

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2018.



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Efeitos da alta temperatura na
pigmentação visceral e no epitélio
germinativo masculino em *Physalaemus
nattereri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura)**

GABRIELA BARONI LEITE

MESTRADO



2016

**PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Biologia
Estrutural**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela Baroni Leite

**Efeitos da alta temperatura na pigmentação visceral e no epitélio
germinativo masculino em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus*
fuscus (Anura)**

São José do Rio Preto
2016

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Gabriela Baroni Leite

**Efeitos da alta temperatura na pigmentação visceral e no epitélio
germinativo masculino em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus
fuscus* (Anura)**

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

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira
Co-orientadora: Dr^a. Lilian Franco Belussi

**São José do Rio Preto
2016**

Leite, Gabriela Baroni.

Efeitos da alta temperatura na pigmentação visceral e no epitélio germinativo masculino em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura)/ Gabriela Baroni Leite – São José do Rio Preto, 2016
97f. : il.

Orientador: Classius de Oliveira

Co-orientadora: Lilian Franco Belussi

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Anuro – Morfologia. 3. Anfíbios – Efeitos da temperatura. 4. Altas temperaturas. 5. Melanócito. 6. Células germinativas. I. Oliveira, Classius . II. Franco-Belussi, Lilian. III. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV Título.

CDU – 597.8

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

Gabriela Baroni Leite

Efeitos da alta temperatura na pigmentação visceral e no epitélio germinativo masculino
em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura).

BANCA EXAMINADORA

Titulares

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

Prof. Dr. Mateus Rodrigues Beguelini
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini
UNESP – Bauru

SUPLENTE

Prof.^a. Dr.^a. Tiana Kohlsdorf
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira
UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto
22 de Fevereiro de 2016

RESUMO

Temperatura influencia a homeostase dos anuros, causando o declínio populacional dos anfíbios. Na família Leptodactylidae machos de *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* possuem testículos que comportam toda linhagem germinativa e apresentam melanócitos em *P. nattereri* e ausência em *L. fuscus*. Os melanócitos apresentam melanina no citoplasma sendo estas plásticas as alterações ambientais. Em órgãos hematopoiéticos como fígado também existem células pigmentares sendo denominadas melanomacrófagos contendo melanina, hemosiderina e lipofuscina. Já no sangue dos anuros os eritrócitos são nucleados e alterações sugerem efeitos genotóxicos. A temperatura é um dos fatores que afeta a sobrevivência dos anuros e torna-os mais suscetíveis a alterações morfológicas. Assim, avaliamos efeitos hepatotóxicos, genotóxicos e alterações no volume das células germinativas e dos melanócitos testiculares em duas espécies de anuros submetidas a 35,1°C. Para isso foram realizados experimentos em 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias de exposição sendo posteriormente sacrificados, órgãos incluídos, cortados, corados, fotografados e analisados, incluindo extensões sanguíneas. Em geral, *P. nattereri* sofre mais alterações nos pigmentos hepáticos que *L. fuscus* possivelmente devido a reprodução e exposição ambiental em curtos períodos. Já efeitos genotóxicos foram semelhantes entre as espécies sugerindo que temperatura causa danos no DNA de anuros. Entretanto, nos testículos os efeitos foram inversos sendo que as células espermatogênicas de *L. fuscus* foram mais afetadas que *P. nattereri* talvez pela ausência de melanócitos que aumentou gradativamente ao longo do tempo em *P. nattereri* e possivelmente detêm um papel protetor dos tecidos. Assim, a influência da hipertermia nos anuros é comprovado neste estudo afirmando que a intensidade do impacto é determinado pela biologia interespecífica.

Palavras-chave: Hipertermia, melanócito, melanomacrófago, células espermatogênicas, Leptodactylidae.

ABSTRACT

Temperature alters homeostasis of frogs, and can causes amphibians' decline. *Physalaemus nattereri* and *Leptodactylus fuscus* are representatives of *Leptodactylidae* Family, and their testes presents germ cells lineagen. In *P. nattereri*, melanocytes are observed in testes, but in *L. fuscus* these cells are not found. Melanocytes posses melanina in their cytoplasm. This pigmented cell are plastic and responsive to environmental stressor. Anurans also have melanomacrophages present in hematopoietic organs such as liver, and posses in their cytoplasm melanin, haemosiderin and lipofuscin. Erythrocyte frogs are nucleated and changes suggest genotoxic effects. High temperatures affect the survival of frogs, making them more susceptible to morphological changes. In this context, we evaluate hepatotoxic effects, genotoxic and changes in the volume of testicular germ cells and melanocytes in two frog species subject to 35.1 ° C. For this, we exposed animals for 12hours, one, two, three, five, 10 and 15 days in high temperature. After experimental times, we analyzed liver, testes and erithocytes. *P. nattereri* has more changes in liver pigments than *L. fuscus*. We believe that this alterations is due *P. nattereri*'s reproduction are short. Genotoxic effects were similar among the species suggesting that temperature damages the DNA of anurans. However, the effects in the testes were the inverse, with the spermatogenic cells of *L. fuscus* being more affected than that from *P. nattereri*. This may possibly be due to the absence of melanocytes in *L. fuscus*, once that in *P. nattereri* they gradually increased over time and possibly had a protective role in the tissue. Thus, the influence of hyperthermia in anurans is demonstrated in this study stating that the intensity of the impact is determined by interspecific biology.

Key-words: Hyperthermia, melanocytes, melanomacrophages, germ cells, *Leptodactylidae*.

**Dedico esta dissertação a cada anuro que saiu de
sua vida para entrar na minha história.**

Agradecimentos:

Aos meus pais, Odair e Paula por todas as oportunidades a mim oferecidas, pela dedicação, carinho e apoio à minhas escolhas.

Ao meu namorado, Ricardo Sant'Anna de Souza Poch, por toda paciência, bom humor, carinho, compreensão e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Classius de Oliveira pelos ensinamentos e por acreditar e confiar em mim.

A minha co-orientadora, amiga e conselheira Dra. Lilian Franco-Belussi pela paciência, companheirismo, incentivo e ajuda desde o princípio.

Aos demais do Laboratório de Anatomia Comparativa IBILCE - UNESP pelas conversas acadêmicas e momentos de descontração.

Aos grandes amigos, Mariana Ribeiro Thereza, Manuela Pereira Lima Cunha e Rodrigo Zieri por acreditarem em mim e me apoiarem sempre. Muito obrigada!

A todos meus professores de graduação e pós-graduação que são exemplos para mim, tanto do que eu quero ser quando o que evitar em minha vida.

Ao Luiz Roberto Falleiros Junior pela extrema boa vontade, confiança e disposição para me ensinar as técnicas histológicas.

A Profa. Dra. Larissa Paola Rodrigues Venâncio e Profa. Dra. Ana Paula Girol pelos comentários e sugestões ao trabalho no exame geral de qualificação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado (Proc. 2014/16900-3).

A todas as pessoas que passaram por mim e deixaram um pedacinho de si para construir quem sou hoje. Muito Obrigada!

Sumário:

Resumo.	1
Abstract.	2
1. Introdução:	3
1.1. <i>O grupo animal:</i>	4
1.2. <i>Coloração em animais ectotérmicos.</i>	8
1.3. <i>Pigmentação visceral</i>	10
1.4 - <i>O aparelho reprodutor masculino e espermatogênese</i>	13
1.5. <i>Aspectos do sangue e alterações hematológicas.</i>	16
1.6. <i>Efeitos da temperatura em anuros</i>	18
2. Objetivos	20
2.1. <i>Gerais:</i>	20
2.2. <i>Específicos:</i>	20
3. Material e Métodos	21
3.1. <i>Experimento de aumento de temperatura</i>	22
3.2. <i>Processamento do material</i>	22
3.3. <i>Análises histoquímicas</i>	23
3.4. <i>Análises morfológicas e quantitativas</i>	23
3.5. <i>Análise do micronúcleo</i>	24
3.6. <i>Análise estatística</i>	24
4. Resultados	25

5. Referências Bibliográficas	25
Capítulo 1	44
Resumo.	45
Introdução	46
Material e métodos	47
<i>Experimento de aumento de temperatura</i>	<i>47</i>
<i>Processamento do material</i>	<i>48</i>
<i>Análises morfológicas e quantitativas</i>	<i>48</i>
<i>Análise do micronúcleo</i>	<i>49</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>50</i>
Resultados	50
<i>Pigmentos entre as espécies</i>	<i>50</i>
<i>Pigmentos entre os tempos experimentais</i>	<i>52</i>
<i>Respostas genotóxicas</i>	<i>55</i>
Discussão	56
Referências Bibliográficas:	61
Capítulo 2	67
Resumo.	68
Introdução	69
Material e Métodos	70

<i>Coletas dos exemplares</i>	70
<i>Experimento de aumento de temperatura</i>	71
<i>Processamento do material</i>	71
<i>Análises morfológicas e quantitativas</i>	71
<i>Análise estatística</i>	72
Resultados	72
<i>Melanócitos testiculares em P. nattereri</i>	72
<i>Células germinativas em P. nattereri e L. fuscus</i>	73
<i>Influência da temperatura nos tipos espermatogênicos</i>	75
Discussão	78
Referências Bibliográficas	80
Conclusão geral	85

Resumo: Temperatura influencia a homeostase dos anuros, causando o declínio dos anfíbios. Na família Leptodactylidae machos de *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* possuem testículos que comportam toda linhagem germinativa e apresentam melanócito em *P. nattereri* e ausência em *L. fuscus*. Os melanócitos apresentam melanina no citoplasma sendo plásticas as alterações ambientais. Além de melanócitos, os anuros possuem também melanomacrófagos, presentes em órgãos hematopoiéticos como fígado com melanina, hemosiderina e lipofuscina. Já no sangue dos anuros os eritrócitos são nucleados e alterações sugerem efeitos genotóxicos. A temperatura é um dos fatores que afeta a sobrevivência dos anuros e torna-os mais suscetíveis a alterações morfológicas. Assim, avaliaremos efeitos hepatotóxicos, genotóxicos e alterações no volume das células germinativas e dos melanócitos testiculares em duas espécies de anuros submetidas a 35,1°C. Para isso foram realizados experimentos em 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias de exposição sendo posteriormente sacrificados, órgãos incluídos, cortados, corados, fotografados e analisados, incluindo extensões sanguíneas. Em geral, *P. nattereri* sofre mais alterações nos pigmentos hepáticos que *L. fuscus* possivelmente devido a reprodução e exposição ambiental em curtos períodos. Já efeitos genotóxicos foram semelhantes entre as espécies sugerindo que temperatura causa danos no DNA de anuros. Entretanto, nos testículos os efeitos foram inversos sendo que as células espermatogênicas de *L. fuscus* foram mais afetadas que *P. nattereri* talvez pela ausência de melanócitos que aumentou gradativamente ao longo do tempo em *P. nattereri* e possivelmente detêm um papel protetor dos tecidos. Assim, a influência da hipertermia nos anuros é comprovado neste estudo afirmando que a intensidade do impacto é determinado pela biologia interespecífica.

Palavras-chave: Hipertermia, melanócito, melanomacrófago, células espermatogênicas, Leptodactylidae.

Abstract: Temperature alters homeostasis of frogs, and can causes amphibians' decline. *Physalaemus nattereri* and *Leptodactylus fuscus* are representatives of Leptodactylidae Family, and their testes presents germ cells linagen. In *P. nattereri*, melanocytes are observed in testes, but in *L. fuscus* these cells are not found. Melanocytes posses melanina in their cytoplasm. This pigmented cell are plastic and responsive to environmental stressor. Anurans also have melanomacrophages present in hematopoietic organs such as liver, and posses in their cytoplasm melanin, haemosiderin and lipofuscin. Erythrocyte frogs are nucleated and changes suggest genotoxic effects. High temperatures affect the survival of frogs, making them more susceptible to morphological changes. In this context, we will evaluate hepatotoxic effects, genotoxic and changes in the volume of testicular germ cells and melanocytes in two frog species subject to 35.1 ° C. For this, we exposed animals for 12hours, one, two, theree, five, 10 and 15 days in high temperature. After experimental times, we analyzed liver, testes and erithocytes. *P. nattereri* has more changes in liver pigments that *L. fuscus*. We believe that this alterations is due *P. nattereri*'s reproduction are short. Genotoxic effects were similar among the species suggesting that temperature damages the DNA of anurans. However, the effects were testes being the inverse of *L. fuscus* spermatogenic cells were more affected than *P. nattereri* maybe the absence of melanocytes that gradually increased over time in *P. nattereri* and possibly hold a protective role tissue. Thus, the influence of hyperthermia in anurans is demonstrated in this study stating that the impact intensity is determined by interspecific biology.

Key-words: Hyperthermia, melanocytes, melanomacrophages, germ cells, Leptodactylidae.

1. Introdução:

A temperatura influencia aspectos fisiológicos e comportamentais em animais, principalmente nos ectotérmicos. Variações na temperatura são observadas ao longo do dia, promovendo comportamentos termorregulatórios (Roe et al., 2004; Mondal e Rai, 2001). Em répteis, variações da temperatura afetam o crescimento, metabolismo, reprodução entre outras funções (Lourdais et al., 2004; Angilletta et al., 2002; Weil e Aldridge, 1979). Em peixes, o aumento de temperatura da água influencia negativamente tanto a sobrevivência dos animais quanto a população de células germinativas (masculina e feminina) (Majhi e Choudhary, 2014).

Nos anuros, a fisiologia, desenvolvimento e comportamento são estritamente dependentes da temperatura ambiental, e suas funções ecológicas são comprometidas caso a temperatura corpórea aumente (Hillman et al., 2009). Além disso, a distribuição geográfica dos anuros também é afetada pelo aumento da média na temperatura (Toranza e Maneyro, 2013).

O tamanho corporal de espécies de anuros avaliados em diferentes populações com latitudes distintas apresentando fatores climáticos variáveis demonstraram que a temperatura é um dos causadores da variação corporal (Boaratti e Silva, 2015). Blaustein et al. (2010) apontou que atualmente há um intenso declínio geral na biodiversidade global, e entre as espécies ameaçadas estão diversas populações e espécies de anfíbios. Mudanças climáticas interferem em diversos processos biológicos entre eles a sobrevivência, crescimento, reprodução e capacidade de dispersão dos anfíbios. Outros fatores relacionados a mudanças climáticas são alterações na dinâmica patógeno-hospedeiro, influenciando na forma que as doenças se manifestam, além de interagir com outros fatores estressantes, como radiação UV-B e contaminantes. As interações entre todos esses fatores

são complexos, entretanto, alguns declínios populacionais de anfíbios e extinções são causados por eles (Blaustein et al., 2010).

1.1. O grupo animal:

A classe Amphibia (Gray, 1825) inclui animais ectotérmicos com tegumento úmido e sem escamas. São considerados como grupo pioneiro de vertebrados a viver no ambiente terrestre, há cerca de 350 a 400 milhões de anos, e apresentam-se divididos em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Linzey, 2001; Pough et al., 2003). As subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as pioneiras sobre a face da Terra, mas foram extintas. Os Amphibia ainda existentes, ou Lissamphibia, surgiram no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 150 milhões de anos (Linzey, 2001).

Atualmente são conhecidas três ordens de anfíbios: Caudata, representada pelas salamandras; Gymnophiona, pelas cobras-cegas e Anura, representada pelos anuros. A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possuem 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 (Pough et al., 2003). Possuem diferentes hábitos, ocupam ambientes diversificados e não habitam somente regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas (Duellman e Trueb, 1999).

Os anuros apresentam características específicas, como permeabilidade cutânea à água e eletrólitos, ciclo de vida dependente do ambiente aquático e do terrestre, fatores esses que os tornam vulneráveis às alterações ambientais (Duellman e Trueb, 1999; Rabb, 1990). Tais características tornam os anuros bioindicadores dos efeitos do aquecimento global provocado pela atividade humana. Além disso, a vulnerabilidade observada em

anfíbios tem sido utilizada para explicar o declínio populacional de anfíbios ao redor do mundo (Blaustein e Wake, 1995; Vitt et al., 1990; Weygoldt, 1989). Atualmente, os anuros são reconhecidos como um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo, e vêm sofrendo um declínio de grandes proporções desde a década de 1980 (Stuart et al. 2004). Desde a avaliação global dos anfíbios em 2004 o número de espécies ameaçadas apresentou um intenso aumento sendo maior após 2004 (Dawson et al., 2015).

Leptodactylidae é uma das famílias mais ameaçadas e entre as causa do declínio está a redução dos habitats e as mudanças climáticas (Stuart et al. 2004; Li et al. 2013). Entre os fatores responsáveis pela mudança climática estão umidade e temperatura, sendo eles extremamente importantes para a sobrevivência dos anuros (Li et al. 2013). Assim, avaliar a tolerância a extremos climáticos de anuros parece uma questão fundamental para sua conservação (Navas et al., 2007).

A espécie *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) pertence à família Leptodactylidae e apresenta como característica morfológica coloração dorsal marrom com rajados transversais pretos e um par de manchas escuras. Essas manchas escuras, denominadas manchas ocelares estão localizadas posteriormente no dorso, na região inguinal, e são utilizadas em comportamentos defensivos contra predadores (Frost, 2010; Brasileiro et al., 2005) (Figura 1a).

Esses animais apresentam porte médio, com cerca de 4 cm de comprimento rostro-cloacal e habitam áreas abertas com ocorrência na região central e sudeste do Brasil, Paraguai e Bolívia (Frost, 2010; Brasileiro et al., 2005) (Figura1b). 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) (Figura 1c).

Os testículos de anuros são pares, arredondados e compactos (Goin e Goin, 1962). Devido à transparência da túnica albugínea (cápsula de tecido conjuntivo que reveste externamente os testículos), pode-se observar que os testículos de *P. nattereri* possuem células pigmentares distribuídas tanto na área intersticial quanto na superfície externa do órgão (Santos, 2010), conferindo ao testículo uma coloração preta completa ou mesclada de preto (Oliveira e Zieri, 2005; Oliveira e Franco-Belussi, 2012a; Oliveira et al., 2002 e 2003) (Figura 1d).

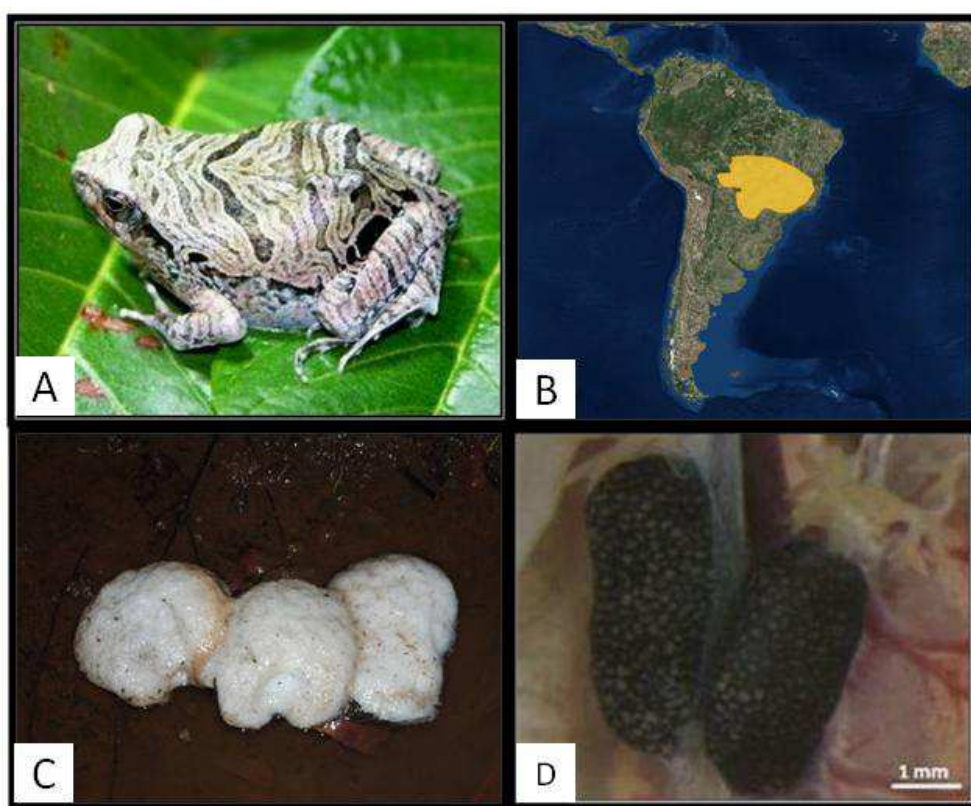


Figura 1: Caracterização da espécie *Physalaemus nattereri*. Espécime vivo (A), distribuição geográfica - <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57267> - (B), ninho de espuma associada a margem - <https://www.herpetofauna.com.br/AnfibiosReproduction.html> - (C), testículos (D).

A espécie *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) também pertence à família Leptodactylidae e apresenta como característica morfológica dorso acinzentado, com manchas castanhas, focinho subelíptico visto de cima; obtuso de perfil; machos com aberturas laterais do saco vocal; saco vocal expandido lateralmente; tímpano bem visível (Oliveira e Júnior, 2000) (Figura 2a). Tem aspecto robusto, mas corpo, cabeça e membros alongados, características das espécies saltadoras (Ceï, 1980). Esses animais apresentam porte médio, com cerca de 5 cm de comprimento rostro-cloacal e ocupam habitats abertos e é uma boa colonizadora das bordas do rio e os habitats recentemente modificados nas regiões de florestas (Wynn e Heyer, 2001; Figura 2b).

É característica do modo de reprodução de *L. fuscus* colocação de um ninho de espuma em uma câmara subterrânea (Heyer, 1978). A escavação é realizada pelo macho e envolve movimentação de pressão do focinho contra o solo para construção e modelagem do ninho subterrâneo (Sazima, 1975; Martins, 1988; Figura 2c).

Os testículos desta espécie também são pares, arredondados, compactos, além de apresentarem coloração geralmente amarelada (Goin e Goin, 1962). A ausência de pigmentação (categoria 0) sobre os testículos é uma característica notável em alguns indivíduos da família Leptodactylidae como *Leptodactylus bokermanni*, *L. furnarius*, *L. fuscus*, *L. labyrinthicus*, *L. mystaceus*, *L. mystacinus*, *L. latrans*, *L. podicipinus*, *L. chaquensis* e *L. notoaktites* (Franco-Belussi et al., 2009) (Figura 2d).

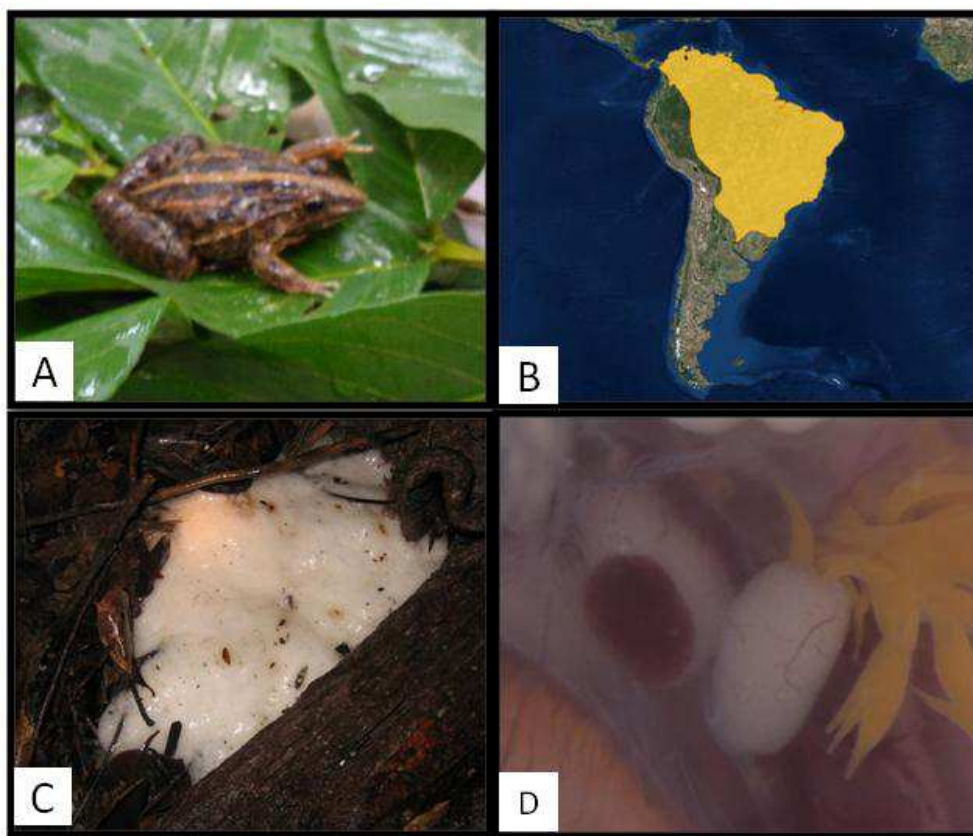


Figura 2: Caracterização da espécie *Leptodactylus fuscus*. Espécime vivo (A), distribuição geográfica - <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57129> - (B), ninho de espuma em câmera subterrânea - <https://www.herpetofauna.com.br/AnfibiosReproduction.html> - (C), testículos (D).

1.2. Coloração em animais ectotérmicos

Em invertebrados e vertebrados ectotérmicos é comum observar a presença de células pigmentadas, denominadas cromatóforos, que armazenam pigmentos em seu citoplasma. Este citoplasma tem propriedade de realizar projeções, promovendo aos cromatóforos aspecto dendrítico. A origem destas células pigmentadas é no tubo neural durante o desenvolvimento do embrião, migrando para epiderme e derme ao longo do desenvolvimento (Wallin, 2002).

Entre os cromatóforos existem vários tipos de pigmentos, sendo que em vertebrados são encontrados cinco tipos. Os eritróforos que possuem pteridina, pigmentos de coloração avermelhada. Já os xantóforos possuem além da pteridina, carotenóides possuindo assim coloração amarelada. Os leucóforos e os iridóforos apresentam grânulos de purinas que conferem coloração branca, sendo que, nos iridóforos estas purinas estão dispostas em cristais refletores, conferindo coloração metálica e sendo encontradas assim como os eritróforos e xantóforos, em peixes, anfíbios e répteis. Diferente dos outros cromatóforos, os melanóforos possuem grânulos de melanina conferindo colorações marrons e preta, sendo amplamente encontrados em peixes, anfíbios e répteis (Bagnara e Matsumoto, 2006; Wallin, 2002).

Os diferentes padrões de coloração podem atribuir características ecológicas para os animais, como a camuflagem, que é a semelhança de um animal com uma parte do meio ambiente, sendo menos vulnerável a predação (Edmunds, 1974; Endler, 1987). Em anuros pós-metamórficos, camuflagem pode ser óptico, químico (por exemplo, a produção de floral e odores de amoníaco), ou acústico (pode ocorrer, por exemplo, quando rãs param de vocalizar na presença de um predador; Tuttle et al., 1981). A adaptação ao substrato é característica dos melanóforos e iridóforos sendo a forma mais simples, por dispersão da melanina em substratos escuros (Bagnara e Matsumoto, 2006). Entre outras funções dos cromatóforos entre os vertebrados está a regulação térmica, proteção contra a radiação solar, coloração nupcial e coloração de advertência (Bagnara e Matsumoto, 2006). O aposematismo é uma coloração de advertência geralmente relacionada com a presença de toxinas na pele dos indivíduos (Edmunds, 1974; Caro, 2005). A coloração aposemática é geralmente vermelha, laranja, amarela ou azul em um fundo escuro (geralmente preto),

como em *Atelopus zeteki* que apresenta coloração amarela com listras pretas (Lindquist e Hetherington, 1996).

Em condições laboratoriais alterações de cores em anuros podem ser encontradas como no caso de *Hyla regilla*, os indivíduos mudam de castanho para verde, ou vice-versa, ao longo de períodos de semanas ou meses (Mackey, 1958; Haugen, 1992). Em *Acris crepitans*, os indivíduos foram observados mudando do verde ao cinza ou vice-versa durante um período de seis meses (Pyburn, 1961).

Também existem diferenças fenotípicas entre animais da mesma espécie, como em girinos de *Melanophryniscus rubiventris*, onde intensidades diferentes de melanização estão relacionadas a diferentes taxas de temperatura crítica máxima, sendo que girinos com mais melanina na porção dorsal possuem temperaturas críticas máximas maiores que girinos da mesma espécie com a parte dorsal com menos melanina (Sanabria et al., 2014). Já em girinos de *Pseudis ornata* o aumento da temperatura causou mudanças nas frequências fenotípicas entre as cores cobre, cinza e marrom sendo que marrom apresenta frequência maior com o aumento da temperatura (Harkey e Semlitsch 1988).

1.3. Pigmentação visceral

Além de pigmentos dérmicos e epidérmicos os anfíbios, assim como peixes e répteis, apresentam pigmentação visceral com células contendo melanina no citoplasma e localizadas em vários órgãos e tecidos como fígado, baço, rins, peritônio, pulmão, coração, vasos sanguíneos, timo, gônadas e meninges (Gallone et al., 2002; Franco-Belussi et al., 2011; Moresco e Oliveira, 2009; Zieri et al., 2007; Bagnara e Matsumoto, 2006). A melanina possui funções protetoras contra patologias, aumento na temperatura e radiação

ultravioleta (UV), estas últimas sendo correlacionadas positivamente ao meio ambiente, como consequências do aquecimento global (Roulin, 2014).

As células da pigmentação visceral são semelhantes aos melanócitos (Zuasti et al., 1998; Agius e Agbede, 1984), ou seja, oriundas da crista neural ectotérmica (Sichel et al., 1997), produzindo e armazenando melanina (Agius e Roberts, 2003). A nomenclatura entre melanóforos e melanócitos é discutida entre autores sendo que Bagnara e Matsumoto (2006) designa a utilização de ambas nomenclaturas para denominar células pigmentares em animais ectotérmicos. Em recente revisão o termo melanócito foi designado para células oriundas da crista neural (Schartl et al., 2015), sendo assim, utilizaremos a terminologia melanócitos para células pigmentares com esta origem, como no caso dos melanócitos testiculares.

Além de melanócitos, outro tipo celular pigmentar encontrado em órgãos hematopoéticos são os melanomacrófagos (Agius, 1981). Esta célula apresenta característica fagocitária, assim como macrófagos e são oriundos de células tronco hematopoéticas (Agius, 1980; Sichel et al., 1997). Estas células possuem função relacionada com a fagocitose de material celular do catabolismo, assim sendo responsáveis pela detoxificação dos tecidos a qual eles pertencem ou reciclando produtos tanto de origem endógena quanto exógena, além de serem considerados biomarcadores morfológicos de alterações ambientais, visto que sua área de ocupação é modulada por vários fatores, entre eles a variação da temperatura (Ellis et al., 1976; Herráez e Zapata, 1986; Santos et al., 2014).

Os melanomacrófagos estão aumentados durante o inverno em animais de clima temperado, onde a temperatura, o fotoperíodo e adaptações nutricionais promovem

alterações no metabolismo do animal levando ao aumento da pigmentação hepática (Barni, et al., 2002; Corsaro, et al., 2000).

Estas células possuem, entre outros componentes, a melanina, hemosiderina e lipofuscina. A melanina é sintetizada a partir de uma cadeia bioquímica iniciada pela hidroxilação da L-fenilalanina e L-tirosina gerando a eumelanina e a feomelanina (Hearing, 2006; Prota, 1992). Apresentando importantes funções, a melanina pode absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (Zuasti et al., 1989). Outra função importante da melanina em animais ectotérmicos é a ação bactericida, que assume esta função em baixas temperaturas uma vez que a enzima hidrogeno-peroxidase é afetada com variações térmicas (Wolke et al., 1985).

Já a hemosiderina é uma substância granular contendo hidróxido de ferro juntamente com proteínas derivadas do catabolismo de hemoglobina dos eritrócitos, sendo assim, produto metabólico intermediário da reciclagem dos componentes na eritropoiese (Krans, 1989). A hemosiderina é produzida em tecidos que estão com saturação de íons de ferro, sendo estes íons armazenados em grânulos de células fagocitárias (melanomacrófagos). Os íons de ferro são produto do catabolismo de eritrócitos que quando armazenados em vacúolos digestivos apresenta coloração marrom-amarelada devido presença de hidróxido de ferro e pigmentos biliares. Estes pigmentos são digeridos em até quatro dias, apesar de alguns grânulos parcialmente digeridos ainda permanecerem nos tecidos (Granick, 1949).

A lipofuscina é um pigmento intra-lisossomal resultante da polimerização oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados (Pickford, 1953; Terman e Brunk, 2004). Este pigmento, também denominado como pigmento da idade, é um pigmento que não é degradado nem

exocitado (Terman e Brunk, 2004). A apoptose e necrose tecidual pode ocorrer quando a taxa de lipofuscina é aumentada, desestabilizando assim as membranas lisossomais (Kurz, 2008; Terman e Brunk, 2004).

Em *Pelophylax lessonae* é observado aumento na quantidade de melanina no fígado, conjuntamente a modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas durante o inverno, demonstrando responsividade das células pigmentares durante os ajustes fisiológicos do animal (Barni et al., 1999).

Assim como citado anteriormente, funções das células pigmentares internas dos vertebrados ectotérmicos são relacionadas com a citoproteção contra radicais livres (Mcgraw, 2005), processos de detoxificação de poluentes (Fenoglio et al., 2005) e ação bactericida devido a presença da melanina (Franco-Belussi et al., 2013). Em *P. nattereri* são observadas alterações da pigmentação hepática em altas temperaturas, sugerindo funções de proteção (Santos et al., 2014). Ainda com relação ao fígado, o aumento da pigmentação pode estar relacionado com a hemocaterese, processo pelo qual as hemácias e demais elementos figurados do sangue envelhecidos são eliminados da circulação (Cícero et al., 1977; Kalashnikova, 1992). Em salamandras, a ativação da melanogênese hepática também pode estar relacionada com a hipoxemia (Frangioni et al., 2000). Em peixes, o aumento de pigmentos melânicos tem sido relacionado com patologias (Roberts, 1975).

1.4 - O aparelho reprodutor masculino e espermatogênese

De todas as características dos anfíbios, a variedade dos modos reprodutivos é notável, sendo ela muito maior que a de qualquer outro grupo de vertebrados, com exceção dos peixes (Duellman e Trueb, 1999; Pough et al., 2003). A família Leptodactylidae é o grupo que possui maior diversidade de modos reprodutivos apresentando 17 formas

distintas como ninhos de espuma flutuantes associado a vegetação marginal em *P. nattereri* e ninhos de espuma depositados em câmaras subterrâneas como visto em *L. fuscus* (Haddad e Prado, 2005).

Para as três ordens de anfíbios, o aparelho reprodutor é constituído por um par de gônadas conectadas por meio de ductos genitais próprios, os dúctulos eferentes e o ducto de Wolff nos machos e os ovidutos ou ducto de Müller nas fêmeas (Witschi, 1933; Wake, 1980; Pancak-Roessler et al., 1991; Duellman e Trueb, 1999; Farias et al., 2002; Oliveira et al., 2003). Nos anuros, os testículos são estruturas pares, arredondados, compactos e de coloração geralmente amarelada (Goin e Goin, 1962), sendo estes normalmente mais lisos, firmes e menores que os ovários da mesma espécie e, entre os dois membros do par, não é rara a ocorrência de assimetria de tamanho e posição (Hildebrand, 1995).

Devido à transparência da túnica albugínea (cápsula de tecido conjuntivo que reveste externamente os testículos), pode-se observar que os testículos são constituídos por unidades aproximadamente esféricas que alojam as células da linhagem germinativa, sendo denominados lóculos seminíferos (Oliveira, 1996). No interior dos lóculos seminíferos está o epitélio seminífero, com células germinativas se agrupando com células de sustentação, ou células de Sertoli, e assim constituindo cistos espermatogénéticos ou espermatocistos (Santos e Oliveira, 2008). Cada cisto agrupa células no mesmo estágio de diferenciação celular, estabelecendo uma sincronia de desenvolvimento, uma característica comum dos anfíbios (Wake, 1968; Lofts, 1974; Franchi et al., 1982; Ucci, 1982; Cavicchia e Moviglia, 1983; Rastogi et al., 1988; Báó et al., 1991; Oliveira, 1996), mas que também ocorre em outros animais como os peixes.

Estudo recente descreveu morfologicamente os tipos celulares correspondentes as fases da espermatogênese (Franco-Belussi et al., 2014). As espermatogônias são células

primordiais que repousam na lâmina basal, associadas com as células de Sertoli. Após diferenciação celular, as espermatogônias tornam-se mais arredondadas e dão forma aos espermatócitos I, células grandes e simetricamente arredondadas. Com a divisão celular, células menores são originadas, os espermatócitos II, os quais apresentam metade do diâmetro de suas antecessoras. Essa redução de tamanho dos espermatócitos II se deve a compactação do material genético e perda de parte do citoplasma (Franco-Belussi et al., 2014).

Após segunda divisão meiótica, cada espermatócito II origina uma espermatíde I, sendo elas levemente alongadas, diferenciando-se assim dos espermatócitos, porém maiores em volume citoplasmático que as espermatídes II, que são células cilíndricas e bastante alongadas. Nesse estágio de desenvolvimento, as células deixam de constituir cistos e passam a organizar-se em feixes. Após a diferenciação, através do processo de espermiogênese, as espermatídes II começam a apresentar elevada compactação nuclear e diminuição do volume citoplasmático, constituindo agora o último estágio de desenvolvimento das células germinativas masculinas, os espermatozoides, os quais estão associados em feixes ou livres e dispersos no lúmen (Franco-Belussi et al., 2014).

Mudanças ambientais relativamente pequenas podem substancialmente modificar o desempenho reprodutivo desses animais, interferindo na espermatogênese e estabelecendo ciclos contínuos ou descontínuos (Huang et al., 1997). Apesar de um enorme corpo de literatura sobre a biologia térmica de anuros, ainda é difícil avaliar como as mudanças climáticas afetam reprodução (Navas et al., 2007).

1.5. Aspectos do sangue e alterações hematológicas.

O sangue é um tecido conjuntivo especializado composto por uma parte líquida (plasma) e outra com componentes celulares (Turner, 1988; Hill et al., 2006). Entre os tipos celulares que podem ser diferenciados são os eritrócitos, leucócitos (granulócitos e agranulócitos), neutrófilos (heterófilos, eosinófilos) e basófilos (linfócitos, monócitos e azurófilos) (Varela e Sellares, 1937b; 1938; Singh, 1977b; Wojtaszek e Adamowicz, 2003; Forbes et al., 2006; Zhelev, 2007; Gül et al., 2011).

Além de eritrócitos nas extensões sanguíneas também é observado células contendo pigmentos (Clark et al, 1936; Mitsui, 1965; Wassermann, 1965b; Pessier, 2007), que são células precursoras de macrófagos, que auxiliam no transporte de melanina para o fígado e para o baço (Varela e Sellares, 1937a, b; 1938; Glomski et al., 1997; Cianciarullo et al., 2000a; Varela e Mancini, 1938; Cianciarullo et al., 2000a; De Abreu Manso et al., 2009).

Os eritrócitos em anfíbios são células ovais, finas e com citoplasma uniforme e uma saliência central devido ao núcleo. Este tipo celular é o mais abundante com função de transportar oxigênio e dióxido de carbono por meio de ligações com a hemoglobina (Singh, 1977a; Atatür et al., 1999). Devido presença de um núcleo central nos eritrócitos, é possível a utilização destas células para detecção de alterações nucleares. A formação de micronúcleos, porções de cromatina oriundas de lesões cromossômicas, é o teste amplamente utilizado para encontrar respostas à ação de certos xenobióticos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Zuniga et al., 1996).

Micronúcleos foram denominados primeiramente como corpúsculos de Howell-Jolly, encontrados em células em divisão, e que poderiam ser usados para avaliar danos ao DNA. (Schmid, 1975; Heddle, 1973). Danos no DNA podem ser diretamente observados sobre o cromossomo ou sobre o fuso mitótico, e quando forma o envoltório nuclear, se não

forem incorporados pelo núcleo principal, formam os micronúcleos (Villela et al., 2003). Para detecção de eventos clastogênicos (quebras no cromossomo) e aneugênicos (indução de aneuploidia ou segregação anormal do cromossomo) o teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado (Tweats et al., 2007). Eventos aneugênicos agem na α -tubulina (proteína que compõem os microtúbulos) e inibem o processo necessário para a formação do fuso mitótico, levando a não segregação e/ou possível perda de cromossomos inteiros. Já eventos clastogênicos ocasionam quebras cromossômicas gerando fragmentos acêntricos (Ceppi et al., 2010). Uso do teste de micronúcleos, que detecta danos ao DNA é amplamente utilizada como biomarcador genético, uma vez que, a presença de micronúcleos só é visto em células afetadas que passaram por um ciclo celular completo (Bonassi et al., 2007; Meneguetti, 2011). Os micronúcleos podem ser encontrados em todos os tipos celulares e serve para monitorar ambientes, utilizando animais como forma de avaliação, como anuros, roedores e plantas (Silva et al., 2011).

Mudanças ambientais são capazes de produzir respostas naturais, como mudanças cíclicas nas estações e exposição a diferentes poluentes, desencadeando uma série de enfermidades sanguíneas refletindo impacto na vida dos seres vivos (Cabagna Zenklusen et al., 2014). Exposição de organismos a elevadas temperaturas podem resultar em alterações na integridade do nucléolo, confirmando desta maneira os efeitos genotóxicos do choque térmico (Anitha et al., 2000).

Atualmente, há um grande interesse na investigação hematológica em anfíbios da ordem Anura (Davis et al., 2008; Shutler Marcogliese 2011; Baraquet et al., 2013; Arikan, 2014; Çiçek-Zenklusen et al.; 2014). Mudanças nos parâmetros hematológicos são análises utilizadas para monitoramento ambiental, já que podem oferecer informações sobre o estado fisiológico dos animais, uma vez que o aumento da frequência de micronúcleos

compromete a homeostase dos animais interferindo na estabilidade de suas populações (Cabagna et al., 2005; Sils, 2008; Lajmanovich et al., 2008, 2012; Mineeva 2010, 2011; Zhelev, 2012a).

Assim, análises hematológicas dos anuros são um dos métodos mais simples e menos invasivos para detecção de alterações fisiológicas e patológicas em populações selvagens, relacionadas com fatores ambientais (Artacho et al., 2007; Barni et al., 2007; Davis et al., 2008).

1.6. Efeitos da temperatura em anuros

A pigmentação visceral responde rapidamente a variações de temperatura, correspondendo em um possível papel termoprotetor destas células (Santos et al., 2014). Já é conhecido o impacto de baixas temperaturas no metabolismo hepático de anfíbios, durante a hibernação (Barni et al., 1999). Estudos prévios encontraram efeitos de temperaturas elevadas em melanomacrófagos (Santos et al., 2014), desta forma, alterações no tecido hepático podem ocorrer devido a fatores abióticos, afetando o *fitness* destes animais.

Além disso, as funções da pigmentação visceral em peixes e anuros são pouco conhecidas (Sköld et al., 2013). Ambas as células pigmentares viscerais (isso é, melanócitos e melanomacrófagos) aparentemente possuem funções citoprotetoras relacionadas a radicais livres (Mcgraw, 2005) e processos de detoxificação de poluentes (Fenoglio et al., 2005). Além de funções relacionadas ao sistema imune (Franco-Belussi et al., 2013) e à patologias (Roberts, 1975). A elevação da temperatura acarreta de diversas maneiras a sobrevivência dos anuros, desde tornando-os mais suscetíveis a doenças, por meio de efeitos sobre o sistema imune, como alterações morfológicas como a resposta da

pigmentação visceral (Blaustein et al., 2010; Santos et al., 2014). Assim, o entendimento da influência hipertérmica sobre caracteres testiculares e hepáticos é importante para a compreensão dos limites espécie-específicos e para prever impactos das mudanças climáticas sobre a biodiversidade (Pearson e Dawson, 2003; Araujo e Guisan, 2006).

Roulin (2014) afirma que a melanina apresenta importantes funções comportamentais e fisiológicas, uma vez que esta substância apresenta plasticidade frente a alterações ambientais. Dentre essas funções estão além da termorregulação, também a proteção contra radiação ultravioleta e agentes patogênicos (Roulin, 2014). Além disso, a melanina pode ser um dos principais componentes envolvidos na adaptação ao aquecimento global (Roulin, 2014). Apesar dos testículos de algumas espécies de anuros apresentarem melanócitos, as células germinativas são potencialmente afetadas por fatores externos como a umidade e temperatura, uma vez que a atividade reprodutiva dos anuros é regulada a partir de fatores abióticos (Hoogmoed e Gorzula, 1979; Aichinger, 1987, Franco-Belussi et al., 2009).

Variáveis ambientais determinam a época favorável do ano e a duração em que os anuros mantêm-se ativos, determinando sua distribuição estacional (Duellman e Trueb, 1999; Huang et al., 1997). O custo da manutenção dos anfíbios pode aumentar diretamente como uma consequência das mudanças de temperatura (Carey 2005, Wikelski e Cooke 2006), sendo que a adaptação nestes ambientes requer alguns controles necessários do ciclo reprodutivo para produzir descendência em um período no ano em que a maioria da prole tenha maiores chances de sobrevivência (Callard et al., 1978).

A exposição de organismos a elevadas temperaturas é conhecida por resultar em alterações na integridade do nucléolo além de afetar a progressão do ciclo celular durante a mitose. Em *Carassius auratus* são conhecidos os efeitos do choque térmico onde as altas

temperaturas provocam anormalidades nucleares, aberrações cromossômicas, atrasos no ciclo celular e danos ao DNA, afirmando desta maneira os efeitos genotóxicos do choque térmico (Anitha et al., 2000).

Uma das maneiras usualmente utilizadas para detectar e identificar efeitos genotóxicos de aberrações cromossômicas em células dos organismos são os micronúcleos (MN). Os MN atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade e como um instrumento de monitoramento, considerando-se que retornam aos níveis basais quando o organismo permanece um período sem contato com o estresse indutor (Flores e Yamaguchi 2009). Apesar de muitos estudos sobre a biologia térmica de anuros em estudos ecológicos, comportamentais e fisiológicos, ainda é difícil avaliar como as mudanças climáticas afetam animais ectotérmicos (Navas et al., 2007).

Conclusão geral:

Neste trabalho, é possível observar diferentes intensidades do efeito da temperatura entre *P. nattereri* e *L. fuscus*. Em *P. nattereri*, espécie que está ativo em curtos períodos do ano, foi mais afetada nos pigmentos hepáticos, melanina, hemosiderina e lipofuscina, aumentando o volume destes pigmentos no fígado em tempos mais prolongados, demonstrando um possível efeito hepatotóxico da temperatura para esta espécie. Entretanto, *L. fuscus*, espécie que não apresenta testículo pigmentado, cuja melanina possui papel protetor, foi observada maiores efeitos nas células germinativas com grande variações no volume da maioria das células espermatogênicas entre os tempos experimentais. A melanina presente nos testículos de *P. nattereri* teve um aumento gradativo de volume sendo muito aumentada em longos períodos, como em 15 dias. Porém, o efeito genotóxico da temperatura em ambas espécies é grande e pode comprometer a homeostase destes animais devido ao grande aumento na frequência de micronúcleos, evidenciando que, a temperatura causa danos ao DNA dos anuros. Portanto, os anuros são sensíveis a alta temperatura, sendo esta sensibilidade interespecífica e, de modo geral, *P. nattereri* e *L. fuscus* foram igualmente afetados pela temperatura, sendo que cada espécie apresentou maior vulnerabilidade em diferentes órgãos.