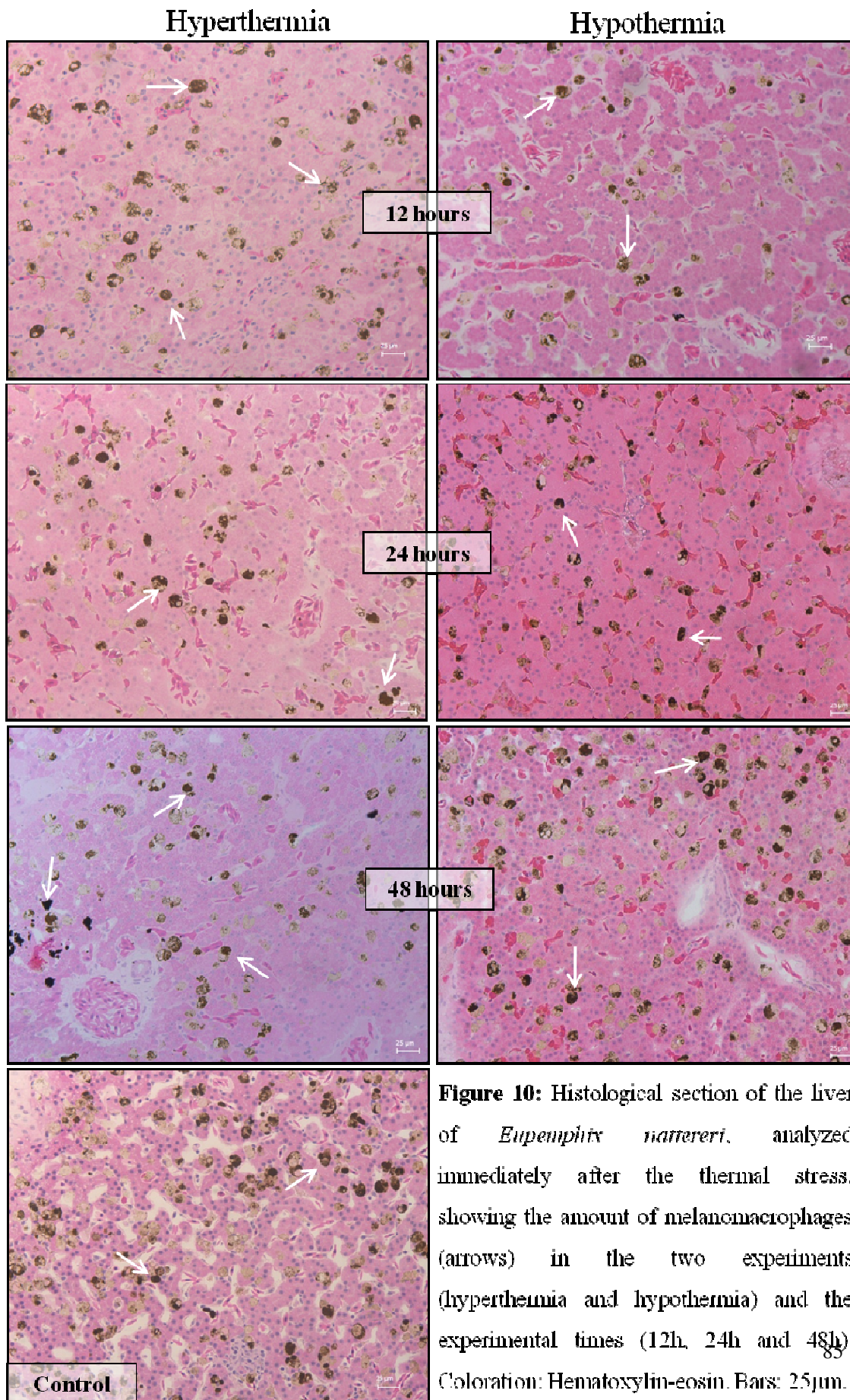
**Figure 7:** Experiment with Hypothermia with *Eupemphix nattereri*. Difference in the percentage of pigmented area in different times and between treatments and control. Different letters represent significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ).



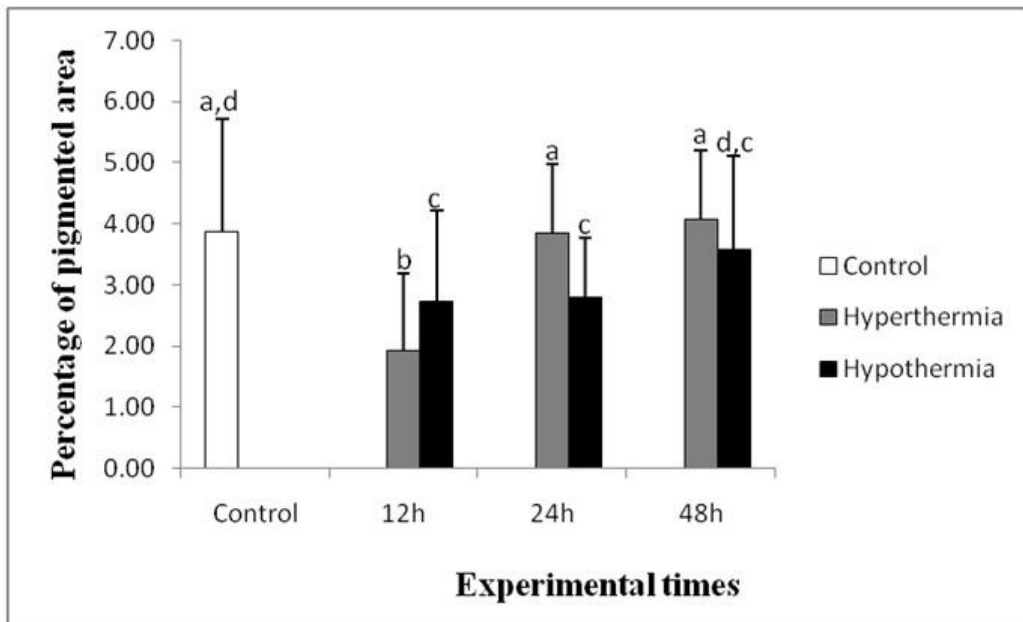
**Figure 8:** Histological section of the liver of *Eupemphix nattereri* under hypothermia, comparing the two treatments in different times (12h, 24h and 48h). Melanomacrophages (arrows) distributed close to sinusoids. Coloration: Hematoxylin-eosin. Bars: 25μm



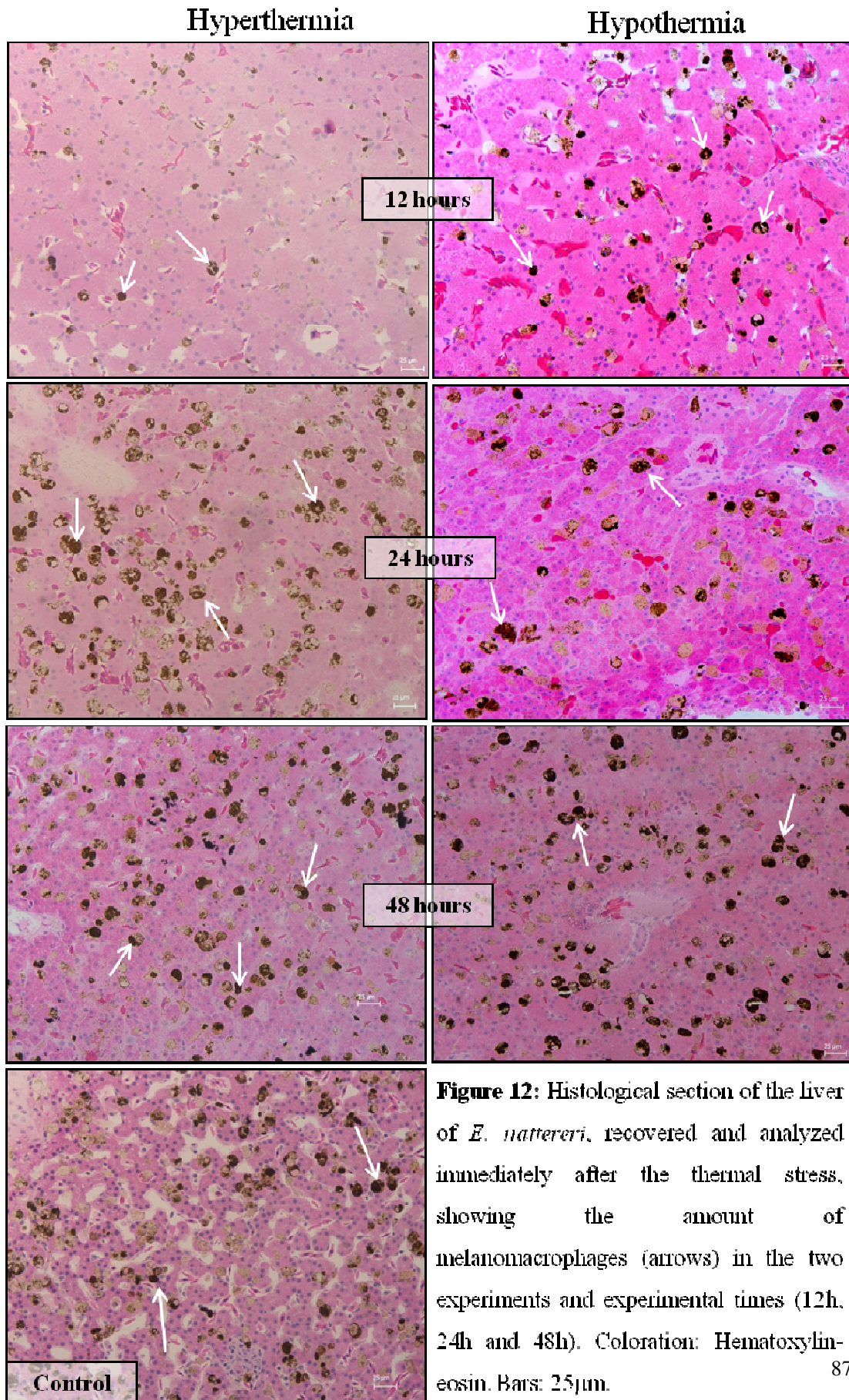
**Figure 9:** Comparison of the percentage of pigmented area between the two experiments of hyperthermia and hypothermia in specimens of *Eupemphix nattereri* analyzed immediately the thermal stress. Different letters represent significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 10:** Histological section of the liver of *Eupemphix nattereri*, analyzed immediately after the thermal stress, showing the amount of melanomacrophages (arrows) in the two experiments (hyperthermia and hypothermia) and the experimental times (12h, 24h and 48h). Coloration: Hematoxylin-eosin. Bars: 25μm.



**Figure 11:** Comparison between the percentage of pigmented area in the two experiments of hyperthermia and hypothermia in the recovered specimens. Different letters represent significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 12:** Histological section of the liver of *E. nattereri*, recovered and analyzed immediately after the thermal stress, showing the amount of melanomacrophages (arrows) in the two experiments and experimental times (12h, 24h and 48h). Coloration: Hematoxylin-eosin. Bars: 25µm.

## References

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melanomacrophage centers in fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.11-31.
- AKIYOSHI, H.; INOUE, A. 2004. Comparative histological study of Teleost livers in relation to phylogeny. **Zoological Science**. v.21, p.841-850.
- ANDREW, W. 1969. The nature of pigment cells in the liver of *Ambystom mexican* and their changes with age. **Journal Cell Biology**. v.437a
- BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. p.11-59. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> 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**. v.195, p.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**. v.200, p.185-194.
- BERTOLUCCI, B.; VICENTINI, C.A.; VICENTINI, I.B.F.; BOMBONATO, M.T.S. 2008. Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v.30, n.1, p.73-76.
- 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 Sciences**. v.29, n.1, p.81-85.

- BRUSLÉ, J.; ANADON, G.G. 1996. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D; DUTTA, H.M. (Ed.). **Fish Morphology**. North-Holland: Science Publishers. p.77-93.
- CÉSARINI, J.P. 1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. **Advances in Space Research**. v.18, n.12, p.35-40.
- 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, N.; MONDIO, F.; SICHEL, G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. **Journal of Anatomy**. V.196, p.249–261.
- FRANCO-BELUSSI, L. 2010. **Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo no anuro *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto/SP. 113p.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran testes: Anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record**. v.292, p.178-182.
- 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**. v.287, p.120-127.
- 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**. v.15, p.32-40.



- GUIDA, G.; MAIDA, I.; GALLONE, A.; BOFFOLI, D.; CICERO, R. 1998. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. **In vitro Cellular and Developmental Biology. Animal.** v.34, p. 393–400.
- HARTLEY, W.R.; THIYAGARAJAH, A.; TREINIES, A.M. 1996. Liver lesions in gar Fish (Lepisosteidae) as biomarkers of exposure. Maringá. Environmental. Research. Oxford, v.42, p.217-221.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu. 700p.
- JUNIOR, J.F.; STÉFANI, M.V.; VICENTINI, C.A. 2008. **Desempenho produtivo, hematologia e morfologia do tecido hepático de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, alimentada com ração contendo diferentes níveis de carboidratos e lipídios.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista - Campus Jaboticabal. 138p.
- KIM, D.; PARK, S.; KWON, S.; JOO, Y.; YOUN, S. SOHN, U.; PARK, K. 2003. Temperature regulates melanin synthesis in melanocytes. **Archives Pharmacal Research.** v.26, n.10, p.840-845.
- KIM,D.; PARK, S.; KWON, S.; YOUN, S. 2005. Heat treatment decreases melanin synthesis via protein phosphatase 2A inactivation. **Cellular signaling.** v.17, n.8, p.1023-31.
- LEHR, H.A.; MANKOFF, D.A.; CORWIN, D.; SANTEUSANIO, G.; GOWN, A.M. 1997. Aplication of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. **The journal of Histochemistry & Cytochemistry.** v. 45, n.11, p.1559-1565.
- SICHEL, G.; SCALIA, M.; CORSARO, C. 2002. Amphibia kupffer cells. **Microscopy Research and Technique.** v.57, p. 477–490.

- 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**. v.10, p.271-287.
- TONOSAKI, Y.; CRUIJSEN, P.M.J.M.; NISHIYAMA, K.; YAGINUMA, H.; ROUBOS, E.W. 2004. Low temperature stimulates  $\alpha$ -Melanophore-Stimulating Hormone secretion and inhibits background adaptation in *Xenopus laevis*. **Journal of Neuroendocrinology**. v.16, p.894-905.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical Analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.
- ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Influência Hormonal sobre o Sistema Pigmentar em *Eupemphix nattereri* (Anura): Efeitos do alpha-Msh , Estradiol e Testosterona. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto. 150p.
- 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**. v.290, p.795-800.
- ZUASTI, A.; FERRER, C.; AROCA, P.; SOLANO, F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus*, and *Dicentrarchus labrax* (Pisces, Teleostei). **Pigment Cell Research**. v.3, p.126-131.
- ZUASTI, A.; JARA, J.R.; FERRE, C.; SOLANO, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**. v.2, p.93-100.

### **Capítulo 3**

#### **Variação térmica e pigmentação testicular de *Eupemphix nattereri***

**(Anura: Leiuperidae)**

**Variação térmica e pigmentação testicular de *Eupemphix nattereri* (Anura:  
Leiuperidae)**

SANTOS, L.R.S.<sup>1,2</sup>; FRANCO-BELUSSI, L.<sup>2</sup>; ZIERI, R.<sup>2</sup>; BORGES, R.E.<sup>3</sup>; OLIVEIRA, C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano - IFG/Campus Rio Verde. Rodovia Sul Goiana Km 01, s/n. Cep: 75908-000 - Rio Verde - GO, Brasil .

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (UNESP/IBILCE)

<sup>3</sup>Universidade de Rio Verde – GO (FESURV)

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista – Departamento de Biologia (UNESP/IBILCE)

Manuscrito a ser submetido: *The Anatomical Record*

**\*Corresponding Author:**

Lia Raquel de Souza Santos

Instituto Federal Goiano – IFG/Campus Rio Verde - GO

Rodovia Sul Goiana Km 01 – Zona Rural

Cep: 75.908-000 - Rio Verde, GO, Brasil

Phone: +55 64 3620 5632

e-mail: [liaborges.rv@ifgoiano.edu.br](mailto:liaborges.rv@ifgoiano.edu.br)

**Resumo:** As células pigmentares, que contêm pigmentos melânicos, são encontradas em diversos órgãos e estruturas constituindo o sistema pigmentar extracutâneo. Nesse sistema são conhecidas as células de Kupffer ou melanomacrófagos, residentes no fígado e baço de muitos vertebrados, e os melanócitos, que estão presentes na cápsula e no estroma testicular confere uma tonalidade escura aos testículos de algumas espécies de anuros. Embora ambos os tipos celulares apresentem como característica comum a presença de melanina, estas células tem diferenças em sua fisiologia, origem, estrutura e componentes químicos. Para os anuros, estudos das células pigmentares estão mais relacionados às atividades fagocíticas dos melanomacrófagos e alterações deste tipo celular frente às condições naturais de hibernação. Sobre os melanócitos (melanóforos) há alguns trabalhos que descrevem sua ocorrência e distribuição associado ao sistema reprodutor, entretanto estudos relacionados a fatores ambientais de animais em regiões tropicais não tem sido abordado. Assim, neste trabalho verificou-se as respostas dos melanócitos testiculares frente à condição de variação térmica. Foram utilizados sessenta machos adultos da espécie *Eupemphix nattereri*, os quais foram submetidos à condição de hipertermia (35,1°C) e hipotermia (18,9°C), tendo o controle mantido a 27°C. Constatou-se que as células pigmentares presentes no interstício testicular manifestam alterações frente aos experimentos, com aumento da pigmentação testicular em ambos os experimentos. Assim, podemos concluir que a variação térmica com amplitude de 30% para o calor e para o frio, promove aumento da pigmentação testicular, como resposta fisiológica adaptativa ao estresse em que os animais foram submetidos.

**Palavras-chave:** Temperatura, célula pigmentar, testículo, anuro.

**Abstract:** The pigmentary cells, which contain melanin, are found in several organs and structures composing the extracutaneous pigmentary system. In this system there are Kupffer cells or melanomacrophages, present in the liver and spleen of a number of vertebrates, and the melanocytes, which are present in the capsule and in the testicular stroma, what gives the dark coloration to the testicles. Although the two cellular types present melanin as a common feature, these cells have differences in its physiology, origin, structure and chemical components. In anurans, studies with pigmentary cells are more related to the phagocytic activity of melanomacrophages and the changes in these cells during hibernation. There are some studies that describe the occurrence of melanocytes and its distribution associated to the reproductive system, however few studies have focused on how animals respond to environmental factors in the tropics. Thus, this study verified the response of testicular melanocytes which underwent thermal variation. We used 60 adult males of *Eupemphix nattereri*, which were submitted to hyperthermia (35.1°C) and hypothermia (18.9°C). We found that the pigmentary cells in the testicular interstice changed under experimental conditions, with the increase in the testicular pigmentation in the two experiments. Thus, we conclude that the thermal variation promotes an increase in the testicular pigmentation, as an adaptative physiological response to the thermal stress.

**Key-words:** Temperature, pigmentary cell, testicle, anuran.

## Introdução

Os anfíbios junto com os demais vertebrados ectotérmicos, compartilham a presença de um sistema pigmentar, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos (como baço, fígado, pulmão, peritônio, coração, vasos sanguíneos, gônadas), formando o sistema pigmentar extracutâneo (Zieri *et al.*, 2007; Bagnara e Matsumoto, 2006; Gallone *et al.*, 2002; Zuasti *et al.*, 1998 e 1990; Christiansen *et al.*, 1996; Agius e Agbede, 1984; Agius, 1980). Este sistema embora determinado geneticamente, também pode ser alterado em função de uma série de fatores endógenos ou estímulos ambientais, e mudanças sazonais (Macieira e Proni, 2004; Sugimoto, 2002; Barni *et al.*, 2002 e 1999).

Nesse sistema pigmentar, são encontradas células semelhantes a macrófagos, localizados no fígado e baço, denominadas células de Kupffer ou melanomacrófagos (Christiansen *et al.*, 1996; Agius, 1980), com origem de células tronco hematopoéticas (Sichel *et al.*, 1997). De modo particular, células pigmentares também podem ser observadas na cápsula testicular envolvendo e conferindo uma tonalidade escura aos testículos de algumas espécies de anuros, tais como *Rhinella ornata* (Oliveira *et al.*, 2003), *Eupemphix nattereri* (Franco-Belussi *et al.*, 2009; Zieri *et al.*, 2007), *Physalaemus cuvieri* (Moresco e Oliveira, 2009; Oliveira *et al.*, 2003 e 2002), *P. fuscomaculatus* (Aoki, 1969), e em alguns répteis, esta coloração é também relatada na base do pênis e no epidídimo do quelônio *Phrynops geoffranus* (Cabral *et al.*, 2010).

Estas células pigmentares descritas na epiderme e em diversos órgãos são semelhantes à melanócitos (Zuasti *et al.*, 1998; Agius e Agbede, 1984), provenientes da crista neural (Sichel *et al.*, 1997), sendo capazes de produzir e armazenar melanina em seu interior (Agius e Roberts, 2003). A melanina apresenta como funções a neutralização de radicais livres e degradação de material derivado de agentes potencialmente tóxicos (Frangioni *et al.*, 2000; Sichel *et al.*, 1997; Scalia *et al.*, 1990; Zuasti *et al.*, 1989; Geremia

*et al.*, 1989), estando assim relacionada ao sistema imune inato de muitos vertebrados (Mackintosh, 2001; Johnson *et al.*, 1999).

Em relação às células pigmentares, há alguns trabalhos relacionando as condições naturais de hibernação e atividades metabólicas com as células que constituem o sistema pigmentar extracutâneo (Barni *et al.*, 2002 e 1999; Sichel *et al.*, 2002; Frangioni *et al.*, 2000). A maioria destes estudos envolve as células pigmentadas do baço e, principalmente do fígado, as quais apresentam atividade fagocitária (Sichel *et al.*, 2002; Corsaro *et al.*, 2000). Entretanto, as células pigmentares presentes nas gônadas de anuros, foram pouco estudadas. Um trabalho recente propõe um protocolo de quantificação que estabelece uma relação entre as células pigmentares do testículo e a coloração que promovem ao órgão (Franco-Belussi *et al.*, 2009), outros como o realizado por Grant *et al.* (2006) utilizam a pigmentação presente no intestino e testículo de algumas espécies de anuros como um caráter taxonômico. Contudo, estudos com a pigmentação testicular relacionada a fatores ambientais ainda não foram realizados. Assim, neste estudo, verificou-se o efeito da variação térmica com amplitude de 30% para o calor e para o frio, sobre a pigmentação testicular do anuro *Eupemphix nattereri*.

## **Material e Métodos**

Sessenta e cinco machos adultos da espécie *Eupemphix nattereri* foram coletados em seu habitat natural durante o período reprodutivo (Novembro de 2007 a Fevereiro de 2008) em poças temporárias e permanentes localizadas no município de São José do Rio Preto, SP – Brasil (20°49'12,65"S e 49°22'46,85" W). Os animais foram levados ao laboratório de Anatomia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A coleta de exemplares (RAN/IBAMA/MMA 18573-1) e todo o manuseio experimental e de eutanásia dos animais seguiram recomendações do Comitê de Ética e Experimentação Animal da



Universidade Estadual Paulista - UNESP / Botucatu, de acordo com o *Guia de cuidados e uso de animais em laboratório* (Protocolo No. 70/07-CEEA).

### **Experimento de variação térmica**

Para o estresse térmico, os animais (n=60) foram submetidos à variação de temperatura por hipotermia e hipertermia em estufa incubadora para B.O.D. (Modelo 121 FC). Os animais foram acondicionados em terrários (73x41x52cm) nos quais havia 5cm de terra, além de água e alimentos. Para o grupo controle de ambos os experimentos (hipertermia e hipotermia), foram utilizados 5 animais que permaneceram em terrários individuais, porém à temperatura ambiente (27°C).

A elevação ou diminuição da temperatura, para aplicar a condição hipertérmica (35,10°C) ou hipotérmica (18,9°C), foi estipulada considerando um percentual de 30% acrescido ou diminuído da temperatura ambiente (27°C), a partir da habituação dos animais em terrário. Esta determinação levou em consideração não somente a temperatura média registrada diariamente (3 vezes ao dia) no período em que os animais permaneceram nos terrários, antes do início dos experimentos, como também a temperatura média anual registrada no ano anterior ao desenvolvimento do trabalho, visando observar os valores máximos e mínimos registrados, e portanto toleráveis para estes organismos. Esta metodologia, pioneira para estudos em anuros, teve como objetivo padronizar valores térmicos compatíveis ao clima regional onde estes organismos são encontrados, respeitando assim seus limites fisiológicos.

### **Procedimentos experimentais:**

**Experimento de Hipertermia:** este experimento foi realizado em três tempos experimentais (12h, 24h e 48h), onde 30 animais foram utilizados para testar a condição de hipertermia (35,1°C). Para cada tempo experimental, dez animais foram mantidos

individualmente em terrários (28x21x15cm) dentro da câmara B.O.D. à temperatura de 35,1°C. No primeiro tempo, dez animais permaneceram em condição de hipertermia por 12 horas, dos quais cinco foram analisados imediatamente após este período, e os cinco restantes ficaram em recuperação, à temperatura ambiente, por 12 horas e, em seguida analisados. Para os demais tempos (24h e 48h), os procedimentos experimentais se deram da mesma maneira.

**Experimento de Hipotermia:** este experimento também foi realizado em três tempos experimentais (12h, 24h e 48h), onde outros 30 animais da mesma espécie foram utilizados para testar a condição de hipotermia (18,9°C). Para cada tempo experimental, dez animais foram mantidos individualmente em terrários (28x21x15cm) dentro da câmara B.O.D. à temperatura de 18,9°C. No primeiro tempo, dez animais permaneceram em condição de hipotermia por 12 horas dos quais cinco foram analisados imediatamente após este período e os cinco restantes ficaram em recuperação, à temperatura ambiente, por 12 horas, e em seguida analisados. Para os demais tempos (24h e 48h), os procedimentos experimentais ocorreram da mesma maneira.

### **Análise morfológica**

Para as análises morfológicas fragmentos de testículo foram fixados em solução fixadora Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído a 5% e glutaraldeído 2.5%), por 24 horas, a 4°C. Posteriormente as amostras foram lavadas em água, desidratadas em série alcoólica e emblocadas em historesina (*Leica-historesin embedding kit*). Secções de 2µm foram obtidas em micrótomo (*Leica RM 2265*), e os cortes montados em lâminas, foram corados com Hematoxilina-eosina. Posteriormente, o tecido testicular (cortes), foi observado em microscópio (*Leica DM4000 B*) com sistema de captura de imagens (*Leica DFC 280*).

Para estabelecer se há relação entre variações na pigmentação testicular e condições experimentais, foram analisados um total de 900 campos histológicos, onde aplicou-se análises morfométricas computadorizadas para a quantificação da pigmentação com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc. (versão 4.5) de acordo com a proposta de Lehr *et al.* (1997) com adaptações, a qual se baseia na diferença de intensidade de coloração, em cortes histológicos do testículo, corados com Hematoxilina-eosina. Para a quantificação da pigmentação, foram analisados os 10 animais de cada tempo experimental (12h, 24h e 48h), sendo 5 animais analisados imediatamente ao estresse térmico (I) e 5 animais analisados após recuperar do estresse térmico (R). De cada animal foram selecionados 3 cortes do tecido testicular e destes, aleatorizados 15 campos histológicos. Assim, foi analisado um total de 150 campos histológicos para cada tempo experimental (12, 24 e 48 horas). Desta forma, para testar a hipertermia ou hipotermia foram analisados 450 campos histológicos e, portanto para testar a condição de variação térmica para o órgão foi analisado um total de 900 campos histológicos.

### **Análises estatísticas**

Para análise dos dados, primeiramente foram identificados valores discrepantes (*outliers*) e, posteriormente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos foi aplicada a análise de variância (ANOVA) um critério e quando não paramétricos, foram submetidos à normalização  $(x+0,5)^{1/2}$ . Caso os dados permanecessem não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado  $p \leq 0,05$  como referência para se atribuir significância estatísticas sendo todas as análises baseadas em Zar (1999).

## **Resultados**

### **Localização e morfologia**

As células pigmentares do testículo de *Eupemphix nattereri*, apresentam-se distribuídas na superfície externa do órgão, mais especificamente na cápsula testicular ou túnica albugínea, e confere uma coloração escura ao testículo desta espécie (Figura 1A). Esta coloração, entretanto, é observada também no estroma testicular, pois as células pigmentares são encontradas no espaço intersticial, dispostas ao redor dos lóculos seminíferos. Muitos melanócitos testiculares estão intimamente associados à rede vascular do órgão, principalmente os que estão dispostos na área interlocular. Normalmente, estas células apresentam-se com aspecto dendrítico, onde os pigmentos estão dispersos pelo citoplasma da célula (Figura 1B, C e D).

### **Estresse hipertérmico**

As análises demonstraram que a condição hipertérmica promove um aumento da pigmentação no interstício testicular. Com 12 e 48 horas de tempo experimental, houve um aumento da área pigmentada nos animais analisados imediatamente após o estresse térmico, quando comparados com os animais do grupo controle ( $H=50,57$ ;  $p\leq 0,05$ ). Com 24 horas a pigmentação testicular mantém-se semelhante ao controle ( $H=50,57$ ;  $p>0,05$ ). Os animais recuperados também apresentaram nas primeiras horas de recuperação (12h), aumento de pigmentação (12h:  $F=4,53$ ;  $p\leq 0,01$ ) com posterior tendência a uma diminuição aproximando-se ao controle com o passar do tempo experimental (24h e 48h) ( $F=4,53$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 2).

Analisando os tratamentos (imediato x recuperado) observa-se que apenas com 12 horas houve diferença entre os animais analisados imediatamente e os recuperados do estresse hipertérmico (12h:  $F=14,09$ ;  $p\leq 0,05$ ). Com 24 horas de exposição à alta temperatura, não se observa aumento ou redução da área pigmentada, sendo ambos os tratamentos semelhante ao controle e entre si ( $F=1,50$ ;  $p=0,22$ ). Verifica-se também que

com tempo maior (48h), não há diferença entre os tratamentos, com relação à pigmentação testicular ( $H=8,90$ ;  $p>0,05$ ). (Figura 3 e 4).

### **Estresse hipotérmico**

Neste experimento, os animais do tratamento imediato de 12 e 24 horas manifestam aumento da área pigmentar no testículo frente à baixa temperatura, comparados aos animais do grupo controle ( $F=31,82$ ;  $p<0,01$ ). Com o decorrer do tempo sob estresse experimental (48h), há uma diminuição de área pigmentar assemelhando-se ao controle ( $F=31,82$ ;  $p>0,05$ ). Para os animais recuperados, observou-se uma diminuição da área pigmentar com 12 e 24 horas quando comparado aos animais do grupo imediato, na mesma hora; aproximando-se, portanto dos valores do grupo controle ( $F=16,80$ ;  $p>0,05$ ). Com o decorrer do tempo experimental (48h), observa-se um aumento da área pigmentar ( $F=16,80$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 5).

Analisando o efeito do tratamento (imediato x recuperado) verificou-se que em todos os tempos experimentais (12, 24 e 48 horas) houve diferença entre animais analisados imediatamente e os recuperados do estresse hipotérmico (12h:  $F=35,94$ ;  $p<0,01$ ; 24h:  $F=81,08$ ,  $p<0,01$ ; 48h:  $F=19,13$ ,  $p<0,01$ ). De modo geral, para todas as horas, verificou-se que houve semelhança e/ou aumento da área pigmentar, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 6 e 7).

### **Efeito do experimento**

Com relação ao efeito da alta ( $35,1^{\circ}\text{C}$ ) e baixa ( $18,9^{\circ}\text{C}$ ) temperatura em animais analisados imediatamente após o estresse, verificou-se um aumento da área pigmentar com 12h comparado ao grupo controle ( $F=27,35$ ,  $p<0,001$ ). Houve também diferença significativa entre os experimentos para os animais com maior tempo de exposição à variação térmica (24h e 48h), sendo observado um aumento e semelhança da pigmentação

testicular quando comparados ao grupo controle (24h:  $F=32,70$ ,  $p<0,01$ ; 48h:  $H=11,48$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 8 e 9). Para os animais que se recuperam do estresse térmico, pelo mesmo tempo que sofreram à exposição, verificou-se que em 12 e 48 horas houve diferença entre os experimentos (12h:  $F=5,61$ ,  $p<0,05$ ; 48h:  $11,70$ ,  $p<0,01$ ), sendo que em todos os tempos experimentais houve aumento ou equivalência de área pigmentada quando comparados ao grupo controle (Figura 10 e 11).

## Discussão

Os melanócitos testiculares apresentam ampla distribuição na cápsula testicular e confere uma tonalidade escura ao órgão, devido à presença de pigmentos melânicos, os quais são formados em organelas citoplasmáticas denominadas melanossomos. Os melanócitos apresentam desde um aspecto dendrítico com muitos prolongamentos citoplasmáticos ao puntiforme, possivelmente pela agregação dos pigmentos no centro da célula (Zieri *et al.*, 2007; Bagnara e Matsumoto, 2006). A intensa pigmentação na cápsula testicular é semelhante ao observado por Franco-Belussi *et al.* (2009) e Zieri *et al.* (2007), onde é relatado pigmentação em toda a superfície testicular. Além disto, os melanócitos testiculares não somente encontram-se presentes na túnica albugínea (cápsula testicular) que envolve este órgão, mas também no interstício testicular, especificamente ao redor dos lóculos seminíferos, conferindo também uma pigmentação escura ao estroma.

Ao comparar a resposta dos melanócitos testiculares aos melanomacrófagos hepáticos submetidos ao mesmo tratamento e descrito por Santos (2010 em preparação), verifica-se que a variação térmica promoveu um aumento da pigmentação no testículo, e no fígado esta mesma condição levou uma diminuição na área pigmentar hepática. Pode-se interpretar que há diferenças funcionais entre melanócitos e melanomacrófagos, a qual inclui vias sintéticas de transdução e controle para síntese de melanina, morfologia ou composição química destes tipos celulares (Franco-Belussi, 2010; Zieri *et al.*, 2007;

Bagnara e Matsumoto, 2006; Guida *et al.*, 2004; Gallone *et al.*, 2002; Corsaro *et al.*, 2000; Sciuto *et al.*, 1988). Além disto, estudos realizados por Franco-Belussi (2010) e Agius e Agbede (1984), demonstraram que os melanomacrófagos presentes no fígado, apresentam grânulos de lipofuscina e de hemosiderina; os quais não são observados nos melanócitos testiculares, por não apresentarem função de destruição de membranas de ácidos graxos e de derivados da degradação de eritrócitos, função esta atribuída aos melanomacrófagos (Franco-Belussi, 2010). Entretanto, estes tipos celulares apresentam em comum a formação de melanina nos melanossomos (Zuasti *et al.*, 1998).

É relatado que o movimento de agregação ou dispersão dos melanossomos nas células pigmentares ocorre por meio da ação nervosa e hormonal (Bagnara e Matsumoto, 2006). Assim, a resposta observada no aumento da pigmentação testicular, frente a condição hipotérmica, pode estar relacionada com a dispersão dos melanossomos pelo citoplasma dos melanócitos, uma vez que baixas temperaturas estimulam a secreção do  $\alpha$ -Hormônio Estimulante de Melanina ( $\alpha$ -MSH), o qual tem como função a dispersão dos pigmentos na célula (Tonosaki *et al.*, 2004). Estes mesmos autores em seus estudos com *Xenopus laevis* afirmam que a mudança de cor na pele é um mecanismo fisiológico adaptativo de resposta ao estresse, quando os animais são submetidos a condição de baixa temperatura (Tonosaki *et al.*, 2004). Logo sugerimos que na baixa temperatura predomina a ação do  $\alpha$ -MSH para aumentar a pigmentação testicular.

Na condição hipertérmica, verificamos que também houve um aumento da pigmentação testicular como resposta ao estresse em que foram submetidos. De acordo com (Figueiredo *et al.*, 2001) o efeito da temperatura está relacionado às alterações endócrinas sobre as atividades metabólicas e sexuais dos anuros; e estudos histológicos já comprovaram que temperaturas elevadas estimulam a secreção de hormônios sexuais pela hipófise (Iela *et al.*, 1980). Com base nestes indícios, sugerimos que o aumento da pigmentação testicular na hipertermia está relacionado à liberação predominantemente de

hormônios sexuais, corroborando o estudo de Zieri (2010), o qual demonstrou que o hormônio testosterona administrado exogenamente promove um aumento na pigmentação testicular em *E. nattereri*. Outros estudos têm demonstrado que hormônios esteróides influenciam a pigmentação (Bagnara e Matsumoto, 2006) e tais efeitos foram relatados por Himes e Hadley (1971), que observou que a progesterona exerce uma resposta na ação do  $\alpha$ -MSH nos anfíbios anuros. Outra função dos hormônios sexuais é a mudança de cor relatada por Richards (1982), que demonstrou uma profunda alteração da expressão dos cromatóforos por hormônios sexuais em anuros.

O aumento da pigmentação, encontrada no testículo como resposta à variação térmica, pode estar relacionada à absorção de radicais livres e proteção contra agentes patogênicos, pois a melanina atua favorecendo a ação enzimática contra os agentes patológicos, a qual pode estar restrita com mudanças abruptas na temperatura (Cristhiansen *et al.*, 1996). Ainda, com relação a temperatura, Werner (1969) e Oordt (1956) afirmam que este fator abiótico, influencia os ciclos espermatogênicos. Assim, inferimos que as células pigmentares presente no interstício testicular possam estar também relacionadas à proteção da atividade da espermatogênese, pois verificamos que houve uma rápida resposta, com aumento significativo da pigmentação testicular nas primeiras horas experimentais (12h) para ambos os experimentos. Essa resposta com aumento da pigmentação também foi detectada por Franco-Belussi (2010) para a mesma espécie, a qual também atribui a função de proteção aos melanócitos testiculares frente ao agente infeccioso (LPS de *Escherichia coli*). Além disso, ainda é razoável supor que a pigmentação na gônada pode conferir proteção, atuando na termorregulação.

As células pigmentares desempenham funções de acordo com sua localização (Boissy e Hornyak, 2006) assim, mudanças de funções destes tipos celulares refletem mecanismos de respostas da interação entre o indivíduo e o ambiente. A função dos melanócitos extracutâneos não deve fornecer primariamente uma proteção a fatores



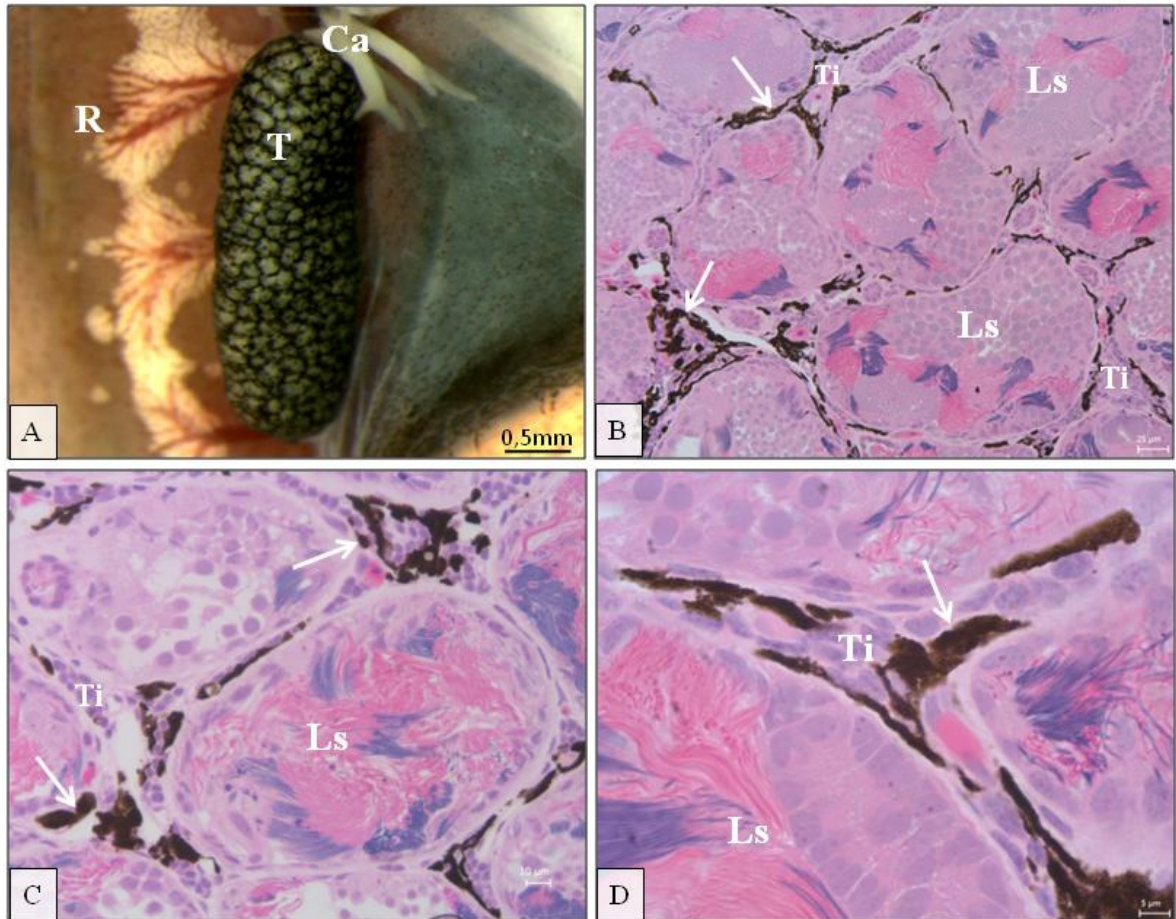
ambientais e interação de comportamento social (Boissy e Hornyak, 2006), pois uma simples constatação e comparação desta espécie com outras que ocupam o mesmo hábitat não compartilham esta propriedade de pigmentação testicular, como verificado nos estudo de Franco-Belussi *et al.* (2009).

Desta forma, a localização dos melanócitos testiculares no tecido intersticial, mais especificamente ao redor dos lóculos seminíferos, torna os dados morfológicos evidentes e interessantes, pois necessita de uma melhor explicação para sua função, a qual provavelmente estaria relacionada aos ajustes biológicos inerentes no organismo.

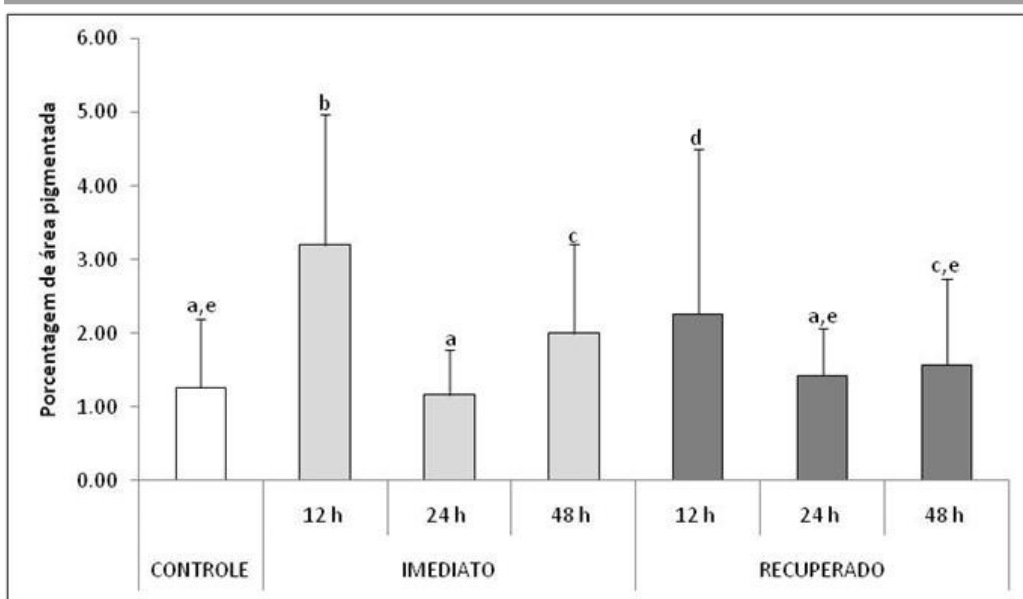
### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 02/08016-9, 05/02919-5), CNPq (Processo 475248/2007-4) e FUNDUNESP (Processo 01209/08 - DFP) pelo suporte financeiro ao projeto.

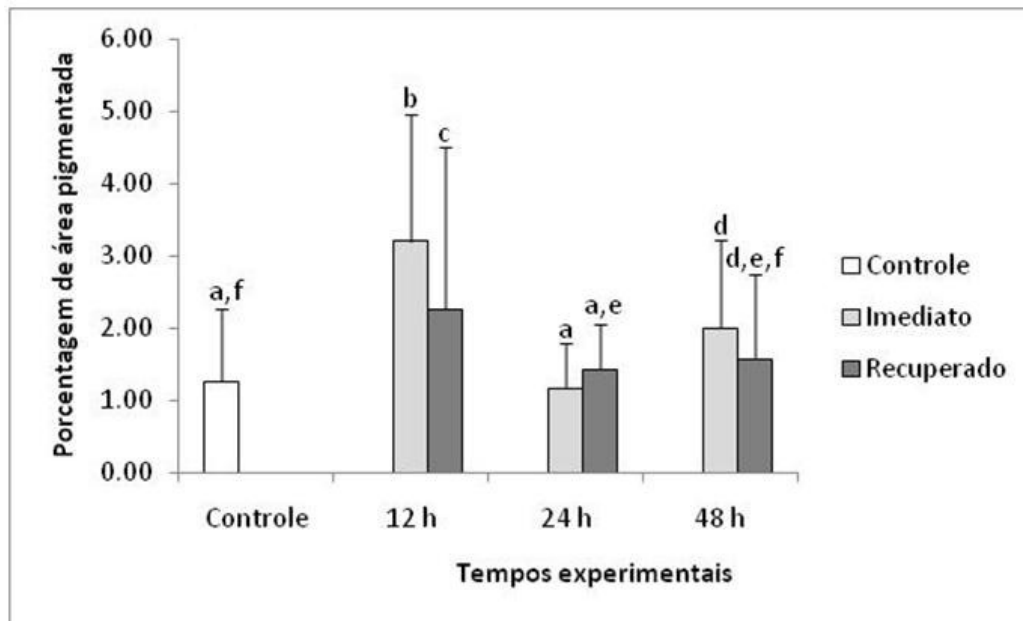
**Figuras**



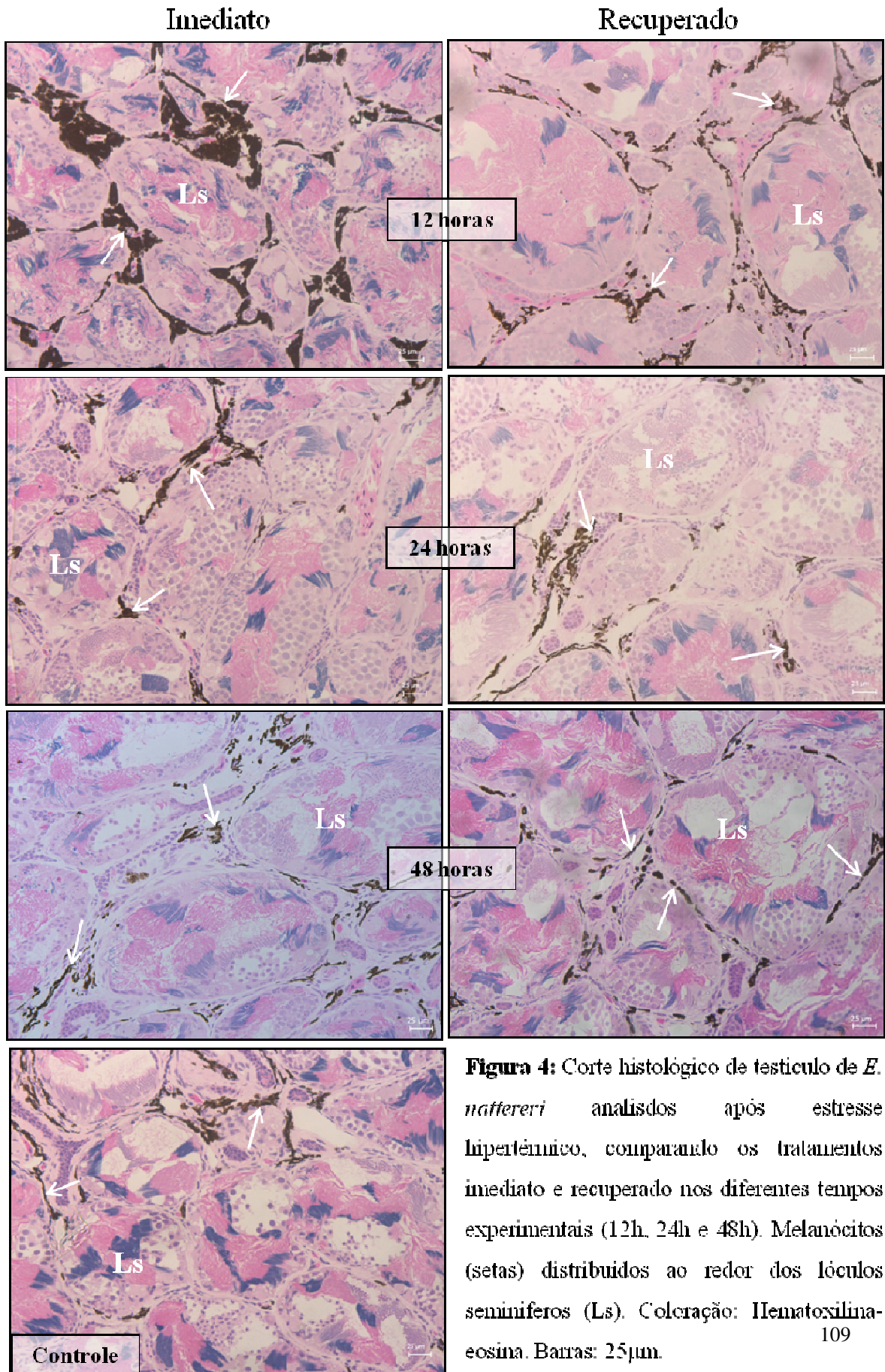
**Figura 1:** A: Testículo de *Eupemphix nattereri* evidenciando a coloração escura conferida pela presença de melanócitos. R: rim, T: testículo, Ca: corpos adiposos. B, C e D: Corte histológico de testículo evidenciando a presença de melanócitos (setas) distribuídos ao redor dos lóculos seminíferos (Ls), mais especificamente no tecido intersticial (Ti). Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras: 25µm (Figura B), 10µm (Figura C) e 5µm (Figura D).

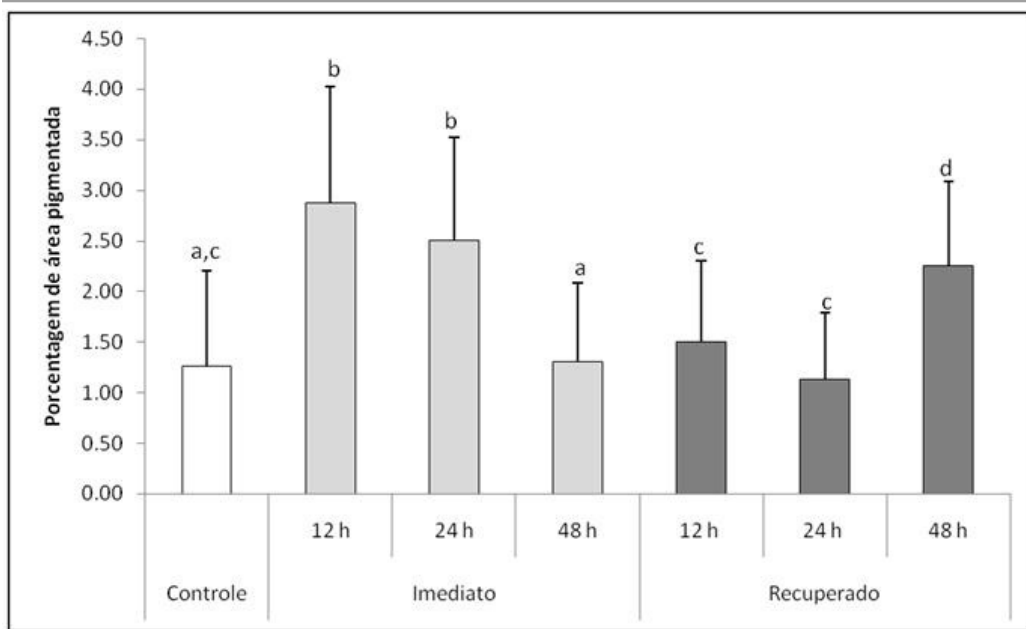


**Figura 2:** Diferença na porcentagem de área pigmentada presente no testículo de *E. nattereri* submetidos à condição de Hipertermia. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tempos experimentais de um mesmo tratamento e entre os tratamentos (imediato e recuperado) no mesmo tempo experimental (horas) ( $p \leq 0,05$ ).

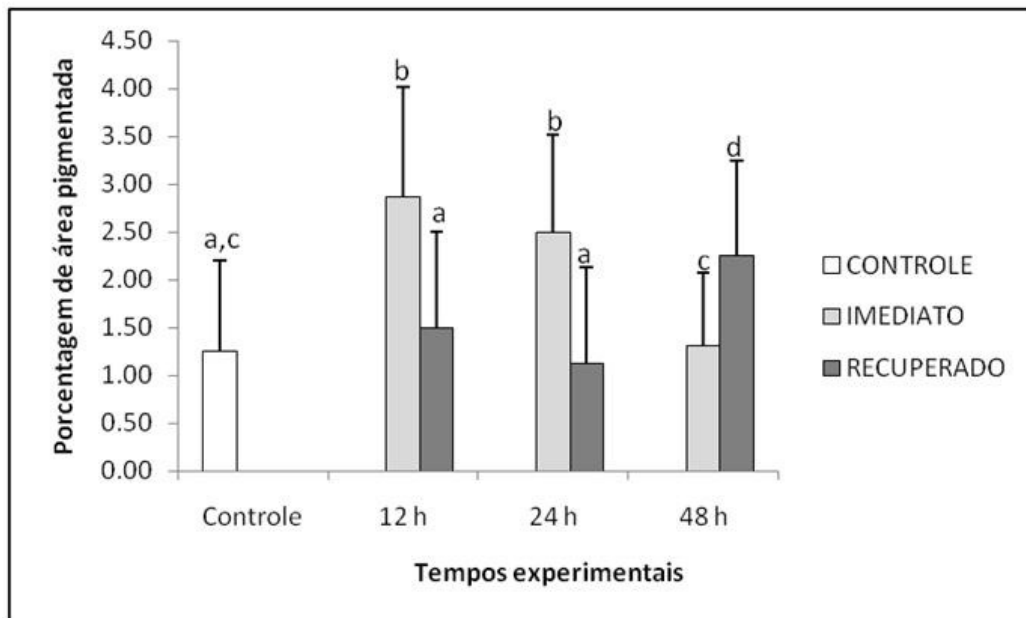


**Figura 3:** Diferença na porcentagem de área pigmentada nos diferentes tempos e entre os diferentes tratamentos experimentais e o grupo controle. Experimento de Hipertermia com *E. nattereri*. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

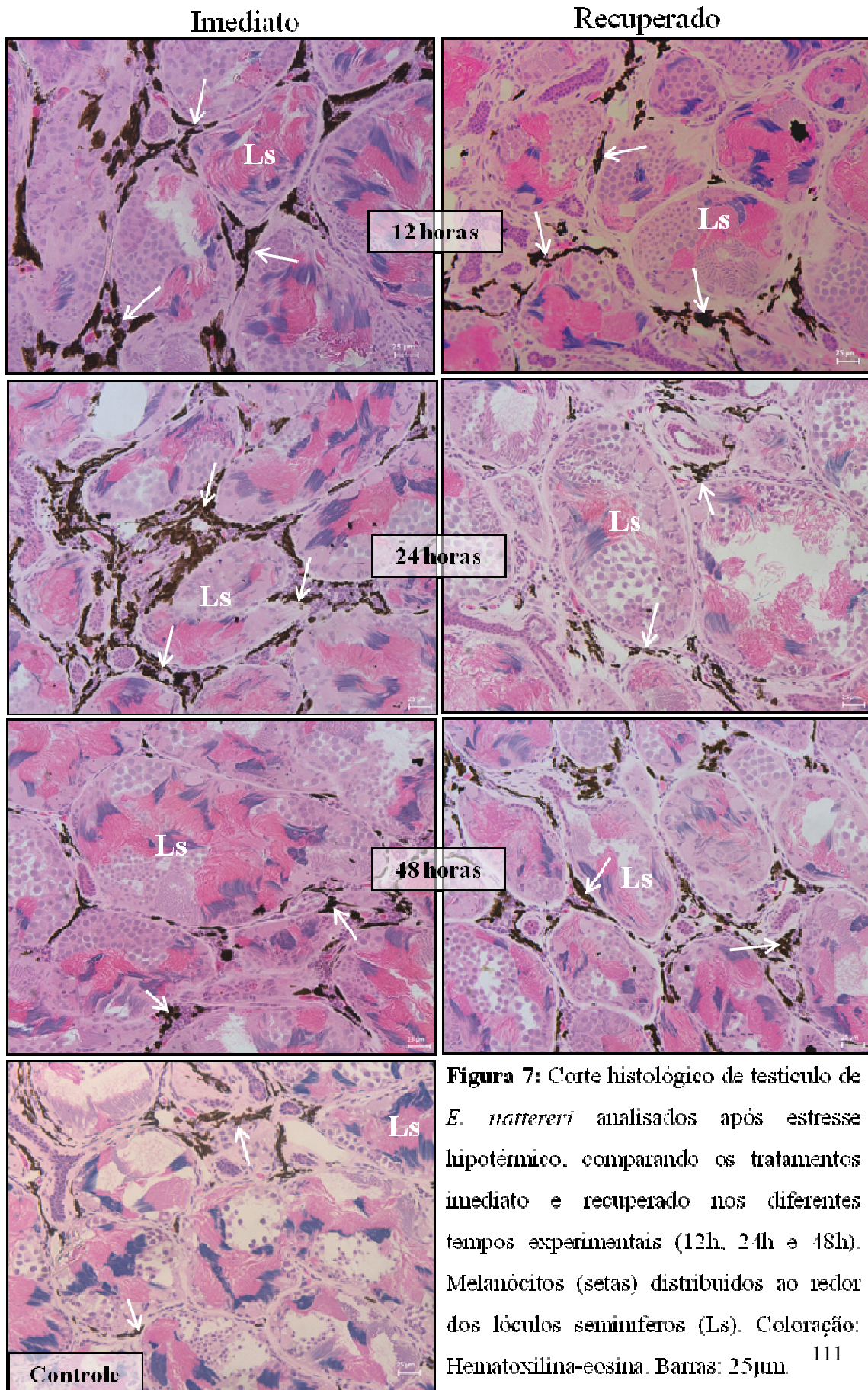




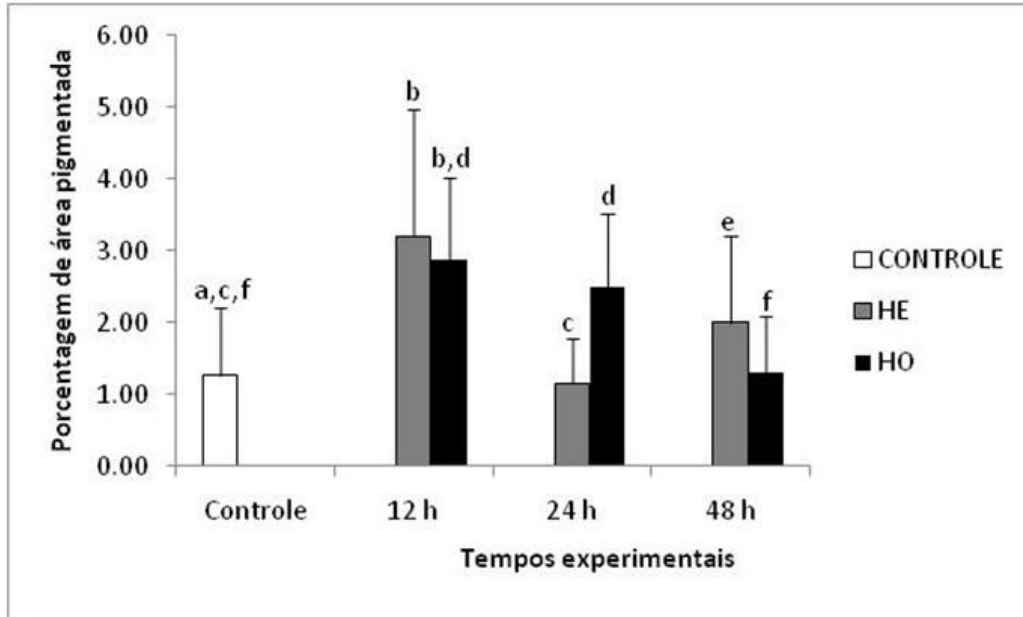
**Figura 5:** Diferença na porcentagem de área pigmentada presente no testículo de *E. nattereri* submetidos à condição de Hipotermia. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tempos experimentais de um mesmo tratamento e entre os tratamentos (imediato e recuperado) na mesma hora ( $p \leq 0,05$ ).



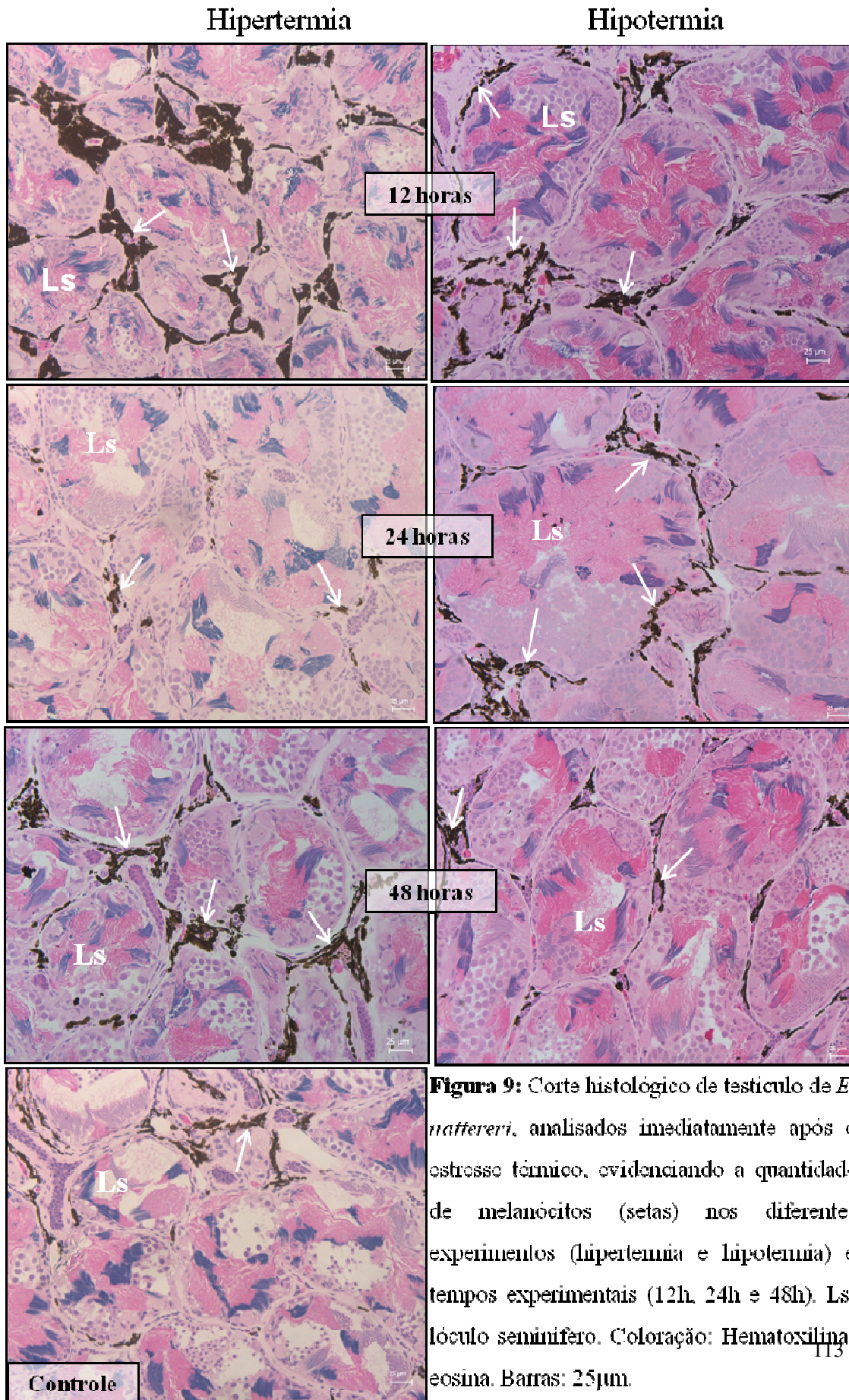
**Figura 6:** Diferença na porcentagem de área pigmentada nos diferentes tempos e entre os diferentes tratamentos experimentais e o grupo controle. Experimento de Hipotermia com *E. nattereri*. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 7:** Corte histológico de testículo de *E. nattereri* analisados após estresse hipotérmico, comparando os tratamentos imediato e recuperado nos diferentes tempos experimentais (12h, 24h e 48h). Melanócitos (setas) distribuídos ao redor dos lóculos seminíferos (Ls). Coloração: Hematoxilina-ecisina. Barras: 25µm.

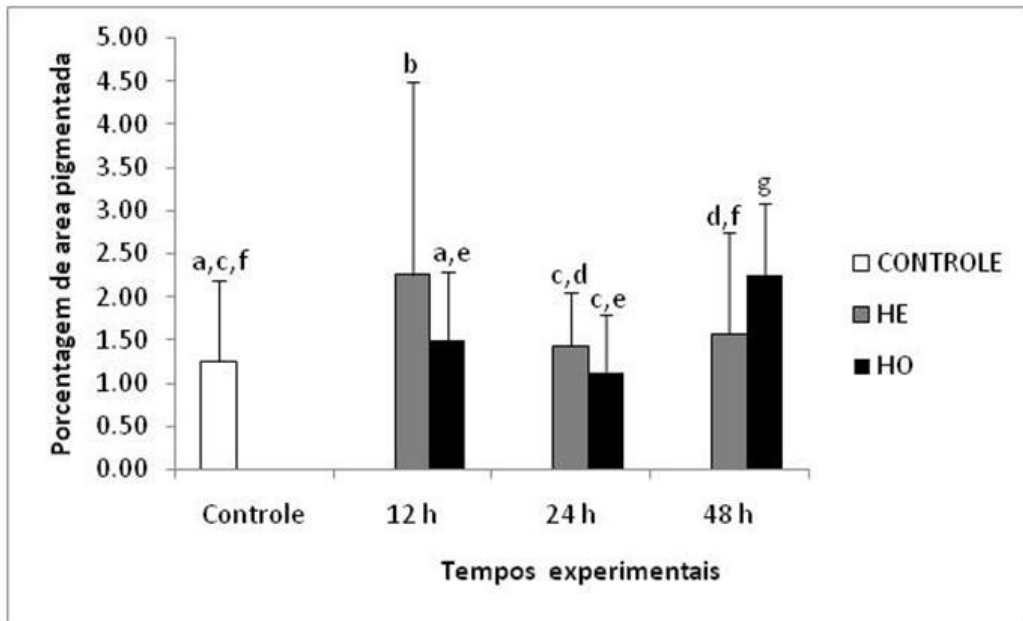


**Figura 8:** Comparação entre a porcentagem de área pigmentada entre os experimentos de hipertermia e hipotermia do anuro *E. nattereri* analisado imediatamente ao estresse térmico. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).

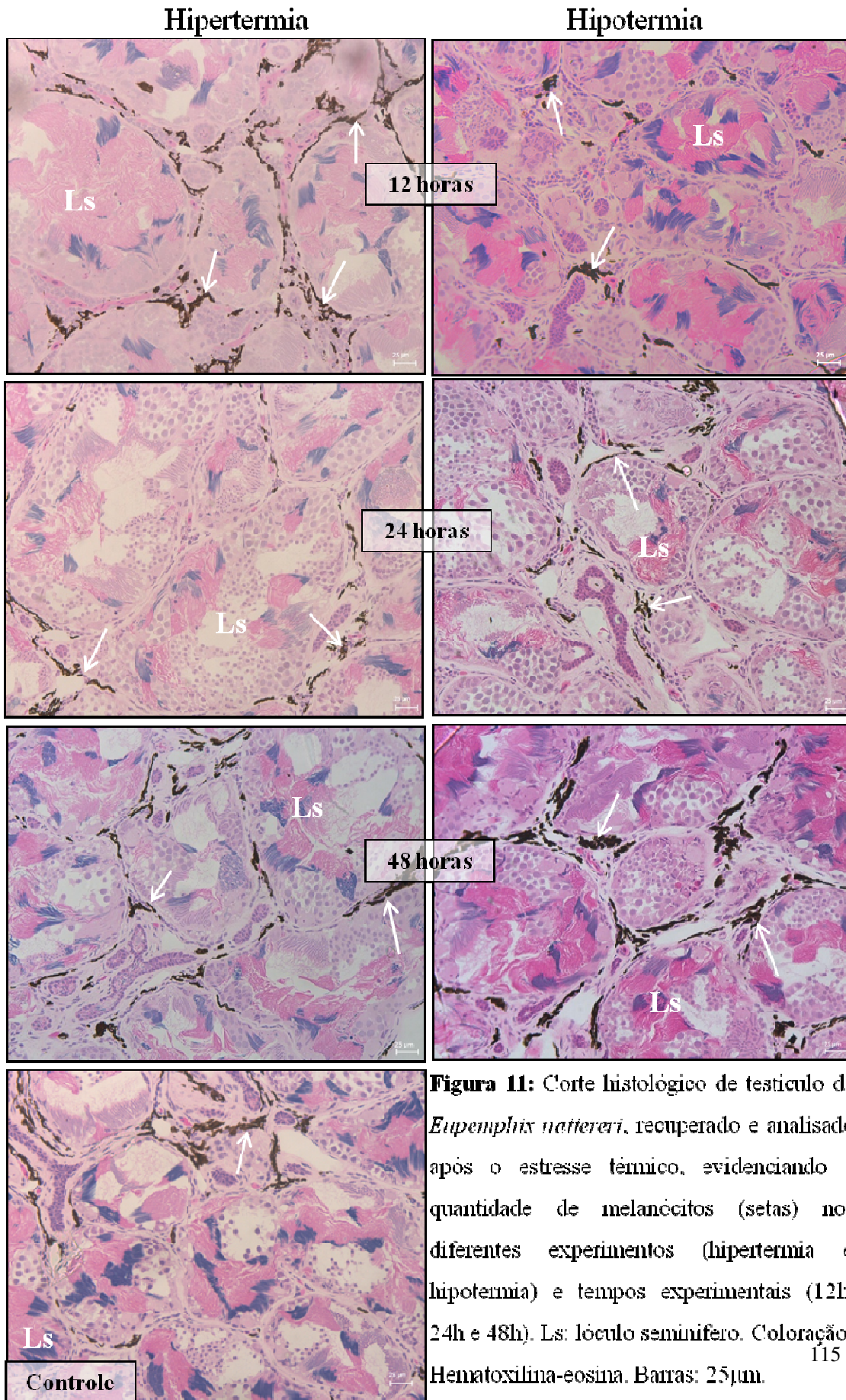


**Figura 9:** Corte histológico de testículo de *E. nattereri*, analisados imediatamente após o estresse térmico, evidenciando a quantidade de melanócitos (setas) nos diferentes experimentos (hipertermia e hipotermia) e tempos experimentais (12h, 24h e 48h). Ls: lóculo seminífero. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras: 25µm.





**Figura 10:** Comparação entre a porcentagem de área pigmentada entre os experimentos de hipotermia e hipertermia para os animais analisados após recuperação do estresse térmico. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 11:** Corte histológico de testículo de *Eupemphix nattereri*, recuperado e analisado após o estresse térmico, evidenciando a quantidade de melanócitos (setas) nos diferentes experimentos (hipertermia e hipotermia) e tempos experimentais (12h, 24h e 48h). Ls: lóculo seminífero. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras: 25µm.

## Referências

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melanomacrophage centers in fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.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**. v.24, n.4, p.471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.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**. v.98, n.1, p.9-16.
- BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. p.11-59. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> 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**. v.195, p.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**. v.200, p.185-194.
- BIOSSY, R.E.; HORNYAK, T.J. 2006. Extracutaneous melanocytes. p.91-107. *In: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. New York, Oxford: University Press, 2<sup>a</sup> ed., 1229p.

- CABRAL, S.R.P.; SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Anatomia do Sistema Reprodutor Masculino de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). **Zoologischer Anzeiger**. *In press*
- 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, N.; MONDIO, F.; SICHEL, G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. **Journal of Anatomy**. V.196, p.249–261.
- FIGUEIREDO, M.R.C.; LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A.; BAÊTA, F.C. 2001. Efeito da temperatura e do fotoperíodo sobre o desenvolvimento do aparelho reprodutor da Rã-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.3, p.916-923.
- FRANCO-BELUSSI, L. 2010. **Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo no anuro *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto/SP. 113p.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran testes: Anatomical pattern and variation. **The Anatomical Record**. v.292, p.178-182.
- 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**. v.287, p.120-127.
- 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**. v.15, p.32-40.

- GEREMIA, E.; CORSARO, C.; BARATTA, D.; SANTORO, C.; SCALIA, M.; SICHEL, G. 1989. Antioxidant enzymatic systems in pigment tissue of Amphibia. **Pigment Cell Res.** v.2, p.208-212.
- 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.** v.17; p.128-134.
- HIMES, P.J.; HADLEY, M.E. 1971. In vitro effects of steroid hormones on frog melanophores. **Journal of Investigative Dermatology.** v.57, p.337-343.
- IELA, L.; PIERANTONI, R.E.; RASTOGI, R.K. 1980. Effect of temperature and light on the production of androgens in the male *Rana esculenta*. **Experientia.** v.36, p.256-257.
- 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.** v.12, n.6, p.376-382.
- LEHR, H.A.; MANKOFF, D.A.; CORWIN, D.; SANTEUSANIO, G.; GOWN, A.M. 1997. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. **The journal of Histochemistry & Cytochemistry.** v. 45, n.11, p.1559-1565.
- MACIEIRA, O.J.D.; PRONI, E.A. 2004. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera,

- Apidae) durante os períodos de verão e inverno. **Revista Brasileira de Zoologia.** v.21, n.4, p.893-896.
- MACKINTOSH, J.A. 2001. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. **Journal of Theoretical Biology.** v.211, p.101-113.
- 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.** v.4, n.1, p.1-8.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A.; TABOGA, S.R. 2003. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia.** v.56, n.1, p.75-83.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura). **Revista Chilena de Anatomia.** v.20, n.3, p.263-268.
- RICHARDS, C.M. 1982. The alteration of chromatophore expression by sex hormones in the Kenyan reed frog, *Hyperolius viridiflavus*. **General and Comparative Endocrinology.** v.46, p.58-67.
- SANTOS, L.R.S. 2010. **Efeitos da variação térmica sobre o sistema pigmentar extracutâneo do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae).** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista – Campus São José do Rio Preto/SP. 135p.
- SCALIA, M.; GEREMIA, E.; CORSARO, C.; SANTORO, C. BARATTA, D.; SICHEL, G. 1990. Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissues: protective role of melanin. **Pigment Cell Research.** v.3, p.115-119.
- SCIUTO, S.; CHILLEMI, R.; PATTI, A.; SICHEL, G.; SCALIA, M. 1988. Melanosomes from liver and skin of *Rana esculenta* L. A comparative chemical study. **Comparative Biochemistry Physiology B.** v.90, p.397-400.

- SICHEL, G.; SCALIA, M.; CORSARO, C. 2002. Amphibia kupffer cells. **Microscopy Research and Technique**. v.57, p. 477–490.
- 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**. v.10, p.271-287.
- SUGIMOTO, M. 2002. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology. 2002. **Microscopy Research and Technique**. v.58, p.496-503.
- TONOSAKI, Y.; CRUIJSEN, P.M.J.M.; NISHIYAMA, K.; YAGINUMA, H.; ROUBOS, E.W. 2004. Low temperature stimulates  $\alpha$ -Melanophore-Stimulating Hormone secretion and inhibits background adaptation in *Xenopus laevis*. **Journal of Neuroendocrinology**. v.16, p.894-905.
- VAN OORDT, P.G.W.J. 1956. The role of temperature in regulating the spermatogenic cycle in the common frog, (*Rana temporaria*). **Acta Endocrinologica**.v.23, p.251-264.
- WERNER, J.K. 1969. Temperature-photoperiod effects on spermatogenesis in the salamander *Plethodon cinereus*. **Copeia**. v.1969, n.3, p.592-602.
- ZAR, J. 1999. **Biostatistical Analyses**. Printice Hall, New Jersey, 663p.
- ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Influência Hormonal sobre o Sistema Pigmentar em *Eupemphix nattereri* (Anura): Efeitos do alpha-Msh , Estradiol e Testosterona. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto. 150p.
- 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**. v.290, p.795-800.

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

ZUASTI, A.; JARA, J.R.; FERRE, C.; SOLANO, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**. v.2, p.93-100.

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



## VIII. Síntese do Trabalho

Constatou-se que o anuro *Eupemphix nattereri* apresenta um sistema pigmentar extracutâneo constituído por células contendo pigmentos melânicos na superfície de vários órgãos e tecidos, em todos os sistemas orgânicos e de modo bastante peculiar para a espécie quando comparado a outras espécies. Estes tipos celulares apresentam aspecto diverso, variando do dendrítico ou estrelado ao puntiforme devido à presença ou ausência de prolongamentos citoplasmáticos ou do grau de dispersão dos pigmentos, respectivamente.

A variação térmica empregada neste estudo possibilitou demonstrar que fatores abióticos, promovem alterações na pigmentação do tecido hepático e testicular. Entretanto, nas análises mesoscópicas verificou-se que a variação térmica não promove alterações na ocorrência e intensidade da pigmentação visceral presente na superfície dos órgãos analisados, permitindo estabelecer um padrão de descrição anatômico desse sistema presente nos órgãos da cavidade abdominal do anuro *Eupemphix nattereri*. Este padrão anatômico torna os dados interessantes do ponto de vista filogenético, uma vez que pode ser considerado um parâmetro fixo para organismo, e usado em ferramentas taxonômicas, como já ocorre em alguns estudos.

Análises histológicas permitiram confirmar que as células pigmentares hepáticas e testiculares, respondem ao estímulo por variação térmica. Esta resposta, entretanto, é manifestada na diminuição da pigmentação no tecido hepático e aumento no tecido testicular. Ainda deve ser destacado que são tipos morfológicos distintos, respectivamente, melanomacrófagos ou células de Kupffer e melanócitos ou melanóforos viscerais.

Com bases na bibliografia especializada e especialmente com este estudo, sugerimos que os melanomacrófagos presentes no fígado, apresentam funções relacionadas à termorregulação, concorrendo para estabelecer a homeostasia corporal destes

organismos; além é claro, das já definidas funções relacionadas à natureza fagocitária do macrófago, associado ao sistema imunológico. Embora não se saiba exatamente o princípio pelo qual a temperatura atue, provavelmente ocorra interferência em alguma via biosintética de formação dos pigmentos melânicos e movimentação dos melanossomos no citoplasma da célula.

Com relação aos melanócitos, sugere-se que o aumento de pigmentação verificado no testículo, possa estar relacionado à proteção conferida pela melanina. Essas considerações são reforçadas com outros estudos na área, que relacionam aumento de pigmentação frente à exposição de hormônios sexuais. Sabe-se que a temperatura, está diretamente relacionada à reprodução de anfíbios anuros, e variações neste parâmetro, interferem na época de reprodução, modos reprodutivos, corte, vocalização e demais comportamentos associados à reprodução; devido a alteração nos níveis dos hormônios sexuais no plasma sanguíneo. Assim, sugerimos que a presença (aumento) destas células pigmentares no testículo, esteja relacionada à dispersão dos melanossomos no citoplasma das células. Esta pigmentação pode estar envolvida com mecanismos de proteção e secundariamente de termorregulação, pois processos espermatogênicos necessitam de temperaturas ideais para que ocorram adequadamente sem prejuízos funcionais, uma vez que, segundo alguns autores, as células pigmentares viscerais desempenham papéis funcionais de acordo com sua localização.

Dentre as diversas funções atribuídas a melanina, pode-se considerar que duas delas são importantes frente às condições de variação térmica, a proteção e termorregulação. Embora os melanomacrófagos e os melanócitos tenham como característica comum a presença de melanina, não se pode desconsiderar o fato de que são células distintas, com morfologia, origem e componentes pigmentares diferenciados, o que possivelmente explica

a diferente resposta dessas células frente ao estresse por variação térmica (aumento de pigmentação no testículo e diminuição de pigmentação no fígado).

## IX. Conclusões

1) A ocorrência e intensidade da pigmentação presente na superfície dos diferentes órgãos podem ser afetadas frente aos experimentos propostos?

→ A variação térmica não ocasiona alteração na ocorrência e intensidade das células pigmentares viscerais, presentes na superfície dos órgãos e estruturas analisadas, macroscopicamente. Assim, foi possível estabelecer um padrão descrição anatômica de ocorrência e intensidade desta pigmentação para *Eupemphix nattereri*.

2) A variação na temperatura é um fator que influencia a pigmentação hepática e testicular?

→ A variação na temperatura é um fator que altera a pigmentação, sendo observado uma diminuição da área pigmentar hepática e aumento da área pigmentar no testículo.

3) A resposta apresentada pelas células pigmentares presentes no tecido hepático e testicular, continuam seu processo ou regride à medida que o estímulo é interrompido?

→ As células pigmentares hepáticas e testiculares, respondem a ambas as condições experimentais, e ao tempo de exposição. Assim, quando o estímulo foi interrompido, verificou que houve o restabelecimento da pigmentação semelhante à condição encontrada nos animais do grupo controle.

4) Se houver resposta pigmentar, qual é a condição experimental (hipertermia/hipotermia) mais influente para promover a alteração das células pigmentares hepáticas e testiculares?

→ Nossos resultados permitem afirmar que as duas condições experimentais promovem alterações nas células pigmentares do tecido hepático e testicular. Entretanto verificou-se que tanto para o fígado quanto testículo, a condição de hipotermia pode ser considerada mais drástica, pois os animais requerem um tempo maior para se recuperar do estresse promovido pelo frio, do que o ajuste fisiológico provocado pelo calor (hipertermia). Talvez esta determinação biológica seja suportada pelo fato de que estes anuros estão mais habituados ao calor do que ao frio, pois são animais que habitam regiões neotropicais.