

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Efeitos do Processo Inflamatório sobre o Sistema
Pigmentar Extracutâneo em *Eupemphix nattereri*
(Anura: Leiuperidae)**

LILIAN FRANCO BELUSSI

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL



2010

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Lilian Franco-Belussi

**Efeitos do Processo Inflamatório sobre o Sistema
Pigmentar Extracutâneo em *Eupemphix nattereri*
(Anura: Leiuperidae)**

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre 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**

Franco-Belussi, Lilian.

Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo em *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) / Lilian Franco-Belussi. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

114f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Classius de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências,

Letras e Ciências Exatas

1. Anuro - Morfologia. 2. Morfologia (Animais) 3. Células pigmentares viscerais. 4. Inflamação. I. Oliveira, Classius de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 597.8

**Efeitos do Processo Inflamatório sobre o Sistema Pigmentar Extracutâneo em
Eupemphix nattereri (Anura: Leiuperidae)**

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

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

Prof^ª. Dr.^a. Ana Maria de Lauro Castrucci
Professora Titular
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

SUPLENTE

Prof. Dr. Elias Francisco Lopes de Freitas
Professor Doutor
Centro Universitário de Rio Preto

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 23 de Abril de 2010.

**Aos meus pais, Luiz e Normeli,
meus grandes exemplos.**

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por trilhar meus caminhos, culminando com minha graduação em Ciências Biológicas.

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

Aos meus irmãos, Luiz Felipe e Caio, e a minha cunhada Fernanda Luiza, pelos incentivos a cada conquista.

Ao meu namorado, Diogo Borges Provete, por todo amor, carinho, dedicação, compreensão e companheirismo em todos os momentos. Além da valiosa ajuda na execução e elaboração desse trabalho.

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

Aos grandes amigos e colaboradores, Msc. Lia Raquel de Souza Santos Borges e Msc. Rodrigo Zieri pelos ensinamentos e apoio desde o princípio. Muito obrigada!

Aos demais amigos do Laboratório de Anatomia Comparativa IBILCE - UNESP, Juliana, Juliane, Rafaela e Mariana, pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo, pela ajuda no delineamento e desenvolvimento dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini e Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pelos comentários e sugestões ao trabalho no exame geral de qualificação.

A todos os professores que contribuíram para minha formação pessoal e profissional durante a graduação e pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado (Proc. 2008/52389-0).

A todos os amigos que me incentivaram e contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração, execução e redação desse trabalho; que sempre tinham palavras de consolo e esperança nas horas difíceis... Muito Obrigada!

"UMA VEZ QUE VOCÊ TENHA EXPERIMENTADO VOAR, VOCÊ ANDARÁ PELA TERRA COM SEUS OLHOS VOLTADOS PARA O CÉU, POIS LÁ VOCÊ ESTEVE E PARA LÁ VOCÊ DESEJARÁ VOLTAR."

LEONARDO DA VINCI

Sumário

Resumo	01
Abstract	02
I - Introdução Geral	03
II - Objetivos	13
III - Metodologia	14
IV - Figuras	18
V - Referências Bibliográficas	19
Capítulo 1: Pigmentação visceral em <i>Eupemphix nattereri</i> infectado com LPS de <i>Escherichia coli</i>	25
Resumo	27
Introdução	28
Metodologia	29
Resultados	30
Discussão	32
Agradecimentos	36
Figuras	37
Referências Bibliográficas	42
Capítulo 2: Morfologia hepática do anuro <i>Eupemphix nattereri</i>	44
Resumo	46
Introdução	47
Metodologia	48
Resultados	49
Discussão	50
Agradecimentos	53

Figuras	54
Referências Bibliográficas	58
Capítulo 3: Efeitos do processo inflamatório na pigmentação hepática do anuro	
<i>Eupemphix nattereri</i>	59
Resumo	61
Introdução	62
Metodologia	64
Resultados	66
Discussão	68
Agradecimentos	72
Figuras	73
Referências Bibliográficas	81
Apêndices	84
Capítulo 4: Processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i> induz a pigmentação no testículo do anuro <i>Eupemphix nattereri</i>	
.....	91
Resumo	93
Introdução	94
Metodologia	95
Resultados	97
Discussão	98
Agradecimentos	101
Figuras	102
Referências Bibliográficas	107
Apêndices	109
VI - Conclusões	111
VII - Apêndices	113

Resumo: Os anfíbios compartilham com os demais vertebrados ectotérmicos a existência de um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos. O papel funcional dessas células ainda não está definido, havendo várias hipóteses, dentre elas o papel na defesa contra patógenos. O objetivo do trabalho foi observar a resposta das células pigmentares viscerais presentes no fígado e testículos dos anuros frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Para isso, foram realizadas análises morfológicas, estereológicas e histoquímicas; com o intuito de observar as respostas celulares envolvendo mudanças na forma e substâncias presentes desse tipo celular no fígado e testículos, além da descrição anatômica do sistema pigmentar extracutâneo desses animais após infecção. Foram utilizados 30 exemplares da espécie *Eupemphix nattereri*, os animais foram inoculados, com dose única de LPS de *E. coli*, sendo analisados 2 e 24 horas após a inoculação. Após esse período, os animais foram eutanasiados, a pigmentação visceral foi descrita, em 12 regiões pré-estabelecidas; sendo o fígado e testículos posteriormente retirados e submetidos ao processamento histológico para realização das análises. A pigmentação presente no fígado aumentou no grupo tratado após 24 horas, enquanto que nos testículos é observado aumento após 2 horas. As substâncias hemosiderina e lipofuscina não são verificadas nas gônadas, estando presentes apenas no fígado. Quanto à hemosiderina, não há variação significativa entre os tratamentos. Já a lipofuscina apresenta um aumento significativo nos animais tratados após 24 horas, estando ainda correlacionada positivamente com a quantidade de melanina. Embora o fígado e testículo em *E. nattereri* apresentem como característica convergente a presença de células contendo pigmentos, essas células respondem diferentemente frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente, demonstrando tratar-se de células distintas.

Palavras chave: Pigmentação visceral, Anuro, Fígado, Testículos, Infecção.

Abstract: Ectothermic vertebrates have a well-developed system of melanin-containing cells present on several organs (liver, spleen, lung, heart, thymus, and gonads) and tissues (meninges and connective tissues surrounding blood vessels), constituting an extracutaneous pigimentary system. The functional role of these pigmented cells in the visceral organs are not known, however there are several hypotheses, including a bactericide function. Our aim was to characterize the response of visceral pigmented cells in the liver of the anuran *Eupemphix nattereri* inoculated with lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli*. Morphological, estereological and histochemicals analyses were carried out in order to describe the cellular responses involving changes in the form and amount of pigimentary substances that occur in this cellular type in the liver and testes. We inoculated twenty animals with one dose of LPS of *E. coli*, and analyzed 2 and 24 hours after the inoculation for observation of pigmented cells. After this period, the animals were euthanized and the liver and the testes were submitted to the histological processing. The pigmentation increased in the liver of the treatment group after 24 hours, whereas the pigmentation on testes increased after 2 hours of inoculation. In the liver, haemosiderin and lipofuscin are located within melanomacrophages, along with melanin. Haemosiderin showed no variation between the treatments, but lipofuscin increased in the treatment group after 24 hours. The amount of haemosiderin was not correlated neither with melanin nor lipofuscina, but melanin and lipofuscin were significantly correlated in the animals analyzed 24 hours after LPS inoculation. Haemosiderin and lipofuscin were not observed on testes. Although the liver and testes in *E. nattereri* presented pigmented cells, these cells responded differently to the inflammation induced experimentally, demonstrating that cells are distinct.

Key Words: Visceral pigmentation, Anura, Liver, Testes, Infection.

I – Introdução Geral

O Grupo Animal:

A classe *Amphibia*, proposta por Gray (1825), apresenta-se como os primeiros vertebrados a viverem em ambiente terrestre, sendo que possuem como característica marcante uma fase larval aquática e outra adulta terrestre (POUGH *et al.*, 2003). Apresenta três subclasses, Labyrinthodontia (ancestrais dos répteis) e Lepospondyli, já extintas, e a subclasse Lissamphibia, na qual estão agrupados todos os anfíbios atuais. Essa subclasse é constituída pelas ordens Gymnophiona, representada pelas cecílias, Urodela, que são as salamandras, e Anura, a qual inclui sapos, rãs e pererecas (HILDEBRAND, 1995).

Os anfíbios anuros apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo a maior diversidade observada nas florestas tropicais (DUELLMAN e TRUEB, 1994; POUGH *et al.*, 2003). Os anuros apresentam características específicas, como permeabilidade cutânea à água e eletrólitos, possuem ciclo de vida dependente do ambiente aquático e do terrestre, fatos esses que os tornam vulneráveis às alterações ambientais (DUELLMAN e TRUEB, 1994; RABB, 1990) e às ações antrópicas degradantes.

Estudos relacionados à biologia reprodutiva, com ênfase na anatomia gonadal, realizados em espécies de regiões neotropicais são poucos (MORESCO e OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA e SANTOS, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2003 e 2002; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998), e referem-se a algumas espécies da família Leiuperidae, *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MORESCO e OLIVEIRA, 2009), *P. marmoratus* e *Eupemphix nattereri* (OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI *et al.*, 2007), com estudos sobre a espermiogênese e também sobre a ocorrência de numerosas células com pigmentos, distribuídas de forma aleatória na túnica albugínea e interstício testicular, conferindo coloração escura aos testículos.

Essa pigmentação tem sido utilizada como um importante caráter fenotípico na taxonomia e filogenia de Dendrobatidae (GRANT *et al.*, 2006) sendo também utilizada por Franco-Belussi *et al.* (2009) para distinguir representantes das famílias Leptodactylidae e Leiuperidae.

O Sistema Pigmentar Extracutâneo:

Os anfíbios, junto com os demais vertebrados ectotérmicos, compartilham a existência de um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos (GALLONE *et al.*, 2002). Há referências dessas células contendo melanina em algumas vísceras de peixes (JORDANOVA *et al.*, 2008; AGIUS e ROBERTS, 2003; HERRÁEZ e ZAPATA, 1991; ZUASTI *et al.*, 1990; AGIUS e AGBEDE, 1984; AGIUS, 1980), em salamandras (PRELOVISEK e BULOG, 2003; TREVISAN *et al.*, 1991; PEDERZOLI e TREVISAN, 1990), em anuros (MORESCO e OLIVEIRA, 2009; ZIERI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA e ZIERI, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2003 e 2002; GALLONE *et al.*, 2002; BARNI *et al.*, 2002 e 1999; ZUASTI *et al.*, 1998; AKULENKO, 1998; SICHEL *et al.*, 1997; ZAGAL'SKAIA, 1994; AOKI *et al.*, 1969) e em répteis (GOPALAKRISHNAKONE, 1986; CICERO *et al.*, 1989; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; RUND *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1999). Estes pigmentos melânicos que constituem o sistema pigmentar extracutâneo estão freqüentemente presentes no fígado, baço, rins, peritônio, pulmão, coração, vasos sanguíneos, timo, gônadas e meninges (FRANCO-BELUSSI, *et al.* 2010; MORESCO e OLIVEIRA, 2009; ZIERI *et al.* 2007; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; GALLONE *et al.*, 2002; ZUASTI *et al.*, 1998; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; ZUASTI *et al.*, 1990; AGIUS e AGBEDE, 1984; AGIUS, 1980). De modo particular para algumas espécies, células pigmentares também podem ser observadas em pequena proporção no órgão de Bidder de *Rhinella ornata* (= *Bufo crucifer*) ou (*Chaunus ornatus*)

(Bufonidae) (OLIVEIRA *et al.*, 2003), sendo também relatadas em testículos de *Rhinella schneideri* (MORESCO e OLIVEIRA, 2009).

Essas células, descritas na epiderme e em diversos órgãos são semelhantes à melanócitos (ZUASTI *et al.*, 1998; AGIUS e AGBEDE, 1984) provenientes da crista neural ectodérmica (SICHEL *et al.*, 1997), sendo capazes de produzir e armazenar melanina em seu interior (AGIUS e ROBERTS, 2003).

São também encontrados, em órgãos com função hematopoéticas, outros tipos celulares, com atividade fagocítica, semelhantes à macrófagos (AGIUS, 1980), originados de células tronco hematopoéticas (SICHEL *et al.*, 1997), os quais freqüentemente se agregam formando nódulos pigmentados denominados de centro de melanomacrófagos (AGIUS, 1981). Esses centros são constituintes do sistema fagocitário mononuclear, possuindo funções relativas à sua estrutura e fisiologia. A principal função está relacionada com 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); atuando ainda na resistência contra patógenos bacterianos e esporos parasitas (ROBERTS, 1975); sua ação também está relacionada com a estocagem do ferro após a eritrofagocitose (AGIUS e ROBERTS, 2003). A presença dos melanomacrófagos é relatada no baço, fígado e rins; apresentam grânulos em seus citoplasmas contendo substâncias como melanina, hemosiderina e lipofuscina, as quais são derivadas da degradação de material celular fagocitado (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRÁEZ e ZAPATA, 1991).

Substâncias Pigmentares:

A melanina é um polímero complexo, sintetizado endogenamente em vertebrados e invertebrados (CÉSARINI, 1996), possui várias formas multifuncionais, dentre elas a eumelanina e a feomelanina (PROTA, 1992). A biossíntese dessa substância pode ser iniciada

pela hidroxilação da L-fenilalanina a L-tirosina ou diretamente a partir da L-tirosina, que é hidroxilada a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela ação da enzima tirosinase. A L-DOPA então é oxidada à dopaquinone também pela ação da enzima tirosinase, sendo a partir dessa etapa divergente para a síntese de eu- e feomelanina (HEARING, 2006; PROTA, 1992).

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). É importante para os ectotérmicos contra componentes bacterianos devido à ação da hidrogeno-peroxidase e suas quinonas precursoras, as quais agem como bactericida, favorecendo as atividades enzimáticas, que podem ser restritas em baixas temperaturas (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996).

Hemosiderina é uma substância granular, que contém conjuntos de unidades de hidróxido de ferro juntamente com proteínas. Essa substância é gerada em tecidos onde há saturação de íons de ferro e desta maneira, esse composto para ser armazenado no interior celular tem que se acumular em grânulos (GRANICK, 1949). A hemosiderina apresenta proteínas derivadas do catabolismo da hemoglobina dos eritrócitos, sendo desta maneira, um produto metabólico intermediário que ocorre durante a reciclagem dos componentes na eritropoiese (KRANS, 1989). Durante o processo de catabolismo dos eritrócitos, há produção de grânulos de hemoglobina desnaturada, os quais ocorrem no interior de vacúolos digestivos e apresentam coloração marrom-amarelada, devido à presença de hidróxido de ferro e pigmentos biliares. Dentro de 3-4 dias essa coloração tende a desaparecer, embora alguns grânulos parcialmente digeridos possam permanecer no tecido gerando coloração amarelada devido à absorção de bilirrubina (GRANICK, 1949).

A lipofuscina, também conhecida como pigmento da idade, é um pigmento intralisossomal que não pode ser degradado pelas hidrolases lisossômicas, nem exocitado (TERMAN e BRUNK, 2004). É resultante da polimerização oxidativa de ácidos graxos

poliinsaturados, sendo acumulado em células pós-mitóticas, e, em peixes, como resultado de dietas alimentares deficientes (PICKFORD, 1953). Durante a degradação autofágica normal da mitocôndria e proteínas contendo ferro, nos lisossomos, o ferro é liberado intralissossomicamente, onde ele pode reagir com peróxido de hidrogênio formando radicais hidroxila. Dependendo de sua taxa de formação, estes radicais altamente reativos podem se ligar a materiais lisossômicos, levando à formação de lipofuscina, ou desestabilizando a membrana lisossomal, o que induz apoptose e necrose tecidual (KURZ, 2008; TERMAN e BRUNK, 2004).

Células Pigmentares:

Células especializadas no armazenamento de pigmentos, os cromatóforos, são observadas em invertebrados e vertebrados ectotérmicos. Apresentam muitas projeções citoplasmáticas, o que lhe confere aspecto dendrítico. São originadas do tubo neural durante o desenvolvimento do embrião e migram para a pele, distribuindo-se na epiderme e derme (WALLIN, 2002).

Vários tipos de pigmentos podem ser encontrados nos cromatóforos. Nos vertebrados, são descritos pelo menos cinco tipos de cromatóforos, os melanóforos, de cor preta ou marrom, possuem melanina em grânulos e são encontrados em peixes, anfíbios e répteis. Os eritróforos apresentam coloração avermelhada, tem como pigmento a pteridina; os xantóforos, também apresentam a substância pigmentar pteridina além de carotenóides dispostos em vesículas, conferindo coloração amarela. Os iridóforos apresentam coloração metálica, devido à presença de purinas depositadas em cristais refletoras, assim como os eritróforos e xantóforos são encontrados em peixes, anfíbios e répteis. Já os leucóforos, os quais portam grânulos de purinas, conferindo coloração branca, são relatados apenas em peixes (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; WALLIN, 2002).

Os cromatóforos presentes na pele dos animais se dispõem preferencialmente na região dérmica, sendo o xantóforo o mais superficial desta camada, localizado logo abaixo da membrana basal epidérmica responsável pela coloração amarela. Subseqüentemente há os iridóforo, células que possuem aspecto iridescente, originando coloração prateada. Na camada mais profunda encontram-se os melanóforos, os quais são responsáveis pela coloração de marrom ao preto. A disposição dessas células pigmentares nos diferentes extratos da pele estão intimamente relacionados ao tipo de pigmento que possuem e quais comprimentos de onda refletem e absorvem, podendo desta maneira exercer suas funções (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006).

Melanóforos dos animais ectotérmicos, localizados na derme, são responsáveis pela coloração escura (marrom-preta) dos peixes, anfíbios e répteis além de essencial para a rápida mudança de cor desses animais. Apresentam aspecto estrelado, ocupam grandes áreas, podendo ser observado especialmente na fase larval devido à fina espessura do epitélio. Melanóforos do tipo dérmicos não são apenas restritos à derme, mas freqüentemente ocorre em órgãos internos como fígado, rins, coração, timo, e gônadas, além dos vasos sanguíneos, peritônio e meninges (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006).

Peixes, répteis e anfíbios possuem a capacidade de alterar a coloração rapidamente por meio da regulação dos cromatóforos, onde há dispersão ou agregação das organelas que acumulam pigmentos no interior celular de acordo com o estímulo. Em peixes, o estímulo para a agregação ou dispersão dos pigmentos pode ser oriundo de inervação direta ou controle hormonal (FUJII, 2000). Já em anfíbios, a movimentação dos pigmentos ocorre apenas por controle hormonal (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006). Essa rápida mudança de cor nesses animais é chamada de fisiológica, e está envolvida com a camuflagem e sinalização social, estando envolvidos vários tipos de cromatóforos (ASPENGRÉN *et al.*, 2009).

Outro tipo de mudança de cor observada nos vertebrados é a mudança de cor morfológica, a qual é mais lenta que a fisiológica, porém duradoura. Esta mudança de cor é ocasionada pela mudança no número de cromatóforos e deposição de pigmentos no tegumento. Em mamíferos e anfíbios, os melanossomos são dispersos e transferidos para as células tegumentares, sendo que a longo prazo, a dispersão de pigmentos também estimula a produção de novas células pigmentares. Essa mudança de cor também é modulada pela ação hormonal, embora a regulação da diferenciação das células pigmentares e a transferência de pigmentos são dependentes dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMP c), cálcio e inositol trifosfato (IP3) (SUGIMOTO, 2002).

A mudança de cor observada nos vertebrados é modulada principalmente por três hormônios. Dentre eles, o mais conhecido e estudado, o α -Hormônio Estimulante do Melanócito (α -MSH), o qual possui ação tanto na pigmentação tegumentar dos animais ectotérmicos, agindo na dispersão de pigmentos nos melanóforos, xantóforos e eritróforos (BAGNARA e MATSUMOTO, 2006), bem como atua no sistema pigmentar extracutâneo, onde há um aumento da expressão gênica da tirosinase, como demonstrado por Guida, *et al.*(2004) no fígado de *Rana esculenta*. O Hormônio Concentrador de Melanina (MCH), encontrado em peixes teleósteos, possui efeito antagônico ao α -MSH, é um neuropeptídeo cíclico, sintetizado como pré-hormônio no hipotálamo de vertebrados (KAWAUCHI, 2006), apresentando como função a agregação dos melanossomos (FUJII, 2000). A Melatonina, a qual é um hormônio pineal produzido durante o período de escuro, foi identificada por Lerner (1960) como substância responsável pelo clareamento da pele em anfíbios, sendo sua ação também observada em cultura de melanóforos de peixes e anfíbios, sendo esse hormônio relatado como indutor da agregação dos melanossomos (ASPENGRÉN, 2003; MESSENGER e WARNER, 1977).

Os melanossomos são organelas onde pigmentos melânicos são produzidos e armazenados, estando presente vários graus de maturação dessa organela (MARKS e SEABRA, 2001). Os melanossomos iniciais, ou premelanossomos, não possuem pigmentos, embora tenha características distintivas. Estágio I do melanossomo contém vesículas internas membranosas que lembram típicos corpos multivesiculares endossomais tardios, e estruturas fibrosas irregulares. Fibras regulares e alongadas dispostas paralelamente caracterizam o Estágio II do melanossomo, resultando em sua característica estriada na microscopia eletrônica. Estas fibras servem como molde para deposição de eumelanina nos melanossomos maduros, resultando em seu escurecimento e espessamento (estágio III) e de eventual mascaramento de estrutura intralumeal devido ao acúmulo de melanina (estágio IV). Assim, a formação dos melanossomos com fibras características antecede a síntese de eumelanina, sendo um passo essencial na eumelanogênese (MARKS e SEABRA, 2001; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006).

Essas estruturas 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, 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 pequena (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 celular. 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).

O papel funcional das células pigmentares nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos ainda não está definido, havendo várias hipóteses (GALLONE *et al.*, 2002), dentre elas, funções citoprotetoras relacionadas aos radicais livres (MCGRAW, 2005) e processos de detoxificação de poluentes (FENOGLIO *et al.*, 2005); sendo ainda demonstrado um aumento na quantidade de melanina no fígado, conjuntamente com modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *Rana esculenta* durante o inverno (BARNI *et al.*, 1999). Ainda com relação ao fígado, o aumento da pigmentação pode estar relacionado com a hemocaterese (CÍCERO *et al.*, 1977; KALASHNIKOVA, 1992); e em salamandras, a ativação da melanogênese hepática pode estar relacionada com a hipóxia (FRANGIONI *et al.*, 2000); já com relação aos centros de melanomacrófagos em peixes, o aumento de pigmentos melânicos tem sido relacionado com patologias (ROBERTS, 1975).

Defesa contra Patógenos:

Os anfíbios, assim como os peixes, estão susceptíveis a ação de diversos organismos patogênicos, os quais se utilizam do ambiente aquático para sua disseminação. Como barreiras contra os patógenos esses animais apresentam secreções na pele que podem conter substâncias bactericidas evitando a contaminação. Quando o contaminante atinge o interior do corpo, é necessária a ação das células do sistema imunológico para sua eliminação, sendo os macrófagos, responsáveis por essa ação e são também considerados precursores dos órgãos linfóides dos mamíferos (VIGLIANO *et al.*, 2006).

Os macrófagos possuem importantes funções no sistema imunológico que envolve a fagocitose de material patogênico, produção de citocinas, secreção de fatores de crescimento e enzimas que remodelam o tecido injuriado (ABBAS e LICHTMAN, 2006 & MAGNADÓTTIR, 2006 *apud* HOLVOLD, 2007). Nos animais ectotérmicos os macrófagos

possuem atuação primordial na defesa contra patógenos, principalmente em baixas temperaturas, quando os linfócitos estão suprimidos (PXYTYCZ e JÓZKOWICZ, 1994).

Durante os processos infecciosos, a ativação dos macrófagos, se dá por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais, que possibilitam a destruição de microorganismos (ADAMS e HAMILTON, 1986). Uma das substâncias estimuladoras da ativação destas células são os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (MOREIRA e OLIVEIRA, 2002).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas compostas por lipídios e carboidratos, que estão presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas fornecendo proteção e resistência a esses organismos. Essa substância é uma endotoxina responsável pela resposta imune no organismo hospedeiro, a qual estimula os fagócitos mononucleares a sintetizar citocinas (FLORES QUINTANA e RUAS DE MORAES, 2001), como o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-10) (AKIRA e HEMMI, 2003), que mediam a reação imune contra o patógeno.

A bactéria *Escherichia coli* possui ampla distribuição e está associada, principalmente, a ambientes poluídos por efluentes de esgoto, provocando contaminação aquática, levando à contaminação tanto de animais, quanto de seres humanos. Essa bactéria apresenta sua patogenicidade associada à produção de toxinas, a qual é representada pelos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular externa, que ativa o sistema imune e promove a vasodilatação pela produção excessiva de citocinas, podendo levar ao choque séptico. Esse composto bacteriano tem sido utilizado como modelo de estudos para a caracterização do processo inflamatório em diferentes grupos animais, tais como roedores (BARONI *et al.*, 1976) e peixes, onde Flores Quintana e Ruas de Moraes (2001) correlacionaram a ocorrência do processo infeccioso com aumento dos melanomacrófagos presentes no rim de *Piaractus mesopotamicus*.

II – Objetivos

Tendo em vista que as células pigmentares presentes em órgãos hematopoéticos apresentam-se aumentadas devido a suas atividades fagocíticas, este estudo visa avaliar se a pigmentação visceral na superfície dos órgãos e estruturas da cavidade abdominal, bem como no tecido hepático e testicular do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) está associada ao papel protetor da melanina contra agentes infecciosos, e desta maneira, aumenta com o tempo de exposição ao patógeno.

Para tanto, esse trabalho descreve a pigmentação visceral de *E. nattereri* frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, evidenciando variações morfológicas e quantitativas na pigmentação hepática e testicular desse animal.

Com esse intuito, foram utilizadas análises estereoscópicas a fim de classificar a pigmentação visceral presente na superfície dos órgãos em 12 regiões anatômicas pré-estabelecidas (Capítulo 1). Visando elucidar a localização das células pigmentares no tecido hepático, foi realizada a descrição anatômica, histológica e ultraestrutural do fígado do anuro *Eupemphix nattereri* (Capítulo 2). A fim de descrever a dinâmica das células pigmentares presentes no fígado (Capítulo 3) e testículos (Capítulo 4) frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente foram realizadas análises histológicas quantitativas e histoquímicas desses tecidos.

III – Metodologia

Para o estudo, foram utilizados 30 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto – SP, em época de atividade reprodutiva (Janeiro e Fevereiro / 2008) (RAN/IBAMA/MMA 18573-1).

Os exemplares capturados foram acondicionados em sacos plásticos e levados ao Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde permaneceram em terrários (28 X 21 X 15 cm) com o fundo coberto com uma camada de 5 cm de terra retirada do ambiente onde os espécimes foram coletados. Nos terrários havia recipiente com água, para evitar a desidratação da pele, além de galhos e folhas para simular o hábitat do animal. A fim de prover sustento alimentar dos animais, foram disponibilizados alimentos naturais constituintes típicos de sua dieta alimentar, tais como drosofilídeos e isópteras.

Para os ajustes fisiológicos os animais permaneceram em fase de aclimação durante sete dias antes do início dos experimentos. Após os tratamentos, os animais foram transferidos para locais (de mesmas dimensões) esterilizados e sem terra, onde havia recipiente com água e alimento. Esse procedimento foi adotado para evitar a contaminação dos animais por infecções secundárias durante os experimentos.

Inoculação de Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*:

Os animais do tratamento (n=20) foram inoculados via intraperitoneal com dose única de 3 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, Serotype 0127:B8 (Sigma, St. Louis, MO) (adaptado de FLORES QUINTANA e RUAS DE MORAES, 2001) diluído em solução fisiológica estéril. Para o controle (CONT), 10 animais foram injetados com solução fisiológica estéril, na mesma quantidade.

As respostas celulares foram avaliadas 2 horas após as inoculações a fim de observar a ativação das células residentes nos tecidos (LPS 2h), e 24 horas após a inoculação para observar a ativação do sistema imune inato e migração de células circulantes do sangue periférico (LPS 24h). Segundo Flores Quintana e Ruas de Moraes (2001), 24 horas após a inoculação do inflamógeno aumenta a quantidade de centros de melanomacrófagos presentes no rim de *Piaractus mesopotamicus* inoculados com LPS.

Durante os períodos experimentais, os animais foram monitorados periodicamente para verificação de sua vitalidade, sendo inferida a partir da verificação de sua integridade motora, medida por meio da resposta à estímulos táteis.

Processamento do material:

Os animais foram medidos no comprimento rostro-cloacal e pesados (antes e após o procedimento experimental). Em seguida, foram anestesiados e mortos por dose letal do anestésico Benzocaína (0,5g /500 mL de água) (Protocolo No. 70/07-CEEA), sendo dissecados através de incisão mediana desde a cloaca até a altura da cintura dos membros dianteiros, expondo os órgãos da cavidade abdominal para análises macroscópicas e fotodocumentação em microscópio estereoscópico (Leica MZ16) acoplado ao sistema de captura de imagens (Figura 1A). Após a abertura da cavidade, o fígado e os testículos foram removidos (Figuras 1B e C), pesados (separadamente).

Quantificação das células pigmentares viscerais

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 em outros órgãos e tecidos. 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 (Apêndice 1).

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 lumbosacral; 12- Mesentério.

Análises Morfológicas e Estereológicas:

Para as análises morfológicas fragmentos de fígado e testículos foram fixados em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 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 2 µm foram obtidos em micrótomo (RM 2265, Leica, Suíça). Os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280).

As análises estereológicas foram realizadas com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 4.5) de acordo com a proposta de Lehr (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 visceral foram analisados 25 campos histológicos de cada órgão (fígado e testículo) de cada animal, totalizando 125 regiões analisadas, de cada órgão, por grupo experimental.

Análises Histoquímicas:

Para a detecção das substâncias lipofuscina e hemosiderina foram utilizados cortes histológicos de fígado e testículo com 2 μm de espessura, em historresina. Para a detecção da lipofuscina, os cortes foram incubados por 15 min em solução de Schmorl, composta de 75mL de cloreto férrico a 1%, 10mL de ferricianeto de potássio e 15mL de água destilada, posteriormente foram imersas em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina 1% . Para detecção da hemosiderina, os cortes foram incubados pelo mesmo tempo, em solução ácida de ferrocianídeo, obtido com a dissolução de 2g de ferrocianeto de potássio em 100mL de solução de ácido clorídrico a 0,75mol/L. Posteriormente foram imersas em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina a 1% . Após esses procedimentos foram montadas em lâminas permanentes.

Análise Estatística:

Para análise dos dados foram identificados *outliers* e posteriormente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos foi realizada análise de variância Anova um critério; e para a análise de correlação com dados biométricos, o coeficiente de correlação de Pearson. Já para os dados não paramétricos, foi realizada a transformação com a utilização da raiz quadrada, caso permanecessem como não paramétricos, foi utilizado para a análise de variância o teste de Kruskal-wallis; e para a análise de correlação com variáveis biométricas o coeficiente de correlação de Spearman (ZAR, 1999).

IV – Figuras

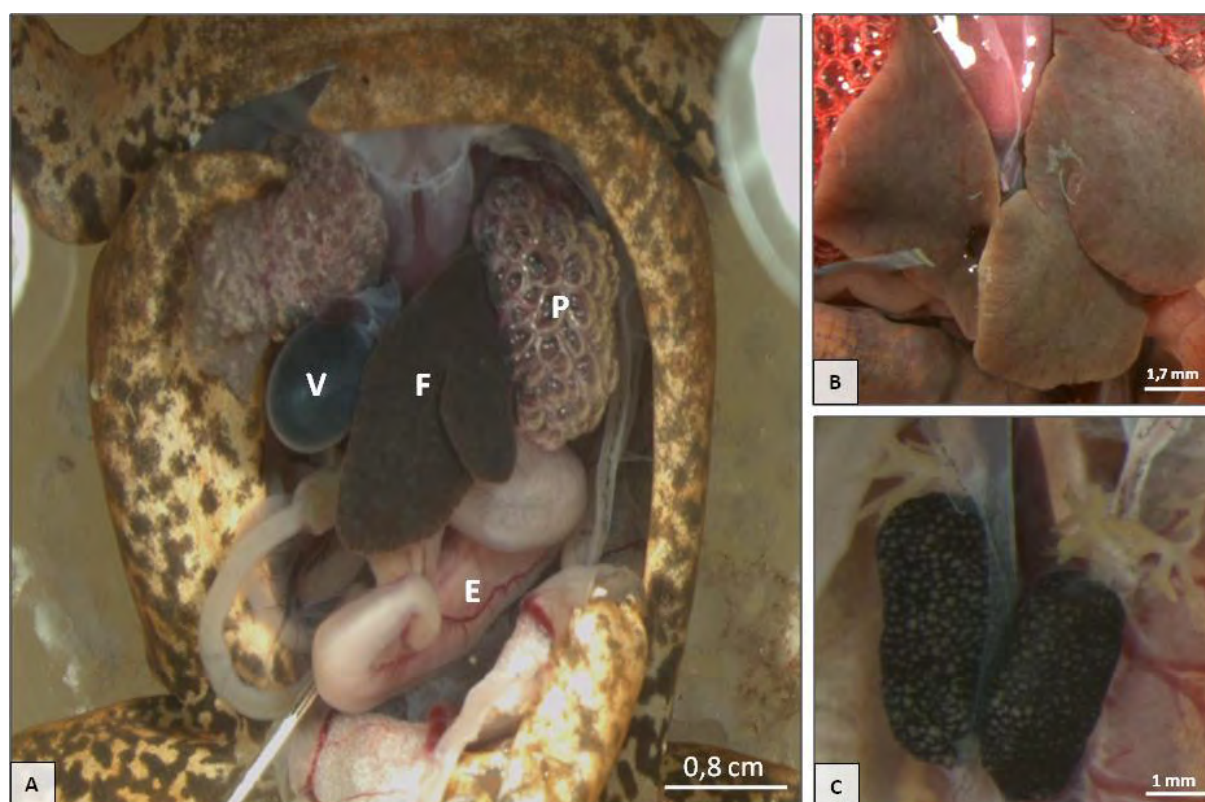


Figura 1: A - Vista geral da cavidade abdominal do anuro *Eupemphix nattereri* evidenciando os órgãos. E: Estômago; F: Fígado; P: Pulmão; V: Vesícula Biliar. B – Fígado, representando suas características anatômicas e estruturais. C – Testículos, evidenciando intensa pigmentação encontrada nas gônadas dos animais dessa família.

V – Referências Bibliográficas

- ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. 1986. Regulation of Macrophage Activation at the Molecular Level. **Annales Institute Pasteur/Immunology**. v.137C, p.103-25.
- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic Development of Melano-Macrophage Centers in Fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.11-31.
- AGIUS, C. 1981. Preliminary Studies on the Ontogeny of the Melanomacrophages of Teleost Hematopoetic 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.
- AKIRA, S.; HEMMI, H. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunology Letters**. v.85, p.85-95.
- 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 für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. v.98, n.1, p.9-16.
- ASPENGRÉN, 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.
- ASPENGRÉN, S.; HEDBERG, D.; SKÖLD, H.N.; WALLIN, M. 2009. New Insights into Melanosome Transport in Vertebrate Pigment Cells. **International Review of Cell and Molecular Biology**. v.272, p. 245-302.
- BAGNARA J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. In: Nordlund J. J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R. A.; Ortonne, J-P; eds. **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. New York, Oxford: Oxford University Press, p. 9-40.
- 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.
- BARONI, C. D.; RUCO, L.; FRANCESCHI, G.S.; UCCINI, S.; ADORINI, L.; CENEN, G.D. 1976. Biological Effects of Lipopolysaccharide (LPS) *in vivo*. **Immunology**. v.31, p. 217-224.

- 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.
- 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.
- 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.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. 1994. **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.
- 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.
- FLORES QUINTANA, C.; RUAS DE MORAES, F. 2001 Resposta Inflamatória a la Inoculación de LPS em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Suplementados con Cromo. **Revista de Ictiologia**. v.9, p.13-19.
- 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.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger** (*In press*).
- FRANGIONI, G.; BORGIOLI, G.; BIANCHE, S.; PILLOZZI, S. 2000. Relationships Between Hepatic Melanogenesis and Respiratory Conditions in the Newt, *Triturus carnifex*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 287, p. 120-127.
- 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.; CICERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. v.15, n.1, p. 32-40.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. 1986. The Structure of the Pigment Cells in the Turtle *Trionyx sinensis*. **Archivum Histologicum Japonicum**. v.49, p.421-435.

- GRANICK, S. 1949. Iron Metabolism and Hemochromatosis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine.** v.25, n.7, p. 403-428.
- 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.
- HEARING, V. J. 2006. The Regulation of Melanin Formation. In: Nordlund J. J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R. A.; Ortonne, J-P; eds. **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology.** New York, Oxford: Oxford University Press, p. 191-212.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1986. Structure and Function of the Melano-Macrophage 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.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da Estrutura dos Vertebrados.** 3ª ed. Atheneu, São Paulo. 700p.
- HOLVOLD, L. B. 2007. Immunostimulants connecting innate and adaptive immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Dissertação de Mestrado.** University of Tromso. 69 p.
- 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.
- JORDANOVA, M.; MITEVA, N.; ROCHA, E. 2008 A Qualitative and Quantitative Study of the Hepatic Pigmented Macrophage Aggregates During the Breeding Cycle of Ohrid Trout, *Salmo letnica* Kar(Teloestei, Salmonidae). **Microscopy Research And Technique.** v.71, p.822-830.
- KALASHNIKOVA, M.M. 1992. Erythrophagocytosis and Pigment Cells of the Amphibian Liver. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** v.113, p.82-84.
- KAWAUCHI, H. 2006. Functions of Melanin-Concentrating Hormone in Fish. **Journal of Experimental Zoology.** v.305A; p.751-760
- KRANZ, H. 1989. Changes in Splenic Melano-Macrophages Centres of Dab, *Limanda limanda* During and After Infection with Ulcer Disease. **Disease of Aquatic Organisms.** v.6, 167-173.
- KURZ, T. 2008. Can Lipofuscin Accumulation be Prevented? **Rejuvenation Research.** v. 11, n.2, p.441-443.
- 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 (11) 1559-1565.
- 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.
- 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.
- MESSENGER, E.A.; WARNER, A.E. 1977. The Action of Melatonin on Single Amphibian Pigment Cells in Tissue Culture. **British Journal of Pharmacology**. v.61, p.607-614.
- MOREIRA, M.R.; OLIVEIRA, C.A. 2002. Estudo do Processo de Ativação e Espalhamento de Macrófagos Induzido por Diferentes Agentes e Ensaio frente a Citocalasina b. **Horizonte Científico, UFU**. v. 1, p. 01-23.
- 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,(1), p. 1-8.
- 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.; SANT'ANA, 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 curvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**. Porto Alegre, v.11, n.1, p.39-46.
- OLIVEIRA, C.; SANTOS, L.R.S. 2004. Histological Characterization of Cellular Types During *Scinax fuscovarius* Oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.21, n.4, p.919-923.
- OLIVEIRA, C.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2007. Variações Anatômicas no Aparelho Reprodutor Masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). **Biota Neotropica**. v. 7, n. 1.
<http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+bn01207012007>
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A. 1998. Descrição Anatômica dos Testículos e Corpos Adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**. Porto Alegre, v.6, n.1, p.79-88.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. 2002. Morphological Observations on the Testes of *Physalaemus curvieri* (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, junho, p.454-460.
- PEDERZOLI, A.; TREVISAN, P. 1990. Pigmentary System of the Adult Alpine Salamander *atra aurorae*. **Pigment Cell Research**. v.3, p.80-89.

- PICKFORD, G.W. 1953. Fish Endocrinology. A Study of the Hypophysectomized Male Killifish, *Fundulus heteroclitus* (L.). **Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection, Yale University**. v.14, p. 5-41.
- 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.
- PXYTYCZ, B.; JÓZKOWICZ, A. 1994. Differential Effects of Temperature on Macrophages of Ectothermic Vertebrates. **Journal of Leukocyte Biology**. v.56, p. 729-731.
- RABB, G.B. 1990. Declining Amphibian Population. **Species**. v.13, n.14, p.33-34.
- ROBERTS, R.J. 1975. Melanin-Containing Cells of Teleost Fish and their Relation to Disease. In: **The Pathology of fishes** (ed. By W.E. Ribelin & G. Migaki). University of Wisconsin Press, Madison, W.I. p. 399-428.
- RUND, C.R.; CHRISTIANSEN, J.L.; JOHNSON, J.C. 1998. *In vitro* Culture of Melanomacrophages from the Spleen and Liver of Turtles: Comments on Melanomacrophage Morphology. **Pigment Cell Research**. v.11, n.2, p.114-119.
- 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.
- TERMAN, A.; BRUNK, U. T. 2004. Lipofuscin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 36, p. 1400-1404.
- TREVISAN, P.; PEDERZOLI, A.; BAROZZI, G. 1991. Pigmentary System of the Adults Alpine salamander *Salamandra atra atra*. **Pigment Cell Research**. v.4, p.151-157.
- VIGLIANO, F.A.; BERMÚDEZ, R.; QUIROGA, M.I.; NIETO, J.M. 2006. Evidence for Melano-Macrophage Centres of Teleost as Evolutionary Precursors of Germinal Centres of Higher Vertebrate: An Immunohistochemical Study. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 21, 467-471.
- WALLIN, M. 2002. Nature's Palette: How Animals, Including Humans, Produce Colours. **Bioscience Explained**. v.1, n.2, p.1-12.
- ZAGAL'SKAIA, E.O. 1994. The Vascular Melanocytes of the Pia Mater and Mesentery of the Small Intestine in the Frog: Structure and Functions. **Tsitologia**. v.36(B), p.796-801.
- 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.; 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.; 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.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C., GARCIA-BORRÓN, J.C., FERRER, C. 1998. The Melanogenic System of *Xenopus laevis*. **Archives Histology Cytology**. v.61, p.305-316.

Capítulo 1

Pigmentação Visceral em *Eupemphix nattereri* infectado com LPS de
Escherichia coli

Pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* infectado com LPS de *Escherichia coli*

Lilian Franco-Belussi¹ & Classius de Oliveira²

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto

² Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Italian Journal of Zoology*

Resumo: Os anfíbios possuem um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos. O papel funcional dessas células pigmentares nos órgãos viscerais ainda não está definido, havendo várias hipóteses. Esse estudo visa descrever a pigmentação visceral do anuro *Eupemphix nattereri* frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por *Escherichia coli*, bem como, analisar a resposta pigmentar na superfície dos órgãos. Para o estudo, foram utilizados 30 machos adultos de *Eupemphix nattereri*, coletados na região de São José do Rio Preto, os quais foram inoculados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, sendo eutanasiados e analisada a pigmentação visceral após 2 e 24 horas de inoculação do patógeno. É observada, por meio da microscopia estereoscópica, conspícua pigmentação na superfície dos órgãos da cavidade abdominal. No sistema cárdio-respiratório há ausência total de pigmentação no coração, em todos os animais dos três grupos experimentais, enquanto em outras regiões como pulmões, pericárdio e vasos da base cardíacos todos os indivíduos analisados apresentaram algum grau de pigmentação (categorias 1 e 2). No sistema digestório há pouca pigmentação na superfície dos órgãos. O maior grau de pigmentação (categoria 3) foi observado apenas nas gônadas dos animais do grupo controle e tratados analisados após 2 horas de inoculação do patógeno, sendo que nos animais analisados após 24 horas da inoculação há menor grau de pigmentação, demonstrando uma redução desta pigmentação na superfície gonadal em animais inoculados com o patógeno e analisados após 24 horas. Em regiões como mesentério, peritônio parietal lombosacral e plexo nervoso lombar a pigmentação ocorre (categorias 1 e 2), com distribuição constante, em todos os grupos experimentais.

Palavras chave: Pigmentação visceral, Anuro, *Eupemphix nattereri*, Infecção, *Escherichia coli*.

Introdução

Os anfíbios possuem um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos (GALLONE *et al.*, 2002). Estes pigmentos melânicos que constituem o sistema pigmentar extracutâneo estão frequentemente presentes no fígado, baço, rins, peritônio, pulmão, coração, vasos sanguíneos, timo, gônadas e meninges (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010; MORESCO e OLIVEIRA, 2009; ZIERI *et al.*, 2007; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; GALLONE *et al.*, 2002; ZUASTI *et al.*, 1998; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; ZUASTI *et al.*, 1990; AGIUS e AGBEDE, 1984; AGIUS, 1980).

Essas células, descritas na epiderme e em diversos órgãos são semelhantes à melanócitos (ZUASTI *et al.*, 1998; AGIUS e AGBEDE, 1984) provenientes da crista neural ectodérmica (SICHEL *et al.*, 1997), sendo capazes de produzir e armazenar melanina, a qual é capaz de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (ZUASTI *et al.*, 1989; AGIUS e ROBERTS, 2003),.

São ainda encontrados, em órgãos com função hematopoéticas, outros tipos celulares, com atividade fagocítica, semelhantes à macrófagos (AGIUS, 1980), os quais frequentemente se agregam formando nódulos pigmentados denominados de centro de melanomacrófagos (AGIUS, 1981).

O papel funcional dessas células pigmentares nos órgãos viscerais ainda não está definido, havendo várias hipóteses (GALLONE *et al.*, 2002), dentre elas, funções citoprotetoras relacionadas aos radicais livres (MCGRAW, 2005) e processos de detoxificação por poluentes (FENOGLIO *et al.*, 2005); sendo ainda demonstrado um aumento na quantidade de melanina no fígado, conjuntamente com modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *Rana esculenta* durante o inverno (BARNI *et al.*, 1999).

Esse estudo visa descrever a pigmentação visceral do anuro *Eupemphix nattereri* frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por *Escherichia coli*, bem como, analisar a resposta pigmentar na superfície dos órgãos.

Metodologia

Para o estudo, foram utilizados 30 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto – SP (RAN/IBAMA/MMA 18573-1), em época de atividade reprodutiva (Janeiro e Fevereiro / 2008). O manuseio dos animais, bem como os procedimentos experimentais 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).

Os exemplares capturados foram acondicionados em sacos plásticos e levados ao Laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde permaneceram em terrários (28 X 21 X 15 cm) com o fundo coberto com uma camada de 5 cm de terra retirada do ambiente onde os espécimes foram coletados. Para os ajustes fisiológicos os animais permaneceram em fase de aclimação durante sete dias antes do início dos experimentos. Após os tratamentos, os animais foram transferidos para locais (de mesmas dimensões) esterilizados e sem terra. Esse procedimento foi adotado para evitar a contaminação dos animais por infecções secundárias durante os experimentos.

Os animais do tratamento (n=20) foram inoculados via intraperitonal com dose única de 3 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, Serotype 0127:B8 (Sigma, St. Louis, MO) (adaptado de FLORES QUINTANA e RUAS DE MORAES, 2001) diluído em solução fisiológica estéril, sendo analisados após 2 horas (LPS 2h) e 24 horas (LPS 24h) de inoculação do

patógeno. Para o controle, 10 animais foram injetados com solução fisiológica estéril, na mesma quantidade. Os três grupos experimentais foram constituídos aleatoriamente.

Os animais foram anestesiados e mortos por dose letal do anestésico Benzocaína (0,5g /500 ml de água), sendo dissecados através de incisão mediana desde a cloaca até a altura da cintura dos membros dianteiros, expondo os órgãos da cavidade abdominal para análises macroscópicas e fotodocumentação em microscópio estereoscópico (Leica MZ16) acoplado ao sistema de captura de imagens.

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 em outros órgãos e tecidos. 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- Mesentério.

Resultados

É observada, por meio da microscopia estereoscópica, conspícua pigmentação na superfície dos órgãos da cavidade abdominal (12 regiões anatômicas pré-estabelecidas) (Figuras 1, 2 e 3).

Ao analisar órgãos do sistema cárdio-respiratório (Figura 1A e B) foi observada ausência total de pigmentação no coração (músculo cardíaco), em todos os animais dos três grupos experimentais (controle, LPS 2h e LPS 24h), enquanto em outras regiões como pulmões, pericárdio e vasos da base cardíacos todos os indivíduos analisados apresentaram algum grau de pigmentação (categorias 1 e 2) (Figura 4).

No pericárdio e vasos da base cardíaco, há predomínio de pouca pigmentação (categoria 1) nos animais dos três grupos experimentais, sendo um maior grau de pigmentação (categoria 2) observado também em animais do grupo controle e experimental analisado após 24 horas, em apenas 1 indivíduo.

Nos pulmões, a maioria dos indivíduos do grupo LPS 2h apresentam quantidade expressiva de pigmentação (categoria 2) assim como alguns indivíduos do grupo controle e LPS 24h, embora nesses grupos o predomínio é de pouca pigmentação nesse órgão (categoria 1). Não são verificadas diferenças entre os antímeros pulmonares.

Órgãos do sistema digestório (Figuras 1C e D, 2A) apresentam pouca pigmentação em suas superfícies. A região que apresentou pigmentação na maioria dos indivíduos, embora em pequena quantidade (categoria 1) foi a porção final do intestino, mais especificamente o reto, onde em todos os indivíduos dos grupos tratados apresenta pigmentação; enquanto no grupo controle, embora há predomínio da categoria 1 nessa região, há um indivíduo que não apresentou pigmentação (categoria 0). Há também indivíduos que apresentaram maior quantidade de pigmentação nessa região (categoria 2) no grupo controle e LPS 24h (Figura 5).

No sistema urogenital (Figuras 2B e C), não é observada pigmentação em nenhum animal, de nenhum dos grupos experimentais, na vesícula urinária; na face dorsal dos rins e veias renais, a pigmentação ocorre em todos os animais analisados, dos três grupos experimentais, sendo encontrada pouca a moderada pigmentação (categorias 1 e 2) (Figura 6).

O maior grau de pigmentação (categoria 3) foi observado apenas nas gônadas dos animais do grupo controle e LPS 2h, sendo que nos animais analisados após 24 horas da inoculação do patógeno há o predomínio de pouca a moderada pigmentação (categorias 1 e 2), onde há presença de pigmentação, embora ainda seja possível distinguir a coloração esbranquiçada, comumente descrita para os testículos de vertebrados (Figuras 3 e 6). Essa diferença na quantidade de pigmentação encontrada nos testículos dos animais dos diferentes grupos experimentais é significativa estatisticamente (X^2 : 17,11 e $p = 0,002$), demonstrando uma redução na quantidade de pigmentação na superfície gonadal em animais inoculados com o patógeno e analisados após 24 horas (Figura 8). Também não foram observadas diferenças entre os antímeros gonadais e nos rins.

Em regiões como mesentério, peritônio parietal lumbosacral e plexo nervoso lombar (Figura 2D) há presença constante de pigmentação em todos os grupos experimentais, variando de pouca a moderada pigmentação (categorias 1 e 2) (Figura 7).

Discussão

Células contendo pigmentos melânicos são encontradas, além da pele, em outros órgãos, constituindo o sistema pigmentar extracutâneo (GALLONE *et al.*, 2002). Essas células estão presentes frequentemente no tecido conjuntivo (cápsula e interstício) ou externamente associada a túnicas adventícias ou membranas serosas (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010; GALLONE *et al.*, 2002). São células 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 (OLIVEIRA e ZIERI, 2005).

Dentre os poucos estudos que descrevem estes tipos celulares, destacam-se os que envolvem o aparelho urogenital dos anuros. Para a maioria das espécies não são descritas

células pigmentares nas gônadas, embora alguns autores constatarem uma íntima relação dos melanócitos viscerais com o sistema vascular dessas, bem como nos vasos de outros órgãos, e também nas membranas conjuntivas associadas. Especificamente nas gônadas de *E. nattereri*, *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 (OLIVEIRA *et al.*, 2002 e 2003; OLIVEIRA e ZIERI, 2005; ZIERI *et al.* 2007).

A função dessa pigmentação presente nas gônadas de anuros, não está ainda definida, embora tenha sido utilizada por Franco-Belussi *et al.* (2009) para diferenciar espécies de anuros presentes em duas famílias, gerando um padrão para a classificação pigmentar desse órgão, e desta maneira sugerindo um caráter filogenético para essa pigmentação.

Células pigmentares presentes em órgãos hematopoéticos são encontrados associados à doenças infecciosas crônicas (AGIUS e ROBERTS, 2003), devido à características morfofisiológicas dessas células. Em *E. nattereri*, células pigmentares presentes na superfície dos testículos encontram-se diminuídas após 24 horas de inoculação do patógeno, evidenciando diferenças funcionais entre esses dois tipos celulares.

Ainda em relação à pigmentação testicular, Moresco e Oliveira (2009) relataram a ocorrência de discreta pigmentação (categoria 1) variando durante o período reprodutivo em *Rhinella schneideri*, embora em outra espécie, *Physalaemus cuvieri*, a pigmentação testicular foi intensa (categoria 3) e igualmente distribuída ao longo de toda a estação reprodutiva. Já em espécies como *Dendropsophus nanus*, *D. minutus*, *D. elianeae* e *D. sanborni* não foi relatada pigmentação nas gônadas em animais coletados durante o período reprodutivo (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010).

Em regiões como pericárdio, coração, estômago, intestino, rins e veias renais, a pigmentação encontrada em *E. nattereri* inoculados com *E. coli* é semelhante ao relatado por Moresco e Oliveira (2009) para as espécies *Rhinella schneideri* e *Physalaemus cuvieri*

durante o período reprodutivo dessas espécies; havendo um predomínio de discreta pigmentação (categoria 1) no pericárdio; já no coração e órgãos do sistema digestório (estômago e intestino) a ausência de pigmentação é predominante. Já para as espécies *Dendropsophus elianeae* e *D. sanborni* há predomínio de pouca pigmentação no coração; enquanto para a espécie *Dendropsophus nanus* há presença de maior grau de pigmentação (categoria 2) nesse órgão. Para as espécies do gênero *Dendropsophus*, a ausência total de pigmentação também é relatada no estômago e intestino de animais analisados durante o período reprodutivo (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010).

Outras regiões como pulmões, em *E. nattereri*, há aumento da pigmentação nos animais infectados, analisados após 2 horas de inoculação do patógeno (categoria 2); em *P. cuvieri* há variação na ocorrência de pigmentação, onde no início da estação reprodutiva apresentavam pouca pigmentação (categoria 1), e ao final da estação o predomínio era de ausência pigmentar (categoria 0) (MORESCO e OLIVEIRA, 2009); enquanto em *Dendropsophus nanus* e *D. elianeae* o predomínio é de pouca pigmentação (categoria 1) (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010).

Na porção final do intestino, mais especificamente, no reto, há predomínio de discreta pigmentação (categoria 1) em *E. nattereri*, em todos os animais, inoculados com *E. coli* e do grupo controle, o que também é observado na espécie *P. cuvieri*, durante o período reprodutivo (MORESCO e OLIVEIRA, 2009). Nas espécies do gênero *Dendropsophus* (*Dendropsophus nanus*, *D. elianeae* e *D. sanborni*) há predomínio da ausência de pigmentação (categoria 0) no reto, enquanto em *D. minutus* a totalidade dos indivíduos apresentou intensa pigmentação (categoria 3) nessa região (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010).

Nos rins e veias renais, em *E. nattereri*, a presença de pigmentação é constante e variando da discreta (categoria 1) à quantidade intermediária (categoria 2), assim como o observado para *P. cuvieri* durante o período reprodutivo; já em *D. nanus*, a pigmentação

presente na face dorsal dos rins apresentou variação na ocorrência ao longo do período reprodutivo, sendo ausente (categoria 0) no início da estação e aumentando (categoria 2) no final da estação (MORESCO e OLIVEIRA, 2009). A espécie *D. minutus* não apresentou pigmentação nessa região, em nenhum dos animais analisados (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010).

Em regiões como mesentério, peritônio parietal lombosacral e plexo nervoso lombar, em *E. nattereri*, há ocorrência de pigmentação distribuídas nas categorias 1 e 2 não sendo correlacionadas com os tratamentos experimentais, assim como as variações encontradas em *R. schneideri*, *P. cuvieri* e *D. nanus* não foram relacionadas ao período reprodutivo desses animais (MORESCO e OLIVEIRA, 2009).

Desta maneira, é possível observar que a pigmentação presente na superfície dos órgãos dos anuros apresenta-se semelhante entre as espécies, em determinadas regiões, variando discretamente nos limites de amplitude da variação anatômica da espécie, dependendo do estímulo. Embora não foi relatado que um estímulo possa induzir pigmentação em determinada região não existente.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Diogo Borges Provete pela revisão e sugestões ao manuscrito, ao Msc. Rodrigo Zieri e Msc. Lia Raquel de Souza Santos pela contribuição nas coletas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lilian Franco Belussi (Proc. 2008/52389-0).

Figuras

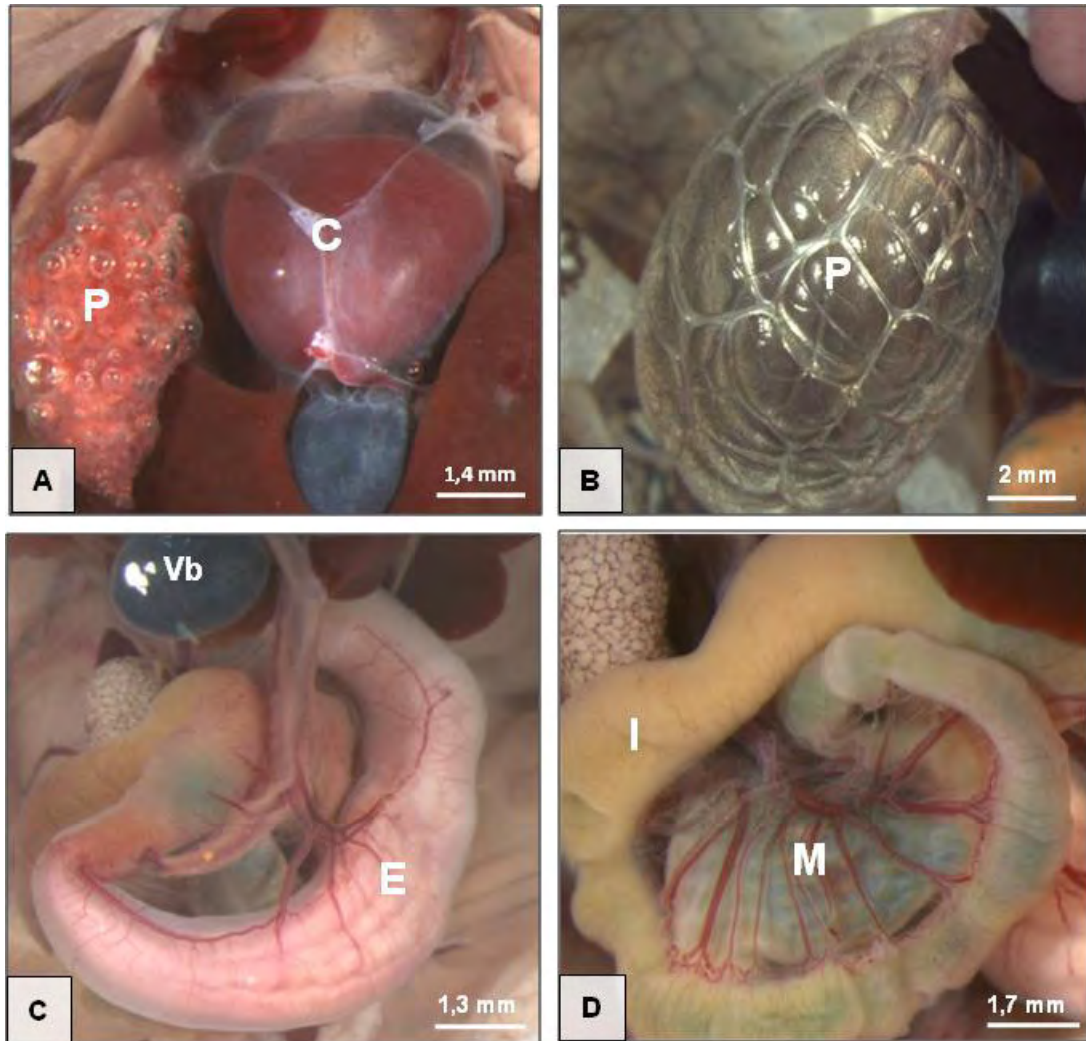


Figura 1: Órgãos e estruturas da cavidade abdominal do anuro *Eupemphix nattereri*. A e B – Sistema cárdio-respiratório. C e D – Órgãos e estruturas do sistema digestório. C: Coração; E: Estômago; I: Intestino; M: Mesentério; P: Pulmão; Vb: Vesícula biliar.

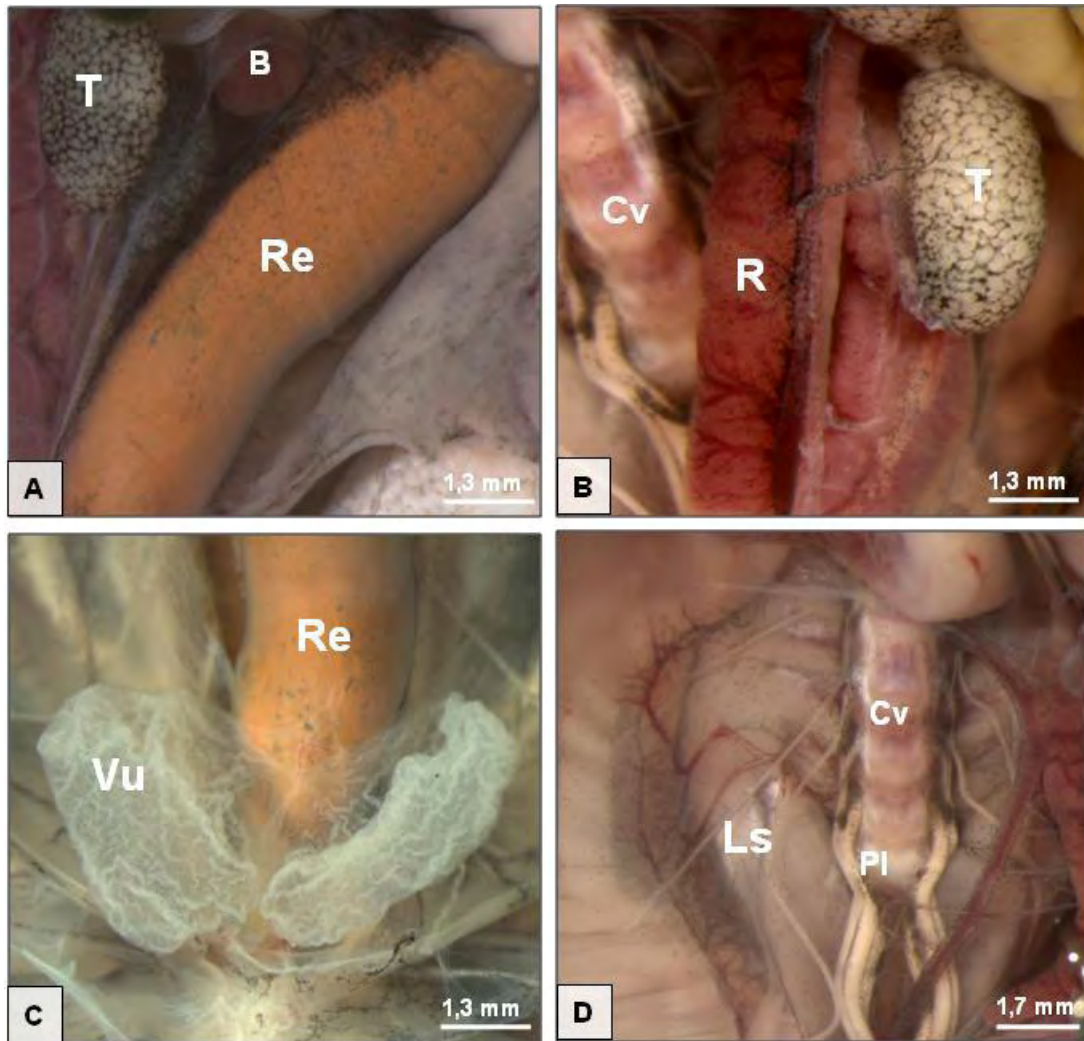


Figura 2: Órgãos e estruturas da cavidade abdominal do anuro *Eupemphix nattereri*. A – Sistema digestório, porção final, reto. B e C – Sistema urogenital. D – Outras regiões em que as células pigmentares são encontradas. B: Baço; Cv: Coluna vertebral; Ls: Peritônio lumbo-sacral; PI: Plexo nervoso lombar; R: Rim; Re: Reto; T: Testículo; Vu: Vesícula urinária.

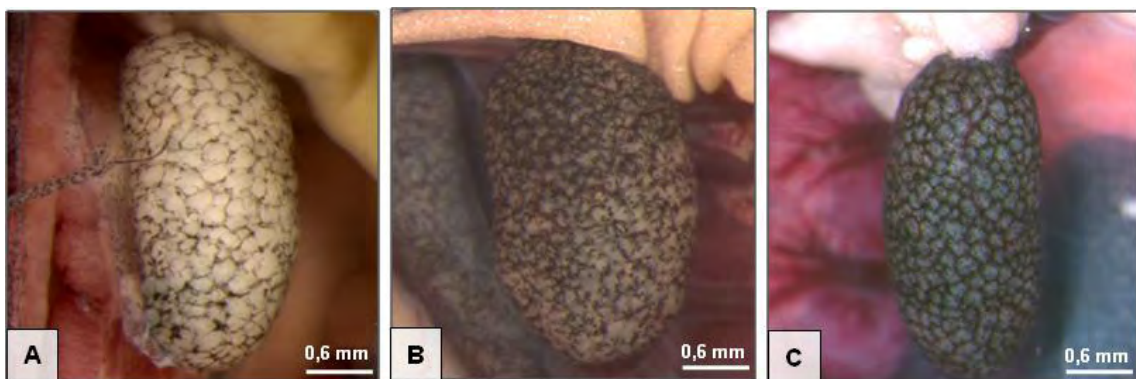


Figura 3: Variação da pigmentação testicular encontrada em *Eupemphix nattereri*. A – Presença de pouca pigmentação (Categoria 1). B – Pigmentação conspícua, onde a coloração usual do órgão foi mascarada (Categoria 2). C – Intensa pigmentação, (Categoria 3).

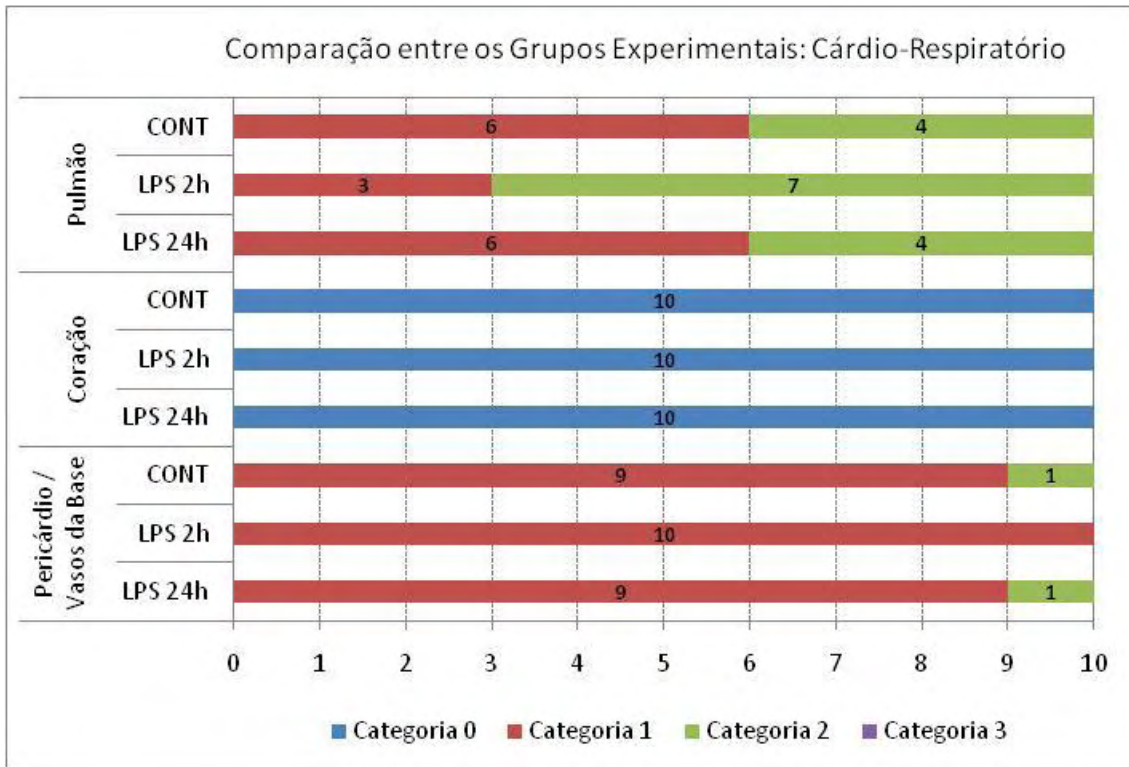


Figura 4: Análise comparativa da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* inoculados com LPS de *Escherichia coli*, órgãos e estruturas do sistema cárdio-respiratório. CONT: Animais do grupo controle; LPS 2h: Animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno; LPS 24h: Animais analisados após 24 horas de inoculação do patógeno.

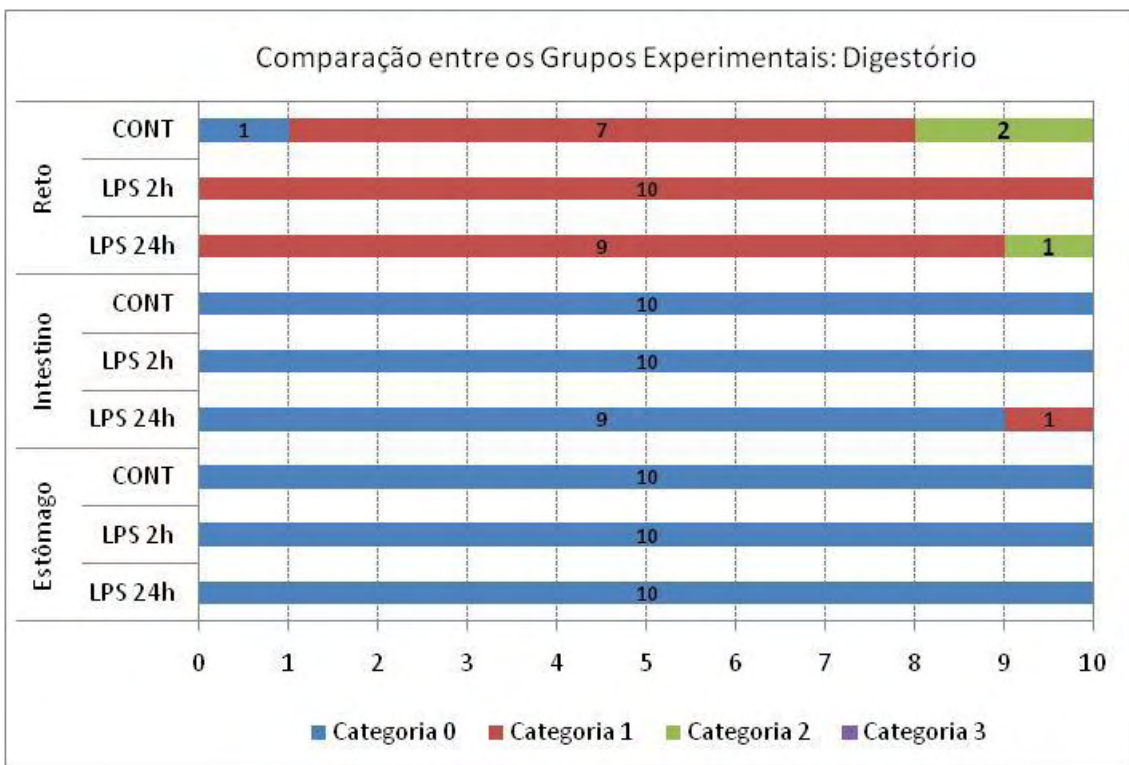


Figura 5: Análise comparativa da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* inoculados com LPS de *Escherichia coli*, órgãos e estruturas do sistema digestório. CONT: Animais do grupo controle; LPS 2h: Animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno; LPS 24h: Animais analisados após 24 horas de inoculação do patógeno.

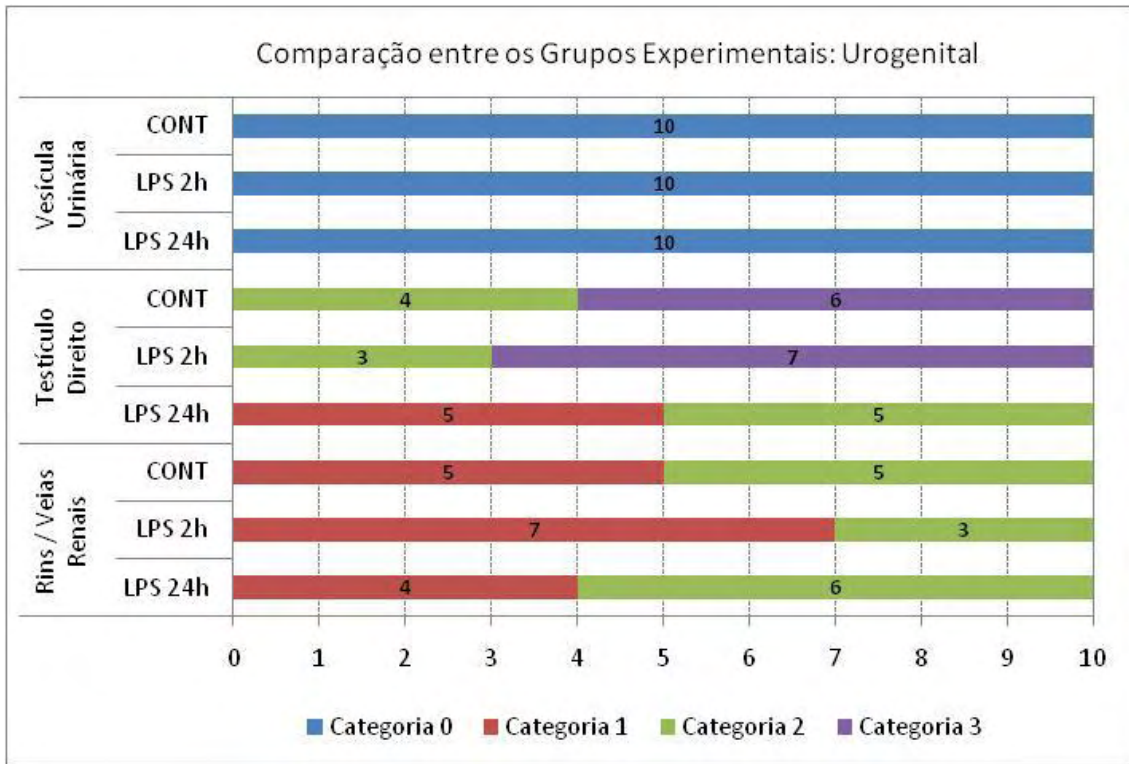


Figura 6: Análise comparativa da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* inoculados com LPS de *Escherichia coli*, órgãos e estruturas do sistema urogenital. CONT: Animais do grupo controle; LPS 2h: Animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno; LPS 24h: Animais analisados após 24 horas de inoculação do patógeno.

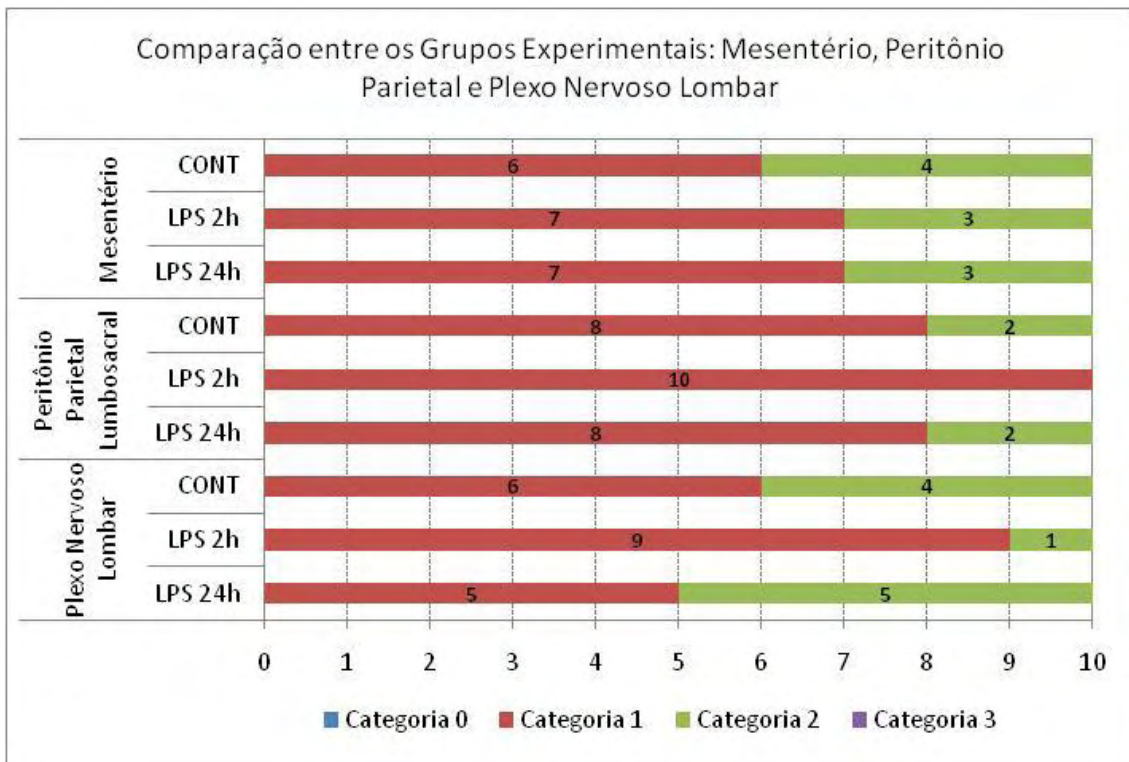


Figura 7: Análise comparativa da pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* inoculados com LPS de *Escherichia coli*, mesentério, peritônio parietal e plexo nervoso lombar. CONT: Animais do grupo controle; LPS 2h: Animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno; LPS 24h: Animais analisados após 24 horas de inoculação do patógeno.

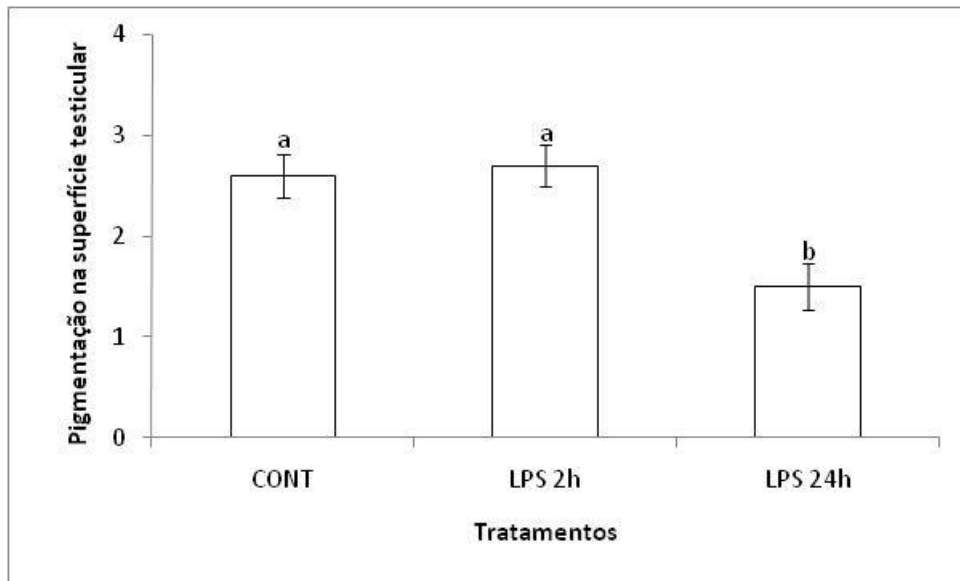


Figura 8: Diferenças nas categorias de pigmentação presentes na superfície testicular nos diferentes grupos experimentais. Média \pm Erro padrão. CONT: Animais do grupo controle; LPS 2h: Animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno; LPS 24h: Animais analisados após 24 horas de inoculação do patógeno. Diferentes letras representam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$).

Referências Bibliográficas

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic Development of Melano-Macrophage 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.
- BAGNARA J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. In: Nordlund J. J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R. A.; Ortonne, J-P; eds. **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. New York, Oxford: Oxford University Press, p. 9–40.
- 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.
- 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.
- 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.
- FLORES QUINTANA, C.; RUAS DE MORAES, F. 2001 Respuesta Inflamatoria a la Inoculación de LPS em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Suplementados com Cromo. **Revista de Ictiologia**. v.9, 13-19.
- 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, 178-182.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger** (In Press).
- GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CICERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. v.15, n.1, p. 32-40.
- 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,(1), p. 1-8.
- OLIVEIRA, C.; SANT'ANA, 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 curvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**. Porto Alegre, v.11, n.1, p.39-46.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. 2002. Morphological Observations on the Testes of *Physalaemus curvieri* (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, junho, p.454-460.
- 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.
- ZIERI, R.; TABOGA, S.R.; OLIVEIRA, C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Etereological and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. v.290, p. 795-800.
- 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.; 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.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C., GARCIA-BORRÓN, J.C., FERRER, C. 1998. The Melanogenic System of *Xenopus laevis*. **Archives Histology Cytology**. v.61, p.305-316.

Capítulo 2

Morfologia hepática do anuro *Eupemphix nattereri*

Morfologia hepática do anuro *Eupemphix nattereri*

Lilian Franco-Belussi¹, Lia Raquel de Souza Santos¹, Rodrigo Zieri¹, Carlos Alberto Vicentini², Classius de Oliveira³

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

² Departamento de Ciências Biológicas - UNESP / Bauru - SP.

³ Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Morphology*

Resumo: O arranjo do tecido hepático está diretamente relacionado com características fisiológicas do animal, tais como ectotermia, alimentação e estado reprodutivo. Este estudo visa caracterizar morfológicamente o fígado do anuro *Eupemphix nattereri*, em seus aspectos anatômicos, histológicos e ultraestruturais. Os animais foram coletados, levados ao laboratório, onde foram eutanasiados com benzocaína e seguiram-se os procedimentos para análise do fígado. O fígado é um órgão que se apresenta com formato irregular e ocupa grande parte da cavidade abdominal, possui coloração avermelhada devido à grande vascularização presente nesse tecido. Anatomicamente, encontra-se dividido em três lobos: direito, médio e esquerdo, sendo esses últimos parcialmente unidos no terço inicial; embora a subdivisão em lóbulos não seja verificada. Externamente é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo a qual é responsável por conferir sustentação e proteção ao tecido. O parênquima hepático é formado por duas camadas de hepatócitos, com formato poliédrico, dispostos em um arranjo cordonal duplo. Entremeados a esses cordões encontram-se os sinusóides hepáticos os quais variam muito em tamanho e estão intimamente associados aos hepatócitos. Entre os cordões hepáticos, também foram observados a presença de células do sistema imunológico, os melanomacrófagos, além de canalículos biliares. Esses canalículos possuem a superfície revestida por microvilos curtos, os quais se projetam para o lúmen. Os melanomacrófagos são células que possuem em seu interior substâncias pigmentares tais como melanina, hemosiderina e lipofuscina, as quais se acumulam decorrente do metabolismo hepático e contribuem para a coloração típica do órgão. No citoplasma do hepatócito é observada elevada quantidade de mitocôndrias, e outras organelas bem desenvolvidas como complexo de Golgi e retículo endoplasmático liso, além de grande quantidade de glicogênio.

Palavras chave: Fígado, *Eupemphix nattereri*, Hepatócito.

Introdução

O fígado é um órgão único para o subfilo vertebrata, possuindo pouca variação entre as classes. É a maior glândula do corpo, apresenta suas funções relacionadas com o metabolismo de carboidratos e gorduras, produção e remoção de células sanguíneas, eliminação de substâncias tóxicas, além da produção da bile (HILDEBRAND, 1995).

O arranjo do tecido hepático está diretamente relacionado com características fisiológicas do animal, tais como ectotermia e estado reprodutivo (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

Em anuros, esse órgão apresenta-se com lobulações, geralmente duas; em salamandras são alongados e às vezes emarginados; enquanto em cecílias são fortemente alongados e pouco emarginados (DUELLMAN e TRUEB, 1994).

Os hepatócitos apresentam-se com arranjo típico em muralha na maioria dos vertebrados, podendo ter espessura de uma ou duas camadas de células (ELIAS, 1955). Em peixe *Leporinus macrocephalus* o arranjo dos hepatócitos foi descrito como lâminas de duas células sobrepostas, circundadas por sinusóides, sendo esse arranjo denominado muralha dupla (BOMBONATO, *et al.* 2007). Em anuros o arranjo típico descrito é o tubular, em forma de placas, circundados por sinusóides (SPORNITZ, 1975), embora sejam observadas variações nesse arranjo.

A morfologia e arranjo do tecido hepático é bastante variável entre as espécies em virtude da fisiologia do animal, assim, esse trabalho visa descrever esse tecido em machos de *Eupemphix nattereri*, durante o período reprodutivo.

Metodologia

Foram analisados 10 espécimes adultos de *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae), coletados na região de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil (RAN/IBAMA/MMA 18573-1). Os animais foram levados ao laboratório de Anatomia Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde foram eutanasiados com benzocaína (0,5g/500mL de água) e seguiram-se os procedimentos para análise do fígado (70/07 – CEEA).

Os animais foram colocados em decúbito dorsal, a fim de permitir a exposição da cavidade abdominal, por meio de incisão desde a altura da cintura pélvica até a altura da cintura escapular. O fígado foi retirado, pesado em balança analítica com precisão 0,05g, fragmentos do órgão foram fixados em solução fixadora Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 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 2 µm foram corados com Hematoxilina-eosina e Azul de toluidina, e observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280).

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

Resultados

O fígado do anuro *Eupemphix nattereri* é um órgão que apresenta formato irregular e ocupa grande parte da cavidade abdominal, tendo um índice hepatossomático médio de $1,37\% \pm 0,25$ para macho adultos durante o período reprodutivo. Localiza-se ventralmente e, desta maneira, recobre os demais órgãos da cavidade, exceto o coração (Figura 1A). Possui coloração avermelhada devido à grande vascularização presente nesse tecido, a qual é inerente à atividade fisiológica do órgão (Figura 1). Apresenta grande mobilidade e se molda aos órgãos mais fixos, notando-se as depressões cardíaca e da vesícula biliar na face mediastínica dorsal do órgão. Apesar da sintopia com os pulmões, e por estes serem vesiculares, não há impressões anatômicas no fígado.

Anatomicamente, o fígado nessa espécie encontra-se dividido em três lobos, identificados como lobo direito, lobo médio e lobo esquerdo, sendo esses últimos parcialmente unidos no terço inicial; embora a subdivisão em lóbulos não seja verificada. Os lobos direito e esquerdo apresentam um ápice cranial que se estende até o sulco átrio-ventricular. Sendo que os lobos esquerdo e médio ocupam o antímero esquerdo do corpo do animal. Disposto no antímero direito estão o lobo hepático direito e a vesícula biliar, cujo volume quando em estado de plenitude tem o volume do lobo médio, e de modo compensatório está deslocada para o antímero direito. A vesícula biliar está localizada intimamente associada à face dorsal pela desembocadura dos ductos, entre os lobos direito e o médio, em sintopia com o ápice cardíaco, possui formato esférico, parede fina e transparente, coloração verde escura devido à visualização da bile (Figura 2).

Externamente o fígado é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo a qual é responsável por conferir sustentação e proteção ao tecido (Figuras 3 G, H e I). O parênquima hepático é formado por duas camadas de hepatócitos dispostos em um arranjo cordonal duplo (Figura 3). Entremeados aos hepatócitos encontram-se os sinusóides hepáticos os quais

variam muito em tamanho. Não foram observados estruturas em tríades, a qual é caracterizada pela presença de artérias e veias hepáticas juntamente com ductos bilíferos. Entre as células próprias do tecido, os hepáticos, também foram observados a presença de componentes celulares oriundos do sistema imunológico, os melanomacrófagos, os quais são células esféricas, que possuem em seu interior substâncias pigmentares tais como melanina, hemosiderina e lipofuscina, as quais se acumulam decorrente do metabolismo hepático e contribuem para a coloração típica do órgão (Figuras 3, 4A e C). São ainda encontrados, entre os hepatócitos, canalículos biliares responsáveis por conduzir a secreção dos hepatócitos até a vesícula biliar, onde será armazenada posteriormente após a drenagem pelos ductos hepáticos (Figuras 4A e C). Esses canalículos biliares possuem a superfície revestida por microvilos curtos, os quais se projetam para o lúmen; é observada a associação de vários hepatócitos a um canalículo (Figuras 4C-F).

Os hepatócitos apresentam-se com formato poliédrico, possuem proporção núcleo citoplasmática grande, onde o núcleo apresenta-se com formato esférico e ocupando posição central da célula. É observada também a presença de um único nucléolo, esférico, localizado centralmente no núcleo, rico em eucromatina (Figuras 3 e 4). No citoplasma é observada elevada quantidade de mitocôndrias e outras organelas bem desenvolvidas como complexo de Golgi e retículo endoplasmático liso, além de grande quantidade de glicogênio (Figuras 4D e F).

Discussão

O fígado de *E. nattereri* localiza-se ventralmente, na cavidade abdominal, possuindo íntima associação com os demais órgãos da cavidade, e, portanto, apresentam sua forma, tamanho e volume também relacionado com essa localização. Possui ainda divisão em três lobos hepáticos, assim como o observado em peixes teleósteos, sendo um central ou mediano

e outros dois laterais, lobo hepático direito e lobo hepático esquerdo (BRUSLÉ e ANADON, 1996; BOMBONATO, *et al.* 2007); essa divisão em lobos é distinta do observado em salamandras, onde há uma massa hepática central, de onde partem três lobos com formato alongado (FRANCIS, 1934), sendo as formas desse órgão dada em função da anatomia corporal dos animais. Não foi observada subdivisão do parênquima hepático em lóbulos no anuro *Eupemphix nattereri*, assim como também relatado para teleósteos (BRUSLÉ e ANADON, 1996), embora essa subdivisão do parênquima em arranjos poliédricos seja descrita para mamíferos (ROMER e PARSONS, 1985). Nesse arranjo lobular cada conjunto de células agrupadas, denominadas lóbulos, é circundado por uma bainha de tecido conjuntivo onde são encontrados três tipos de condutos: ducto biliar, ramos da veia porta-hepática e ramos da artéria hepática (ROMER e PARSONS, 1985), enquanto no anuro *Eupemphix nattereri* os ductos e vasos encontram-se dispersos entre os cordões de hepatócitos, sem estar arranjados conjuntamente em tríades.

A coloração externa do órgão marrom-avermelhada é devido à grande presença de vasos sanguíneos no órgão, podendo essa coloração variar ao amarelado em alguns peixes devido à dieta artificial resultando na acumulação de lipídios. Há relatos também de coloração esverdeada do fígado em peixes durante o desenvolvimento, estando relacionado com a estase biliar (BRUSLÉ e ANADON, 1996). A coloração hepática dos animais analisados apresentam-se semelhante ao descrito para a maioria dos vertebrados.

O índice hepatossomático médio para os machos adultos de *E. nattereri* foi de 1,37%, assemelhando-se ao descrito para Osteichthyes, que é por volta de 1-2%. Embora variações nesse índice sejam verificadas devido a diferenças entre sexos, idade, alimentação, reprodução ou estresse (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

O arranjo dos hepatócitos nessa espécie é do tipo cordonal duplo, onde é observada presença de duas camadas de células. Esse arranjo em camada dupla de célula é relatado para

alguns peixes, em contraste ao observado nos mamíferos onde há predomínio de uma camada celular única (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

O fígado desse anuro apresenta anatomia semelhante ao relatado para peixes, sendo dividido em três lobos, embora não apresente subdivisão em lóbulos. Histologicamente o arranjo dos hepatócitos é cordonal duplo e possuem associação com melanomacrófagos e canalículos biliares. Devido à intensa atividade metabólica dessas células, é observada grande quantidade de organelas como mitocôndrias e complexo de Golgi.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Diogo Borges Provete pela revisão e sugestões ao manuscrito e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lilian Franco Belussi (Proc. 2008/52389-0).

Figuras

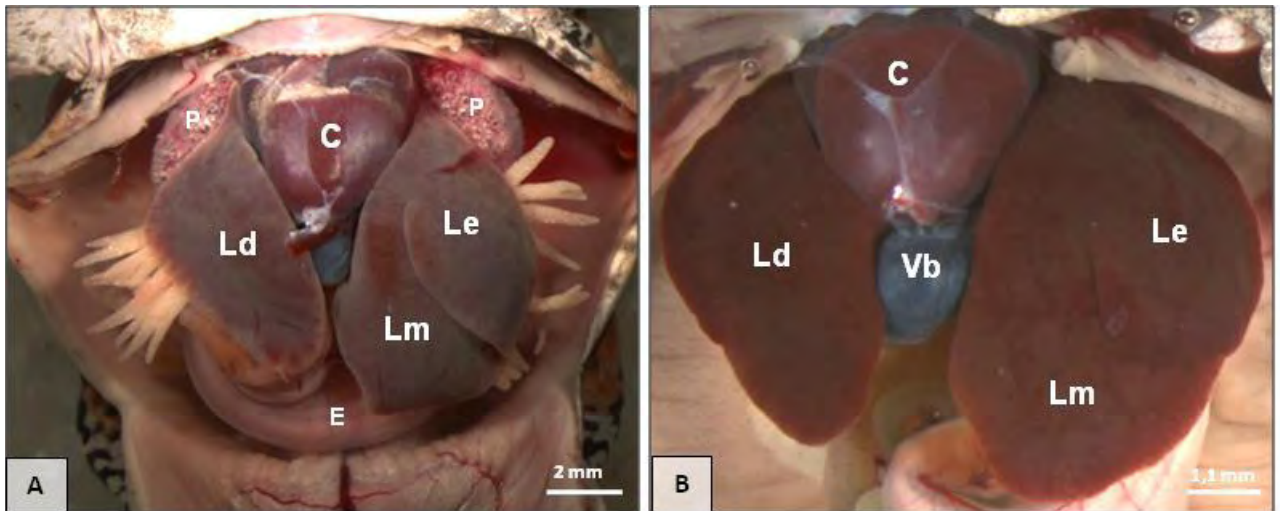


Figura 1: Vista ventral da cavidade abdominal do anuro *Eupemphix nattereri* evidenciando a localização do fígado, bem como sua sintopia com os demais órgãos. C: Coração; Ld: Lobo direito; Le: Lobo esquerdo; Lm: Lobo médio; P: Pulmão; Vb: Vesícula biliar.

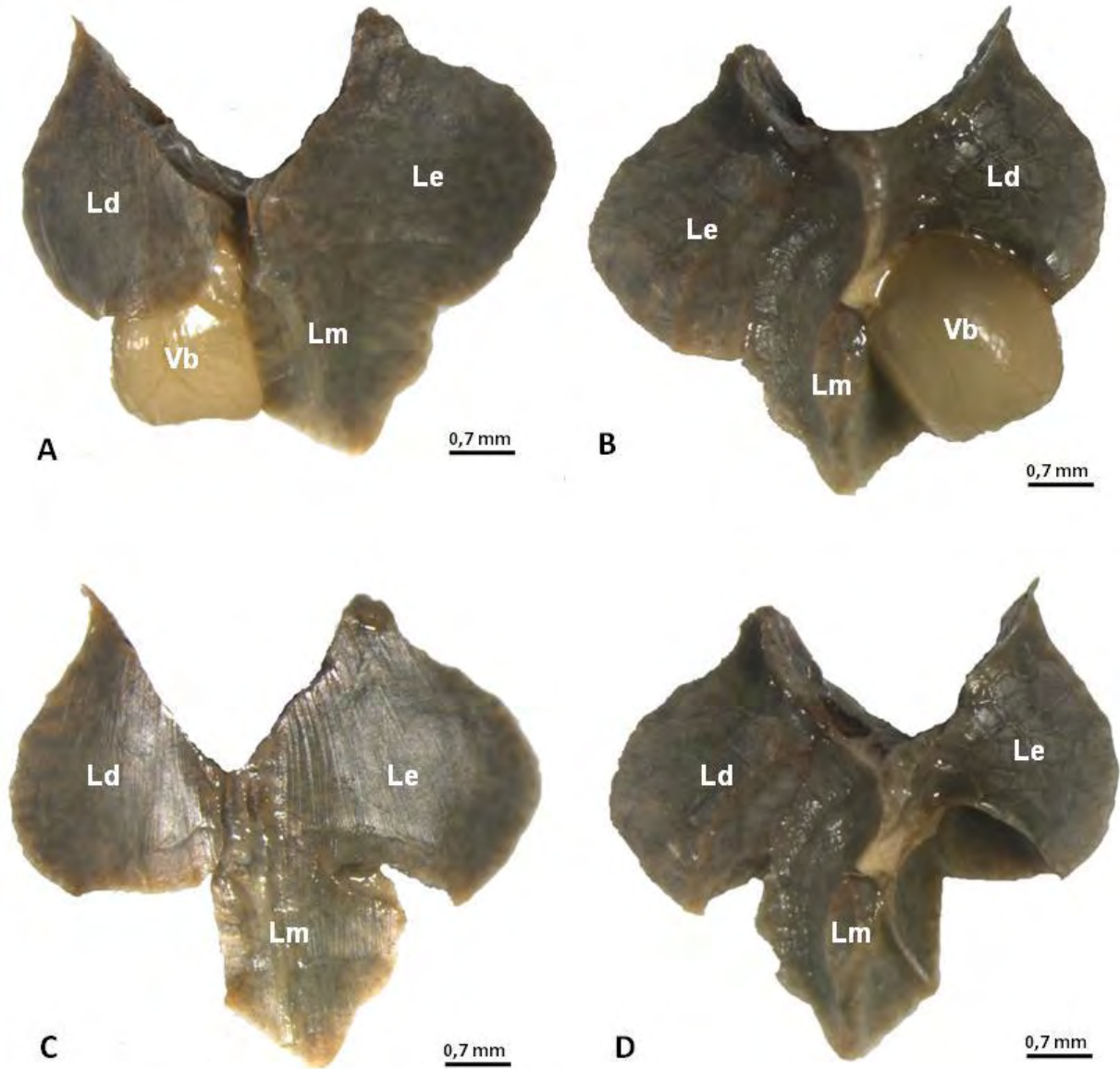


Figura 2: Morfologia externa do fígado do anuro *Eupemphix nattereri*. A e C – Vista ventral do órgão mostrando a localização da vesícula biliar e sua ausência, respectivamente. B e D – Vista dorsal do fígado evidenciando a localização da vesícula biliar, bem como a sua ausência, respectivamente. C: Coração; Ld: Lobo direito; Le: Lobo esquerdo; Lm: Lobo médio; P: Pulmão; Vb: Vesícula biliar.

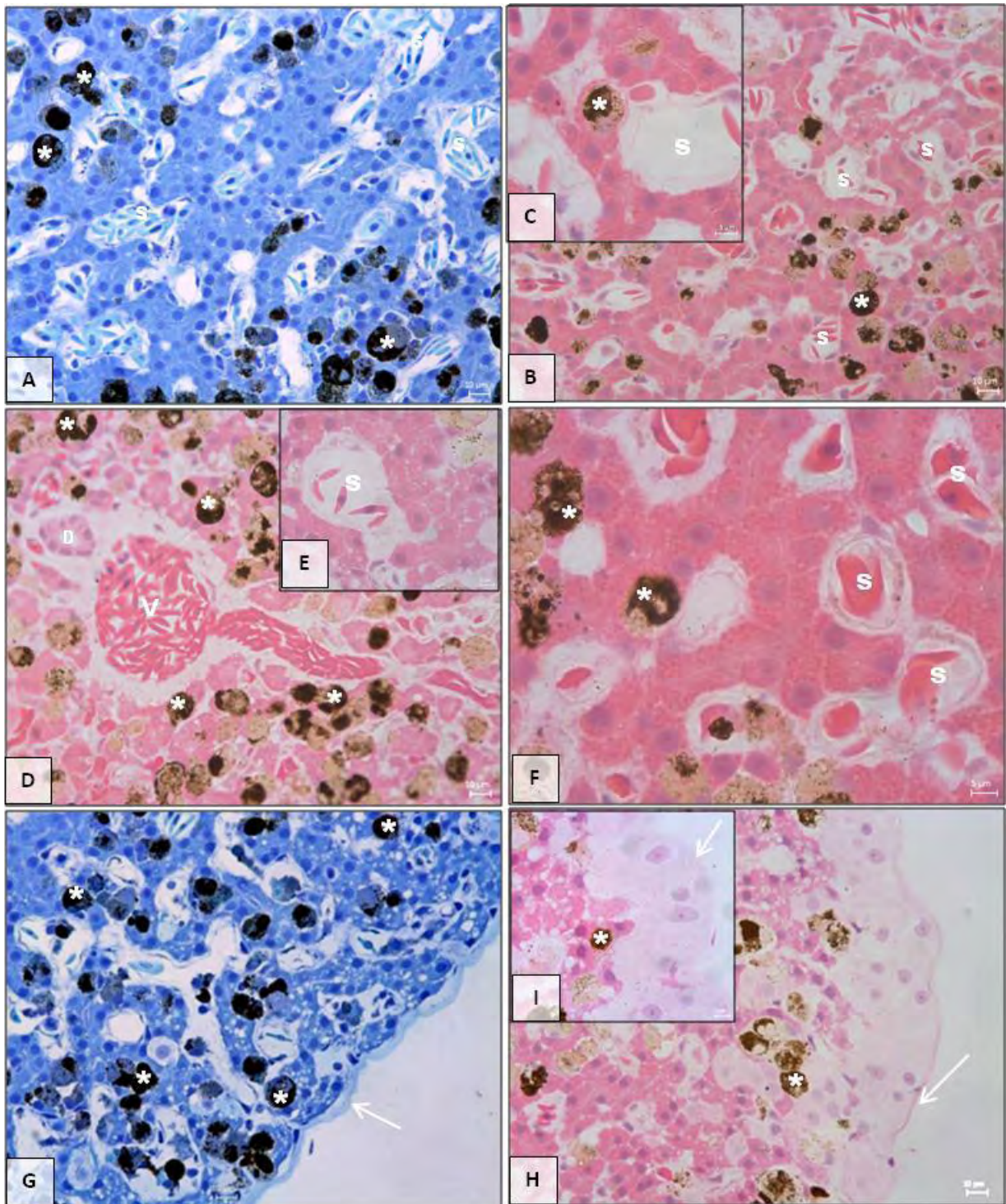


Figura 3: Fotomicrografia do tecido hepático do anuro *Eupemphix nattereri* evidenciando a disposição cordonal dupla dos hepatócitos, sendo estes circundados por sinusóides (s), é também verificada a presença de melanomacrófagos (*) entremeados aos hepatócitos. Revestindo o órgão externamente há uma cápsula de tecido conjuntivo (Seta – Figuras G,H e I) D: Ductuolo biliar; S: Sinusóide; V: Vaso sanguíneo. Coloração: A e G – Azul de Toluidina; B,C,D,E,F,H e I – Hematoxilina-eosina. Barras: A,B,D,G e H – 40µm; C,E,F e I: 5µm.

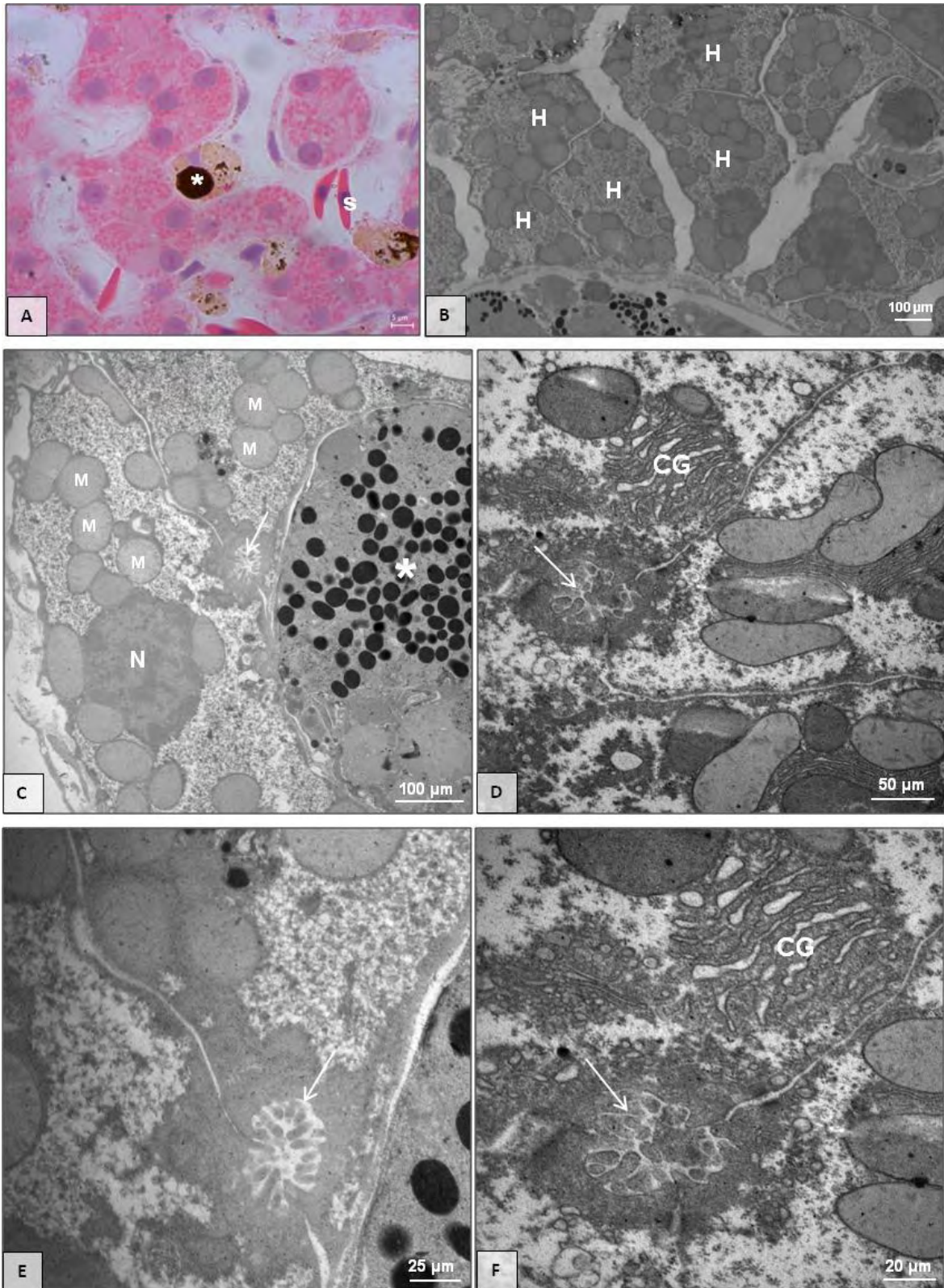


Figura 4: A – Fotomicrografia do tecido hepático mostrando o arranjo cordonal dos hepatócitos, bem como sua associação com os melanomacrófagos (*) e sinusóides (S). Coloração: HE. Barra: 5µm. B, C, D, E e F – Eletromicrografia do fígado demonstrando o arranjo cordonal duplo dos hepatócitos (H) (Fig.B), bem como associação entre os tipos celulares (Fig.C). É observada presença de grande quantidade de mitocôndrias (M) no interior dos hepatócitos, sendo observado também complexo de Golgi desenvolvido (CG). Há ainda presença a de canaliculos biliares (seta) em associação com os hepatócitos.

Referências Bibliográficas

- BOMBONATO, M.T.S.; ROCHEL, S.S.; VICENTINI, C.A.; VICENTINI, I.B.F. 2007. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Science**. v. 29, 1, 81-85.
- BRUSLÈ, J.; ANADON, G.G. 1996. The Structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Ed.). **Fish morphology horizon of new research**. Lebanon: Science Publishers Inc. p. 77-93.
- COTTA-PEREIRA G, RODRIGO FG, DAVID-FERREIRA JF. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde um the study of elastic related fibers. **Stain Technol.** 51: 7-11.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill. 670p.
- ELIAS, H. 1955. Liver morphology. **Biological Reviews**. v.30, 3, 263-310.
- FRANCIS, E. T. B. 1934. **The anatomy of the salamander**. Oxford: Clarendon Press. 478p.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da Estrutura dos Vertebrados**. 3ª ed. Atheneu, São Paulo. 700p.
- ROMER, A.S. & PARSONS, T.S. 1985. Anatomia comparada dos vertebrados. Atheneu, São Paulo, 559 p.
- SPORNITZ, U. M. 1975. Studies on liver of *Xenopus laevis*. I. The ultrastructure of the parenchymal cell. **Anatomy and Embryology**. v.146, p.245-264.
- VENABLE JH, COGGESHALL R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 25: 407-408.
- WATSON ML. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of biophysical and biochemical cytology**. 4: 475-478.

Capítulo 2

Efeitos do processo inflamatório na pigmentação hepática do anuro *Eupemphix nattereri*

Efeitos do processo inflamatório na pigmentação hepática do anuro *Eupemphix nattereri*

Lilian Franco-Belussi¹, Amílcar Sabino Damazo², Classius de Oliveira³

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

² Faculdade de Ciências Médicas - UFMT/ Cuiabá - MT

³ Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Experimental Zoology*.

Resumo: Vertebrados ectotérmicos possuem um sistema pigmentar extracutâneo bem desenvolvido. Em órgãos com funções hematopoéticas, as células pigmentadas apresentam com atividade fagocítica, sendo no fígado essas células caracterizadas como melanomacrófagos, possuindo diversas substâncias pigmentares em seus citoplasmas, além da melanina. Dentre elas a hemosiderina, resultante da degradação da hemoglobina dos eritrócitos e a lipofuscina, oriunda da peroxidação de lipídios poliinsaturados. Esse estudo visa avaliar as respostas das células pigmentares hepáticas do anuro *Eupemphix nattereri* frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por *Escherichia coli*. Para tanto, foram realizadas análises morfológicas, estereológicas e histoquímicas a fim de avaliar mudanças na quantidade e presença de substâncias pigmentares que ocorrem nesse tipo celular, no fígado. Para o estudo, foram utilizados 10 machos adultos de *Eupemphix nattereri*, os quais foram inoculados intraperitonealmente com dose única de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, sendo eutanasiados e analisada a pigmentação hepática após 2 e 24 horas de inoculação do patógeno. Para o controle 5 animais foram inoculados com solução fisiológica estéril. Melanomacrófagos são observados no tecido hepático, entremeados aos cordões de hepatócitos, preferencialmente localizados próximo a vasos sanguíneos. Há um aumento na pigmentação presente no fígado dos animais inoculados com o patógeno e analisados após 24h. É também observada a presença de hemosiderina e lipofuscina no interior do melanomacrófago. A quantidade de hemosiderina não varia de acordo com o estado patológico do animal, enquanto a quantidade de lipofuscina diminui em animais analisados após 24 horas. Esses resultados confirmam a presença de três diferentes substâncias pigmentares, no interior dos melanomacrófagos presentes no fígado, a melanina, a hemosiderina e a lipofuscina. Entretanto, essas três substâncias respondem diferentemente frente à inoculação do patógeno.

Palavras chave: Melanomacrófagos, Fígado, Anura, Infecção, Hemosiderina, Lipofuscina.

Introdução

Os anfíbios, junto com os demais vertebrados ectotérmicos, compartilham a existência de um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos (GALLONE *et al.*, 2002); dentre eles fígado, baço, rins, peritônio, pulmão, coração, vasos sanguíneos, timo, gônadas e meninges (FRANCO-BELUSSI, *et al.* 2009 e 2010; MORESCO e OLIVEIRA, 2009; ZIERI *et al.* 2007; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; GALLONE *et al.*, 2002; ZUASTI *et al.*, 1998; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; ZUASTI *et al.*, 1990; AGIUS e AGBEDE, 1984; AGIUS, 1980).

Em órgãos com função hematopoéticas, essas células apresentam atividade fagocítica, semelhantes à macrófagos (AGIUS, 1980), sendo originadas de células tronco hematopoéticas (SICHEL *et al.*, 1997), essas células freqüentemente se agregam formando nódulos pigmentados denominados de centros de melanomacrófagos (AGIUS, 1981). Esses centros são constituintes do sistema fagocitário mononuclear, possuindo funções relativas à sua estrutura e fisiologia. A principal função está relacionada com 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); atuando ainda na resistência contra patógenos bacterianos e esporos parasitas (ROBERTS, 1975); sua ação também está relacionada com a estocagem do ferro após a eritrofagocitose (AGIUS e ROBERTS, 2003). Os melanomacrófagos possuem em seu interior, substâncias pigmentares como melanina, lipofuscina e hemosiderina, as quais são derivadas da degradação de material celular fagocitado (HERRÁEZ e ZAPATA, 1991; AGIUS e AGBEDE, 1984).

A melanina é um polímero complexo que pode absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular

fagocitado (ZUASTI *et al.*, 1989). É importante para os ectotérmicos contra componentes bacterianos devido à ação da hidrogeno-peroxidase e suas quinonas precursoras, as quais agem como bactericida, favorecendo as atividades enzimáticas, que podem ser restritas em baixas temperaturas (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996). A hemosiderina é um composto de ferro e proteínas derivadas do catabolismo da hemoglobina dos eritrócitos e conseqüentemente um produto metabólico intermediário que ocorre durante a reciclagem dos componentes na eritropoiese (KRANS, 1989). Já a lipofuscina é resultante da polimerização oxidativa de ácidos graxos polinsaturados, sendo acumulado em peixes como resultado de dietas alimentares deficientes (PICKFORD, 1953).

O papel funcional das células pigmentares nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos ainda não está definido, havendo várias hipóteses (GALLONE *et al.*, 2002), dentre elas, funções citoprotetoras relacionadas aos radicais livres (MCGRAW, 2005) e processos de detoxificação por poluentes (FENOGLIO *et al.*, 2005); sendo ainda demonstrado um aumento na quantidade de melanina no fígado, conjuntamente com modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *Rana esculenta* durante o inverno (BARNI *et al.*, 1999). Ainda com relação ao fígado, o aumento da pigmentação pode estar relacionado com a hemocaterese (KALASHNIKOVA, 1992; CÍCERO *et al.*, 1977); e em salamandras, a ativação da melanogênese hepática pode estar relacionada com a hipóxia (FRANGIONI *et al.*, 2000); já com relação aos centros de melanomacrófagos em peixes, o aumento de pigmentos melânicos tem sido relacionado com patologias (ROBERTS, 1975).

Este trabalho visa avaliar os efeitos do processo inflamatório induzido experimentalmente por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na pigmentação hepática do anuro *Eupemphix nattereri*, quanto à área pigmentada e quantidade de substâncias pigmentares presentes.

Metodologia

Para o estudo, foram utilizados 15 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto – SP, em época de atividade reprodutiva (Janeiro e Fevereiro / 2008) (RAN/IBAMA/MMA 18573-1).

Os animais do grupo experimental (n=10) foram inoculados via intraperitonal com dose única de 3 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, Serotype 0127:B8 (Sigma, St. Louis, MO) (adaptado de FLORES QUINTANA e RUAS DE MORAES, 2001) diluído em solução fisiológica estéril (0,02 mL). Para o controle, 5 animais foram injetados com solução fisiológica estéril, na mesma quantidade.

As respostas celulares foram avaliadas 2 horas (LPS 2h) após as inoculações a fim de observar a ativação das células residentes nos tecidos, e 24 horas (LPS 24h) após a inoculação para observar a ativação do sistema imune inato e migração de células circulantes do sangue periférico.

O manuseio experimental e eutanásia dos animais seguiram recomendações do comitê de ética da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, seguindo o *Guia de cuidados e uso de animais em laboratório* (70/07-CEEA). Decorridos os tempos experimentais os animais foram anestesiados e eutanasiados com o anestésico benzocaína (0,5 g/500 mL de água), foram pesados, e a cavidade abdominal foi exposta por meio de incisão mediana desde a cloaca até a altura da cintura dos membros dianteiros. O fígado foi retirado, pesado em balança analítica de precisão (0,05g) e seguiram-se os procedimentos para inclusão e análise do órgão.

Para as análises morfológicas e histoquímicas fragmentos de fígado 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 2 µm foram obtidas em micrótomo (RM 2265, Leica, Suíça). Os cortes foram observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280).

Para as análises estereológicas os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e a quantificação da pigmentação foi realizada com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 4.5) de acordo com a proposta de Lehr (1997), com adaptações, a qual se baseia na diferença de intensidade de coloração para quantificar a expressão de receptores hormonais.

Para a detecção da lipofuscina, os cortes histológicos de fígado foram incubados por 15 min em solução de Schmorl, composta de 75 mL de cloreto férrico a 1%, 10 mL de ferricianeto de potássio e 15ml de água destilada, posteriormente foram imersas em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina 1% . Para detecção da hemosiderina, os cortes foram incubados pelo mesmo tempo, em solução ácida de ferrocianídeo, obtido com a dissolução de 2g de ferrocianeto de potássio em 100 mL de solução de ácido clorídrico a 0,75 mol/L. Posteriormente foram imersas em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina a 1% .

As diferenças nas quantidades das substâncias pigmentares presentes nos tratamentos experimentais foram analisadas por meio de análise de variância; ANOVA: Um critério quando os dados foram paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, nesse caso, anteriormente os dados foram transformados com a utilização da Raiz Quadrada. Para análise de correlação, foi utilizado Coeficiente de Correlação de Pearson pra dados paramétricos e Coeficiente de Correlação de Spearman para dados não paramétricos.

Resultados

Os melanomacrófagos foram observados entremeados às células próprias do tecido, mais especificamente entre os cordões de hepatócitos; apresentando localização preferencial próximo aos sinusóides (Figura 1), além de íntima associação com os hepatócitos. A pigmentação hepática variou de acordo com o estado patológico do animal (Kruskal-Wallis: $H= 16,81$; $p < 0,01$), sendo observado um aumento dessa pigmentação em animais inoculados com patógeno e analisados após 24 horas (LPS 24h) (Figuras 2 e 3). A pigmentação hepática está negativamente correlacionada com o peso do órgão em animais analisados após 2 horas da administração do componente da parede bacteriana, não estando correlacionado nos outros grupos (Controle e LPS 24h) (Correlação de Pearson: CONT: $r = -0,79$; $p = 0,11$; LPS 2h: $r = -0,94$; $p = 0,02$; LPS 24h: $r = -0,65$; $p = 0,23$) (Apendice 1).

A presença de hemosiderina, substância oriunda da estocagem, realocação e reciclagem de compostos derivados do ferro, também foi detectada no fígado, localizada nos melanomacrófagos juntamente com outras substâncias pigmentares, tais como a melanina (Figura 4). Embora não foram encontradas variações dessa substância em animais inoculados com o patógeno (Kruskal-Wallis: $H = 1,71$; $p = 0,42$) (Figuras 5 e 6), como o observado para melanina, demonstrando que essa substância pigmentar não varia conforme o estado patológico do organismo. Entretanto, a quantidade de hemosiderina está negativamente correlacionada com o peso do fígado nos animais dos grupos tratados (LPS 2h e LPS 24h) (Correlação de Pearson: LPS 2h: $r = -0,93$; $p = 0,02$; LPS 24h: $r = -0,99$; $p = 0,00$) (Apêndice 2 – Figuras 2 e 3). Já nos animais do grupo controle essa correlação não é verificada (Correlação de Pearson: $r = -0,66$; $p = 0,23$) (Apêndice 2 – Figura 1).

A quantidade de hemosiderina não está correlacionada com a quantidade de melanina em nenhum dos grupos experimentais (Correlação de Pearson: CONT: $r = 0,72$; $p = 0,17$; LPS

2h: $r= 0,86$; $p= 0,06$; LPS 24h: $r= 0,70$; $p= 0,18$), demonstrando que as duas substâncias respondem diferentemente à inoculação do patógeno (Apêndice 3).

A lipofuscina, substância oriunda da degradação de ácidos graxos poliinsaturados, também se encontra no interior dos melanomacrófagos presentes no fígado, juntamente com outras substâncias pigmentares (Figura 7). Há diminuição dessa substância nos animais inoculados com o patógeno e analisados após 24 horas (Kruskal-Wallis: $H= 30,47$; $p< 0,0001$) (Figuras 8 e 9). A quantidade dessa substância está negativamente correlacionada com o peso do fígado nos animais do grupo LPS 24h (Correlação de Pearson: $r= -0,97$; $p= 0,00$), onde há uma diminuição na quantidade de lipofuscina quanto maior o peso do órgão (Apêndice 4 – Figura 3). Já nos animais dos grupos controle e LPS 2h essas variáveis não estão correlacionadas (Correlação de Pearson: CONT: $r= -0,66$; $p= 0,23$; LPS 2h: $r= -0,83$; $p= 0,08$) (Apêndice 4 – Figuras 1 e 2).

A quantidade de melanina possui uma correlação positiva com a quantidade de lipofuscina no grupo LPS 2h (Correlação de Pearson: $r= 0,90$; $p= 0,04$) (Apêndice 5 – Figura 2). Já no grupo LPS 24h e no grupo controle não é verificada correlação na quantidade dessas duas substâncias (Correlação de Pearson: CONT: $r= 0,73$; $p= 0,16$; LPS 24h: $r= 0,62$; $p= 0,26$) (Apêndice 5 – Figuras 1 e 3).

A hemosiderina e a lipofuscina encontra-se no interior dos melanomacrófagos presentes no fígado, sendo ambas resultantes da degradação de substâncias oriundas do metabolismo celular. A quantidade de hemosiderina não está correlacionada com a quantidade de lipofuscina em nenhum dos grupos experimentais (Correlação de Pearson: CONT: $r= 0,48$; $p= 0,42$; LPS 2h: $r= 0,82$; $p= 0,09$; LPS 24h: $r= 0,26$; $p= 0,68$) (Apêndice 6), demonstrando que ambas as substâncias se acumulam de maneira diferenciada frente ao processo infeccioso.

A análise comparativa das três substâncias pigmentares, melanina, hemosiderina e lipofuscina, revelou não haver variação entre elas nos animais do grupo controle (ANOVA Um critério: $F= 2,58$; $p= 0,12$), demonstrando que nesse grupo as quantidades das substâncias pigmentares são equivalentes (Figura 10). Os animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno apresentaram menor quantidade de melanina que hemosiderina e lipofuscina, sendo essas duas equivalentes (Figura 10). Já nos animais analisados após 24 horas de inoculação do patógeno, a quantidade de melanina assemelha-se à quantidade de hemosiderina e difere da quantidade de lipofuscina, sendo a quantidade de hemosiderina e lipofuscina equivalentes também nesse grupo (Figura 10).

Discussão

O lipopolissacarídeo de *E. coli* inoculado intraperitonealmente influencia na quantidade de pigmentação presente no fígado do anuro *E. nattereri*. A pigmentação hepática apresentou aumento após a inoculação intraperitoneal de LPS em um tempo experimental de 24 horas, demonstrando que os melanomacrófagos presentes no fígado, assim como os presentes em outros órgãos hematopoéticos aumentam frente a um processo infeccioso (FLORES QUINTANA e RUAS DE MORAES, 2001). Isso ocorre devido à natureza fagocítica dessas células e seu papel no sistema imunológico, além do fato de estarem presentes várias substâncias pigmentares, as quais conferem proteção ao organismo (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRÁEZ e ZAPATA, 1991). Essa característica de aumento de pigmentação pode estar relacionada à resposta imune do animal contra bactérias gram negativas, uma vez que em *Rana catesbeiana* expostas a aflatoxinas não foi observada variação na pigmentação hepática, embora tenha sido relatado fibrose tecidual e proliferação celular de hepatócitos além de células do ducto bilífero, indicando respostas contra a toxina (GRASSI *et al.*, 2007).

Os melanomacrófagos possuem formato arredondado, apresentando em seu interior grande quantidade de melanosomos agrupados, os quais ocorrem em diferentes graus de maturação (GALLONE *et al.*, 2002). A principal função atribuída é a fagocítica, semelhante aos macrófagos (ZUASTI *et al.*, 1998), desta maneira, está relacionado com a defesa imunológica do organismo, na destruição, detoxificação e reciclagem de produtos oriundos do metabolismo celular, gerando ainda outras substâncias pigmentares, além da melanina, que se acumulam em seu citoplasma, tais como a lipofuscina e hemosiderina, as quais são resultantes do catabolismo celular (AGIUS e AGBEDE, 1984), sendo que a lipofuscina hepática diminui quando os animais são inoculados com LPS de *E. coli*, e analisados após 24 horas.

É descrita ainda a presença de células contendo pigmentos melânicos em outros órgãos da cavidade abdominal dos anuros (FRANCO-BELUSSI *et al.*, 2010; MORESCO e OLIVERIA, 2009), embora apresentem-se com morfologia variada. Nas gônadas são relatadas células pigmentadas na região intersticial, próximo aos vasos sanguíneos, as quais apresentam prolongamentos celulares, além de citoplasma repleto de grânulos pigmentados (OLIVEIRA e ZIERI, 2005); sendo desta maneira caracterizada como melanócitos típicos, assim como as células pigmentadas presentes na epiderme e pulmões, descritas por Zuasti *et al.* (1998), as quais se diferem dos melanomacrófagos encontrados em órgãos hematopoiéticos tanto na morfologia, quanto na função.

A melanina e a lipofuscina hepáticas apresentam-se positivamente correlacionadas nos animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno, já em animais analisados após 24 horas essa correlação não é verificada, uma vez que a melanina aumenta após esse período e a lipofuscina reduz. A infecção por patógenos gera danos estruturais no parênquima do fígado evidenciado alterações morfológicas do órgão, além de fibrose do tecido (GRASSI, *et al.*, 2007), podendo levar a um aumento dos melanomacrófagos, alterando também a composição pigmentar dessas células (AGIUS e AGBEDE, 1984). Há evidências de que a imunidade

inata e a melanização estão associadas genética, bioquímica e funcionalmente, onde a melanina possui um papel na regulação da atividade imunológica da citocina, sendo que, em mamíferos, as primeiras células fagocíticas são os neutrófilos, macrófagos, células de Kupfer, células da micróglia e células dendríticas (MACKINTOSH, 2001). A melanina é um polímero complexo que pode ser acumulado pela fagocitose de grânulos de melanina ou ser sintetizado no interior das células a partir de um aparato celular próprio (AGIUS e ROBERTS, 2003). Esse polímero, quando presente no interior dos macrófagos, é responsável por neutralizar radicais livres resultantes da degradação de ácidos graxos, tais como aqueles gerados da peroxidação dos lipídios insaturados oriundos da degradação de componentes celulares danificados, sendo outro produto dessa peroxidação a lipofuscina (AGIUS e AGBEDE, 1984). Assim, essas substâncias variam em resposta frente à ação do patógeno, uma vez que as células que sofreram injúrias devido à ação patogênica necessitam ser restabelecidas ou degradadas rapidamente, gerando essa cascata de respostas fisiológicas a qual culmina com a produção de melanina e lipofuscina no fígado.

Ao analisar comparativamente o peso do fígado e a porcentagem de área contendo substâncias pigmentares (melanina, hemosiderina e lipofuscina) nesse órgão, foi verificada correlação negativa com a melanina e hemosiderina no grupo experimental analisado após duas horas; e com a lipofuscina em animais analisados 24 horas após a administração do componente da parede de bactérias gram negativas, sendo que a hemosiderina também apresenta essa correlação com o tempo experimental maior.

As três substâncias pigmentares embora sejam encontradas na mesma célula, os melanomacrófaos, apresentam variações em suas quantidades frente ao tratamento experimental, observado pela variação entre os grupos experimentais, e correlação entre os dados biométricos, bem como correlação entre a quantidade dessas substâncias. Ao analisar comparativamente essas três substâncias pigmentares, foi observada variação significativa

apenas entre os grupos tratados. Nos animais analisados após 2 horas de inoculação do patógeno, a variação está na quantidade de melanina em relação aos demais pigmentos; já no grupo experimental analisado após 24 horas, a diferença encontra-se apenas entre a quantidade de melanina e lipofuscina. Assim, é possível concluir que as principais diferenças estão na quantidade de melanina, a qual apresenta um aumento significativo em relação aos demais grupos experimentais. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as quantidades de lipofuscina e hemosiderina nos grupos tratados, nem no grupo controle. A não significância estatística entre as variações na quantidade de melanina, hemosiderina e lipofuscina nos animais do grupo controle demonstra que essas três substâncias apresentam-se seguindo um padrão esperado para o órgão, sendo verificada variação com os tratamentos experimentais.

A pigmentação presente no fígado do anuro *E. nattereri* aumenta quando os animais são inoculados com a endotoxina, sendo também observada variação na quantidade de lipofuscina. Os melanomacrófagos presentes no fígado são células dinâmicas e responsivas a diversos estímulos ambientais. Barni *et al.* (2002) demonstrou aumento da proliferação celular e melanossíntese nessas células em *Rana esculenta*, em um período que precede a hibernação do animal; em contraste ao que ocorre em um período posterior a esta fase, que é caracterizada pela diminuição da pigmentação e melanossíntese. Loumbordis e Vogiatzis (2002) demonstraram aumento da pigmentação hepática em animais expostos ao cádmio; enquanto Fenoglio *et al.* (2005) caracterizam mudanças morfofuncionais no parênquima hepático decorrentes da ação de poluentes, sugerindo ação de detoxificação pelos melanomacrófagos, em decorrência da ação biotransformadora de algumas enzimas e protetora da melanina. Assim, é possível afirmar que os melanomacrófagos presentes no fígado do anuro *E. nattereri* estão relacionados ao papel protetor do tecido contra a ação do LPS de *E. coli*, sendo essa proteção oriunda da melanina.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Diogo Borges Provete pela revisão e sugestões ao manuscrito, ao Msc. Rodrigo Zieri e Msc. Lia Raquel de Souza Santos pela contribuição nas coletas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lilian Franco Belussi (Proc. 2008/52389-0).

Figuras

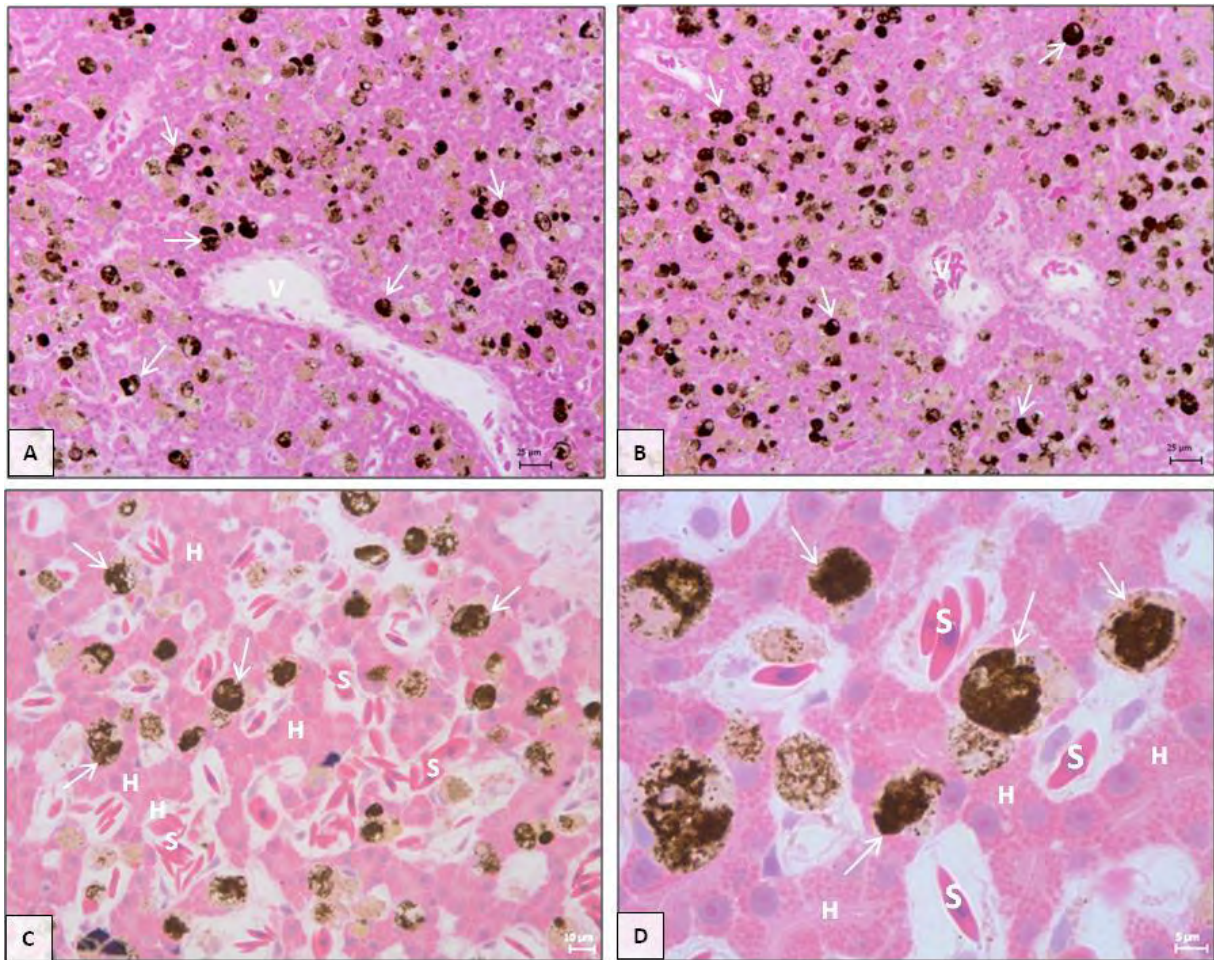


Figura 1: Cortes histológicas de fígado de *Eupemphix nattereri*. Evidenciando a presença de melanomacrófagos (setas) distribuídos entremeados aos hepatócitos. H: Hepatócitos dispostos em arranjo cordonal duplo. S: Sinusóides hepáticos. V: Vasos sanguíneos. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras: 25μm (Figuras A e B); 10 μm (Figura C); 5 μm (Figura D).

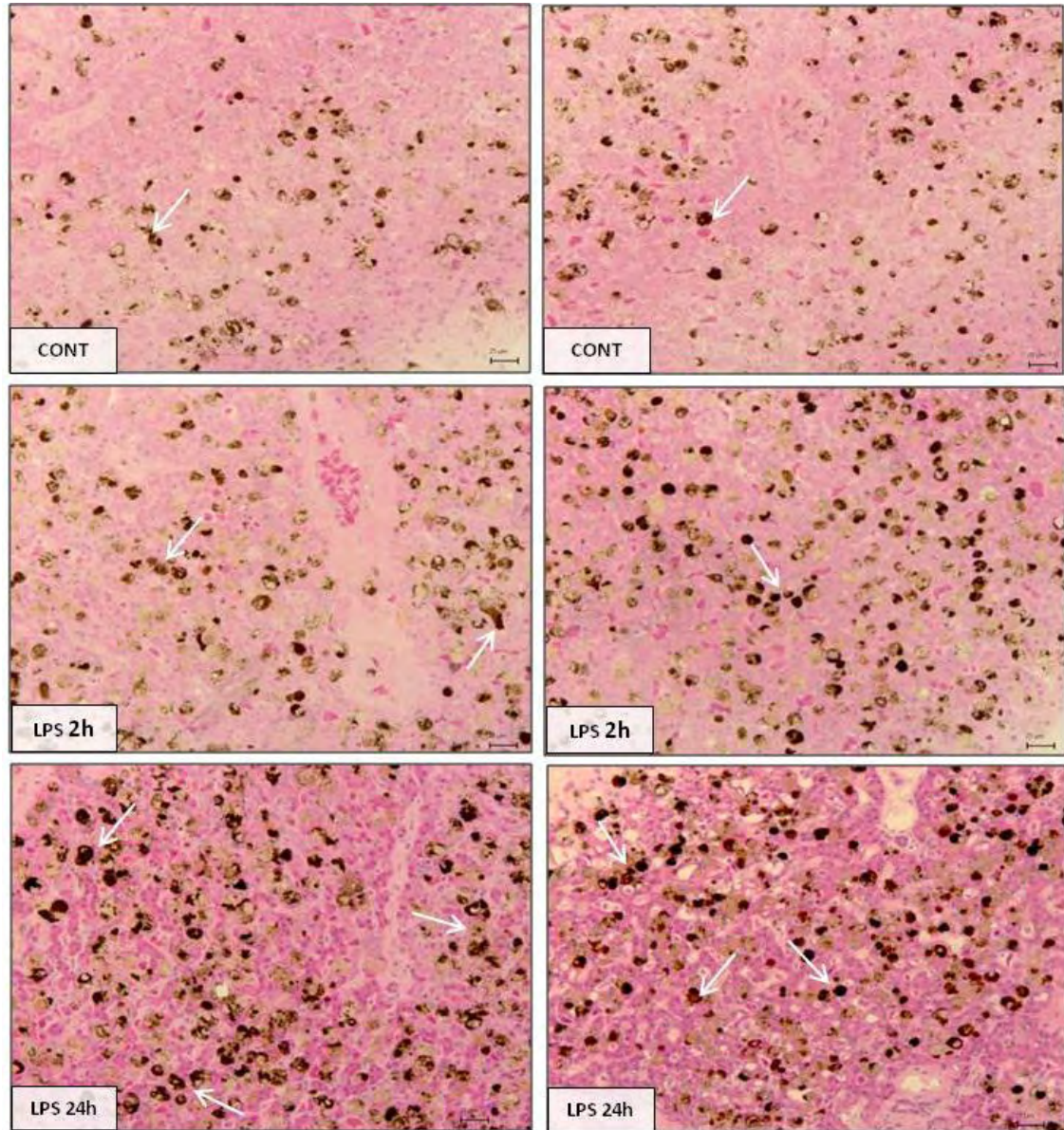


Figura 2: Cortes histológicos de fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. CONT: Controle; LPS 2h: Grupo experimental analisado após 2 horas de inoculação; LPS 24h: Grupo experimental analisado 24 horas após inoculação. Em cada grupo experimental são representados 2 exemplares distintos. Melanomacrófagos (setas) distribuídos entre os cordões de hepatócitos, junto aos sinusóides. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras = 25µm.

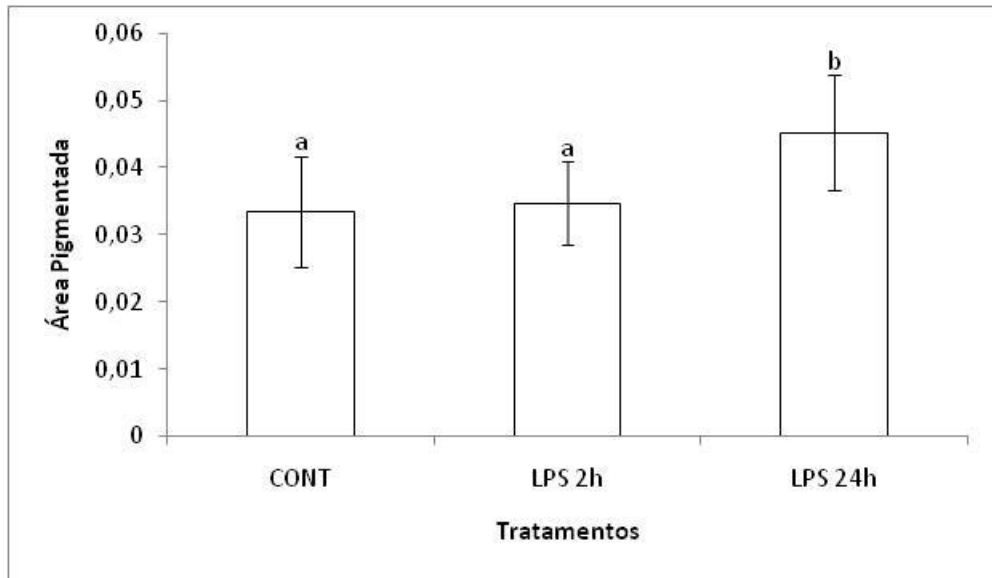


Figura 3: Diferenças na porcentagem de área pigmentada presente no fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS de *E. coli*. Média ± Erro padrão. CONT: grupo controle, LPS 2h: grupo experimental analisado após 2 horas da inoculação, LPS 24h: grupo experimental analisado 24 horas após inoculação do patógeno. Diferentes letras representam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$).

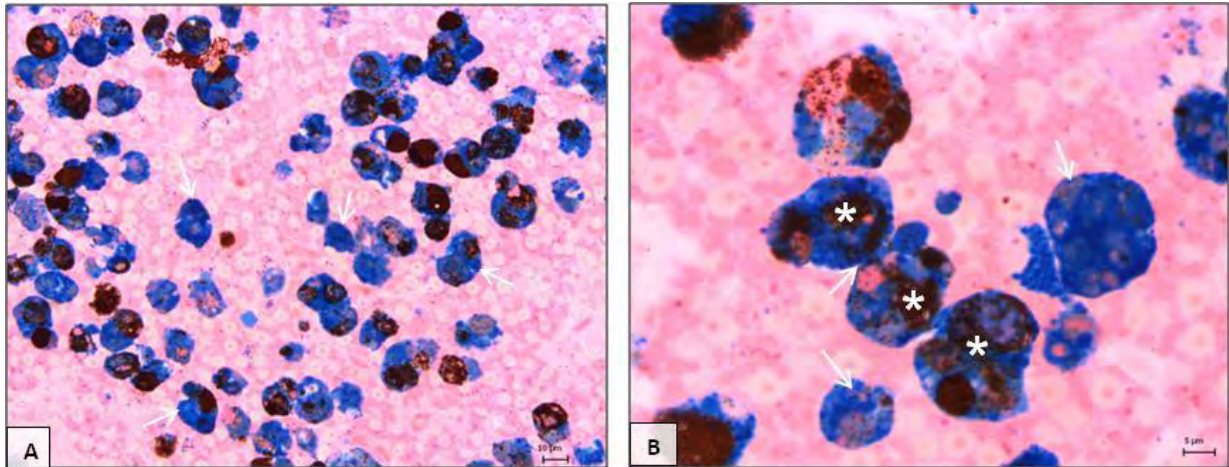


Figura 4: Cortes histológicos de fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. Evidenciando a presença de hemosiderina (setas) nos interior dos melanomacrófagos, juntamente com melanina (*). Coloração: Solução ácida de ferrocianeto, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 10µm (Figura A); 5µm (Figura B).

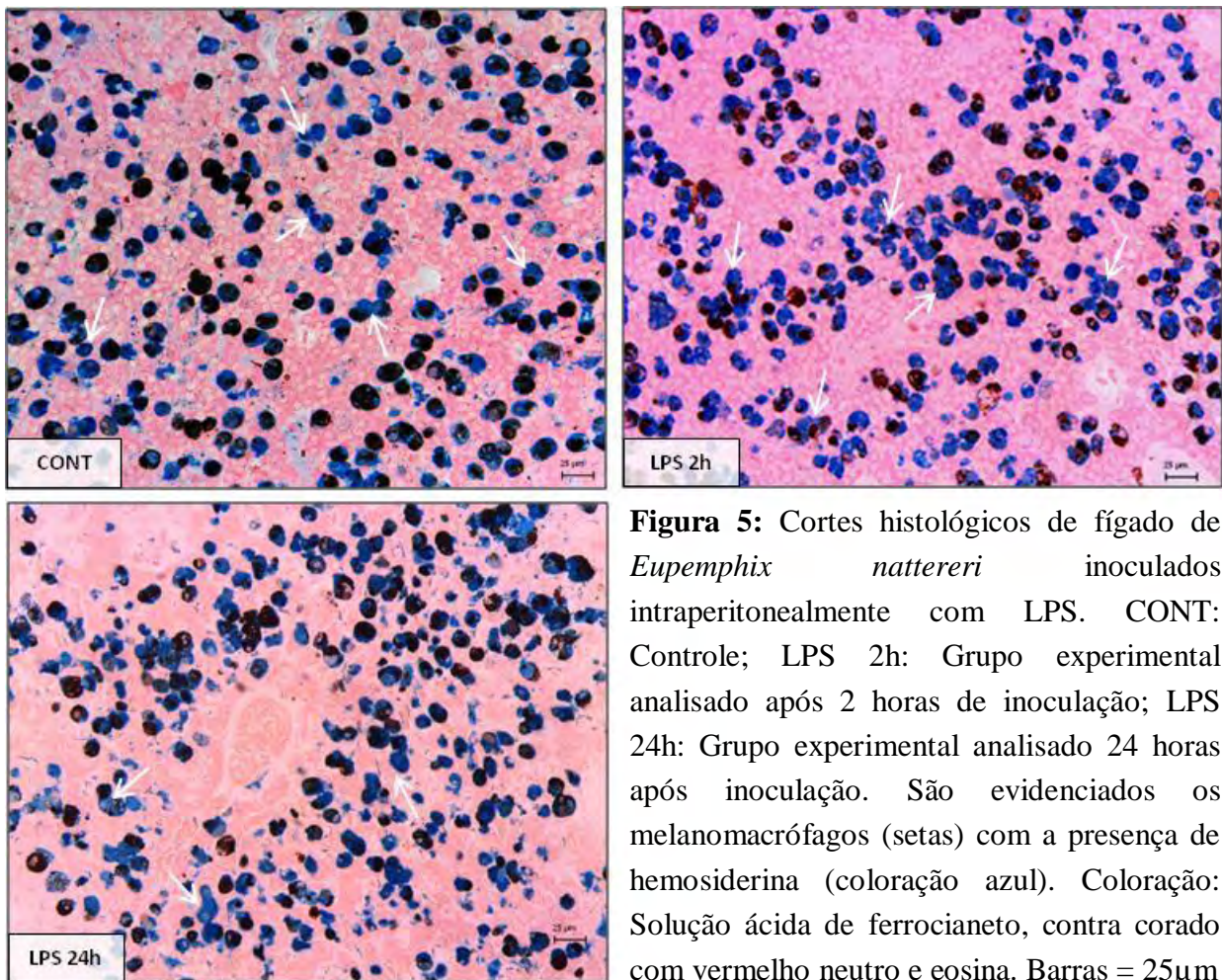


Figura 5: Cortes histológicos de fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. CONT: Controle; LPS 2h: Grupo experimental analisado após 2 horas de inoculação; LPS 24h: Grupo experimental analisado 24 horas após inoculação. São evidenciados os melanomacrófagos (setas) com a presença de hemosiderina (coloração azul). Coloração: Solução ácida de ferrocianeto, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 25µm

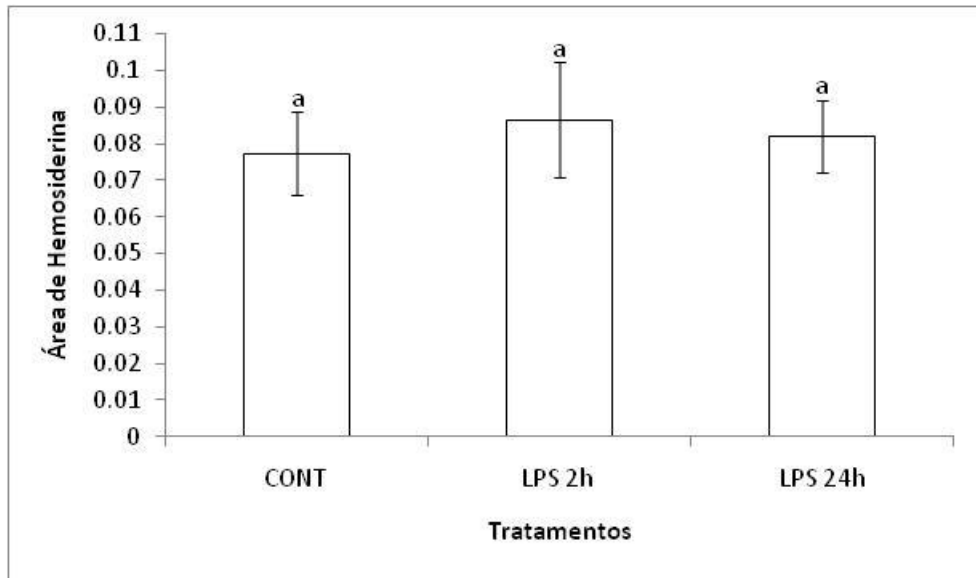


Figura 6: Diferenças na quantidade de hemosiderina presente no fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS de *E. coli*. Média ± Erro padrão. CONT: grupo controle, LPS 2h: grupo experimental analisado após 2 horas da inoculação, LPS 24h: grupo experimental analisado 24 horas após inoculação do patógeno. Letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$).

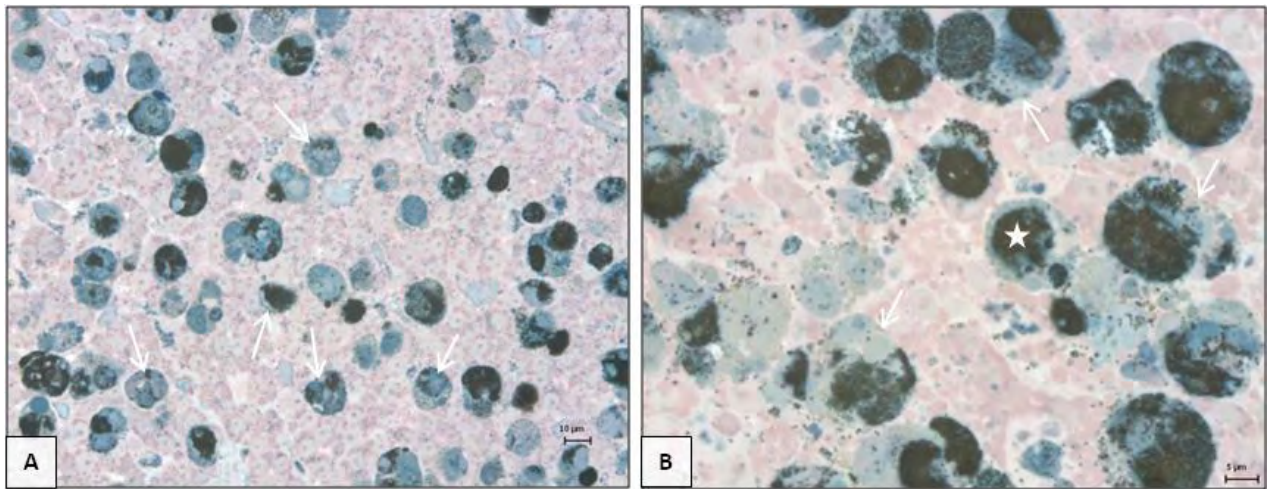


Figura 7: Cortes histológicos de fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. Evidenciando a presença de lipofuscina nos interior dos melanomacrófagos (setas), juntamente com melanina (*). Coloração: Solução de Schmorl, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 10µm (Figura A); 5µm (Figura B).

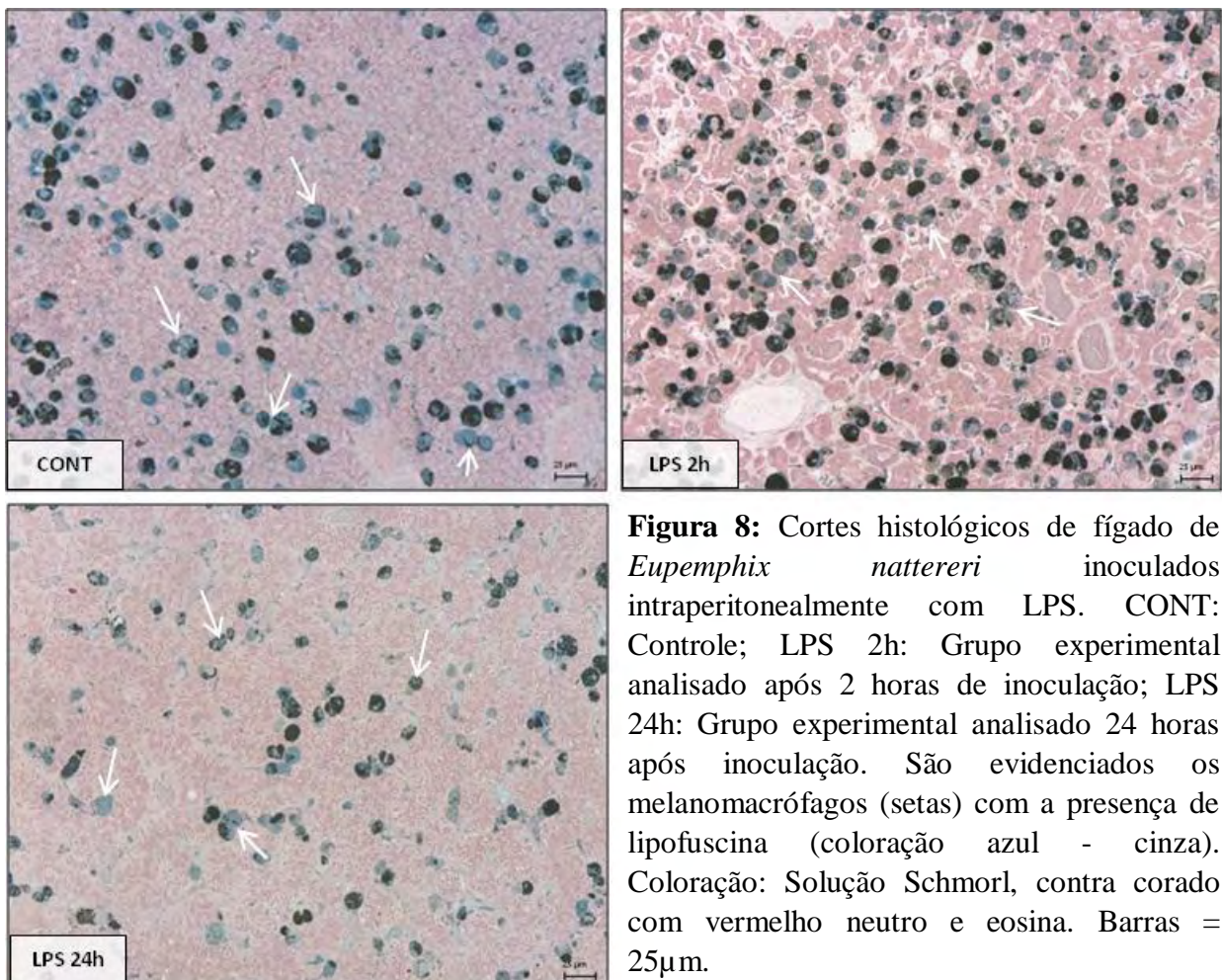


Figura 8: Cortes histológicos de fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. CONT: Controle; LPS 2h: Grupo experimental analisado após 2 horas de inoculação; LPS 24h: Grupo experimental analisado 24 horas após inoculação. São evidenciados os melanomacrófagos (setas) com a presença de lipofuscina (coloração azul - cinza). Coloração: Solução Schmorl, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 25µm.

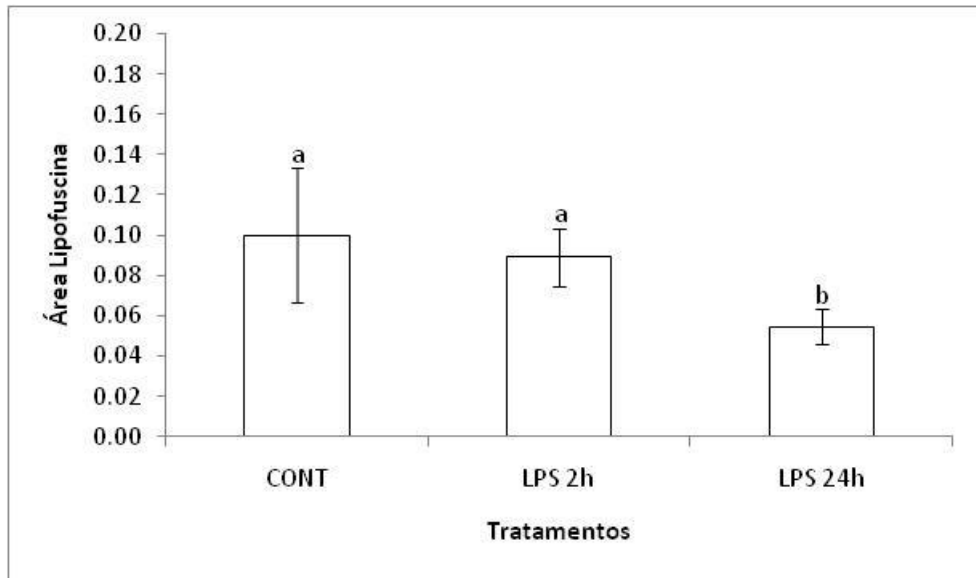


Figura 9: Diferenças na quantidade de lipofuscina presente no fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS de *E. coli*. Média ± Erro padrão. CONT: grupo controle, LPS 2h: grupo experimental analisado após 2 horas da inoculação, LPS 24h: grupo experimental analisado 24 horas após inoculação do patógeno. Diferentes letras representam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$).

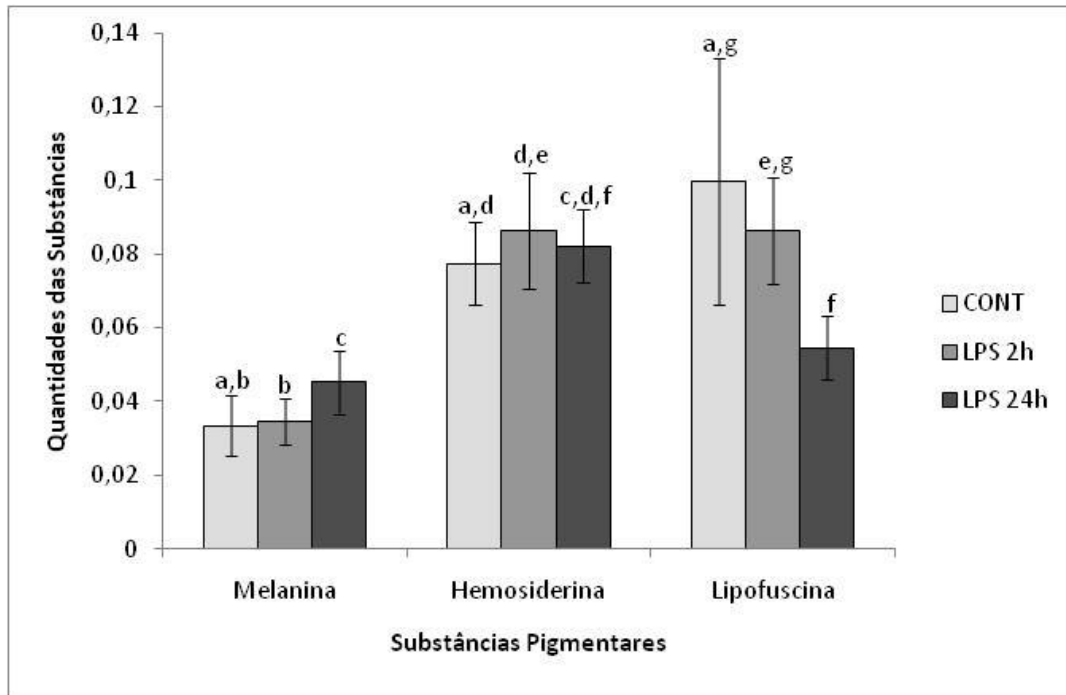


Figura 10: Diferenças nas quantidades das substâncias pigmentares, melanina, hemosiderina e lipofuscina, presentes no fígado de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS de *E. coli*. Média \pm Erro padrão. CONT: grupo controle, LPS 2h: grupo experimental analisado após 2 horas da inoculação, LPS 24h: grupo experimental analisado 24 horas após inoculação do patógeno. Diferentes letras representam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$).

Referências Bibliográficas

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic Development of Melano-Macrophage 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 Patology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.499-509.
- BAGNARA J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. In: Nordlund J. J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R. A.; Ortonne, J-P; eds. **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. New York, Oxford: Oxford University Press, p. 9–40.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- FLORES QUINTANA, C.; RUAS DE MORAES, F. 2001 Respuesta Inflmatoria a la Inoculación de LPS em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Suplementados com Cromo. **Revista de Ictiologia**. v.9, 13-19.
- 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, 178-182.

- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger** (*In Press*).
- FRANGIONI G.; 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.
- GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CICERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. v.15, n.1, p. 32-40.
- GRASSI, T.F.; PIRES, P.W.; BARBISAN, L.F.; PAI-SILVA, M.D.; SAID, R.A.; CAMARGO, J.L.V. 2007. Liver lesions produced by aflatoxins in *Rana catesbeiana* (bullfrog). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.68, p.71-78.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1986. Structure and Function of the Melano-Macrophage 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.
- KALASHNIKOVA, M.M. 1992. Erythrophagocytosis and Pigment Cells of the Amphibian Liver. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v.113, p.82-84.
- KRANZ, H. 1989. Changes in Splenic Melano-Macrophages Centres of Dab, *Limanda limanda* During and After Infection with Ulcer Disease. **Disease of Aquatic Organisms**. v.6, 167-173.
- 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
- LOUMBOURDIS, N.S.; VOGIATZIS, A. K. 2002. Impact of Cadmium on Liver Pigmentary System of the Frog *Rana ridibunda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.53, 52-58.
- 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.
- 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,(1), p. 1-8.
- 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, junho, p.454-460.

- PICKFORD, G.W. 1953. Fish Endocrinology. A Study of the Hypophysectomized Male Killifish, *Fundulus heteroclitus* (L.). **Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection, Yale University**. v.14, p. 5-41.
- ROBERTS, R.J. 1975. Melanin-Containing Cells of Teleost Fish and their Relation to Disease. *In: The Pathology of fishes* (ed. By W.E. Ribelin & G. Migaki). University of Wisconsin Press, Madison, W.I. p. 399-428.
- 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.
- ZIERI, R.; TABOGA, S.R.; OLIVEIRA, C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Etereological and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. v.290, p. 795-800.
- 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.; 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.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C., GARCIA-BORRÓN, J.C., FERRER, C. 1998. The Melanogenic System of *Xenopus laevis*. **Archives Histology Cytology**. v.61, p.305-316.

Apêndices

Apêndice 1: Correlação entre peso do fígado e porcentagem de área pigmentada

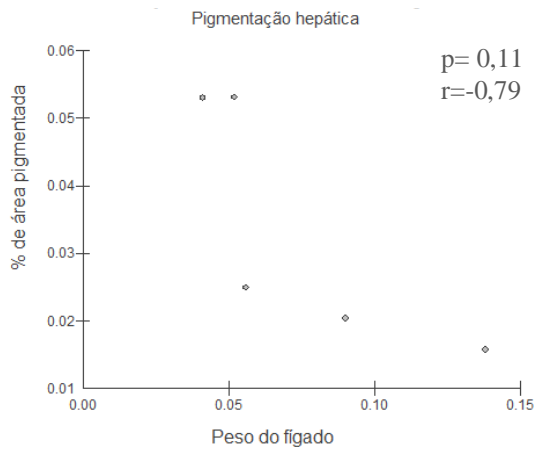


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre peso do órgão e porcentagem de área pigmentada em *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

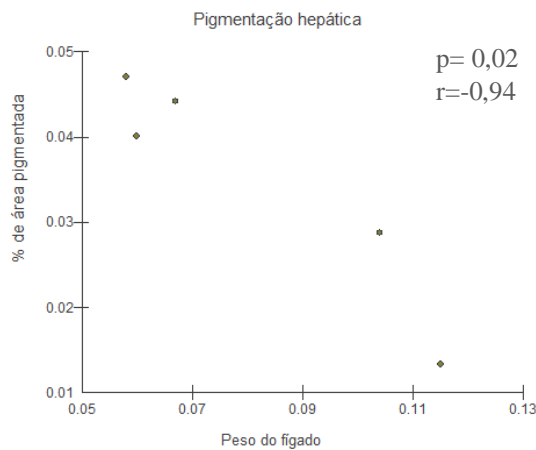


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre peso do órgão e porcentagem de área pigmentada em *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Há correlação entre pigmentação hepática e peso do órgão.

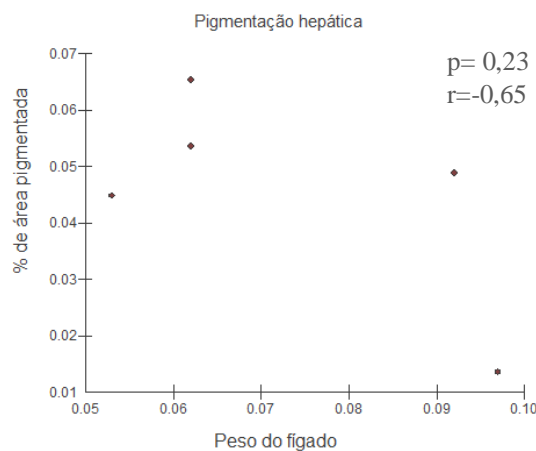


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre peso do órgão e porcentagem de área pigmentada em *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Não há correlação entre as variáveis.

Apêndice 2: Correlação entre peso do órgão e porcentagem de área contendo hemosiderina

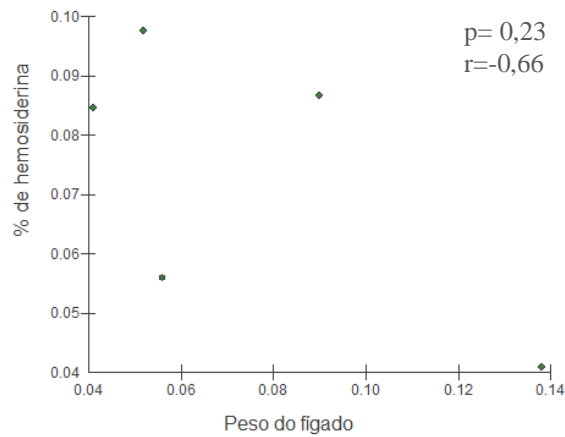


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre peso do fígado e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

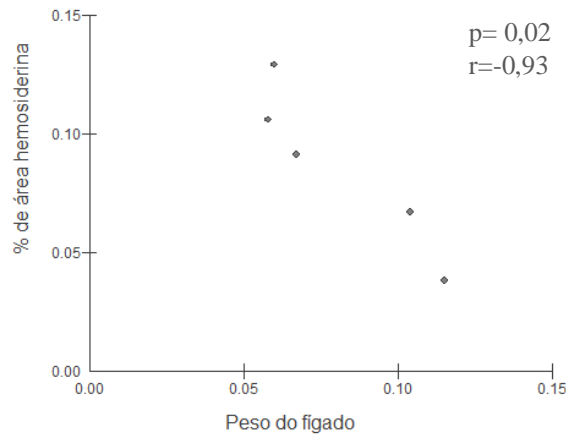


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre peso do fígado e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Há forte correlação negativa entre as variáveis.

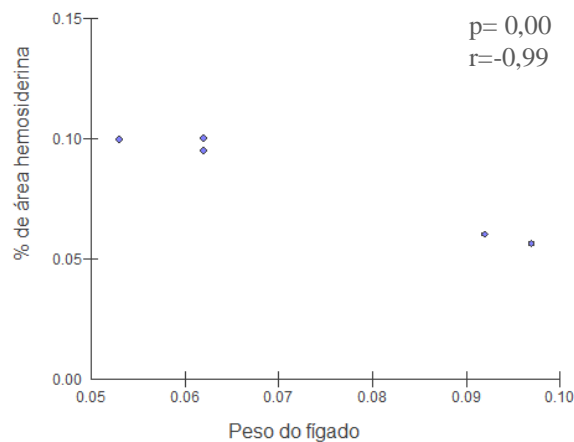


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre peso do fígado e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Há forte correlação negativa entre as variáveis.

Apêndice 3: Correlação entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área contendo hemosiderina

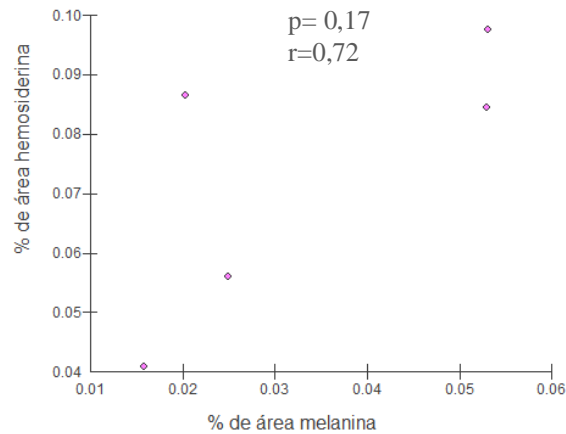


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

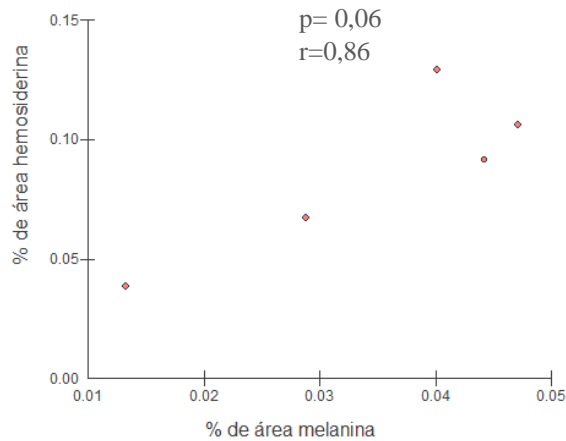


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Não há correlação entre as variáveis.

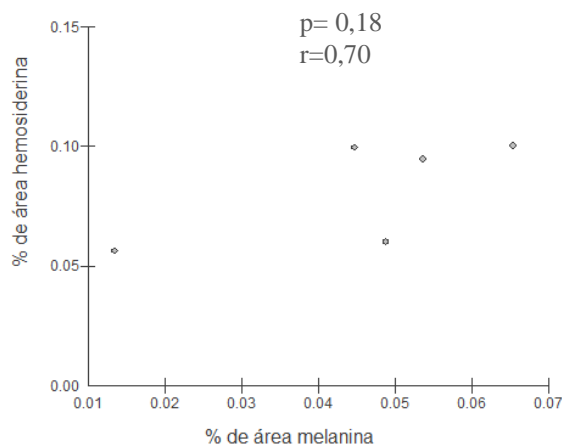


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Não há correlação entre as variáveis.

Apêndice 4: Correlação entre o peso do órgão e porcentagem de área contendo lipofuscina

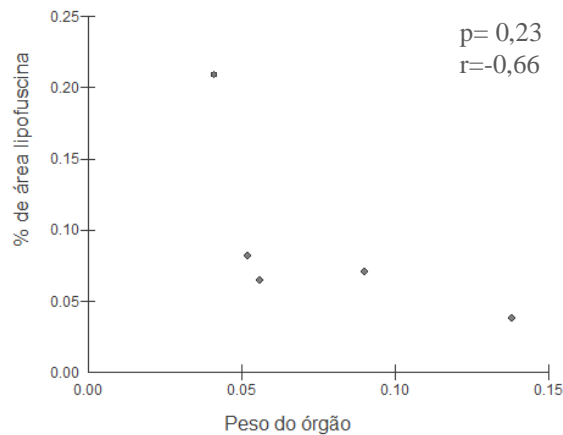


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre peso do fígado e porcentagem de área com lipofuscina de *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

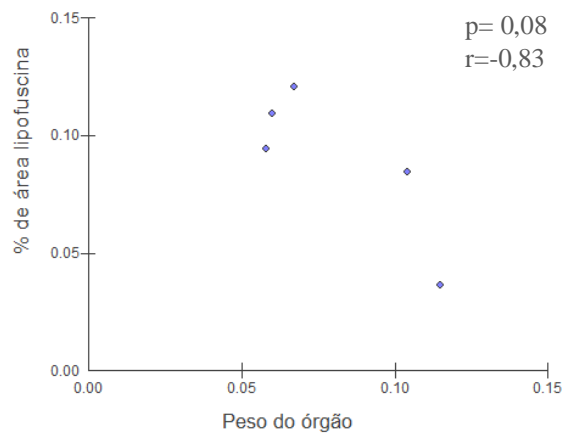


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre peso do fígado e porcentagem de área com lipofuscina em *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*.. Não há correlação entre as variáveis.

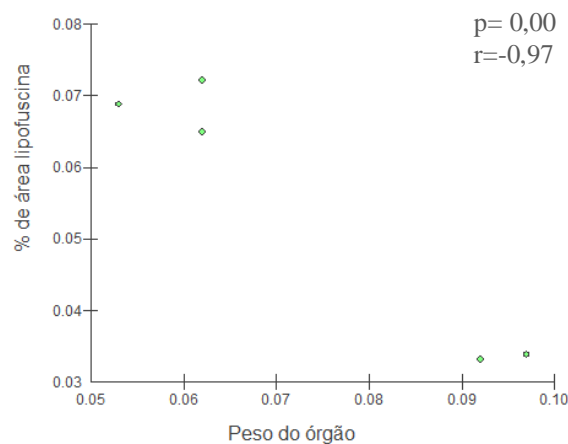


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre peso do fígado e porcentagem de área com lipofuscina em *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*.. Há forte correlação negativa entre as variáveis.

Apêndice 5: Correlação entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área contendo lipofuscina

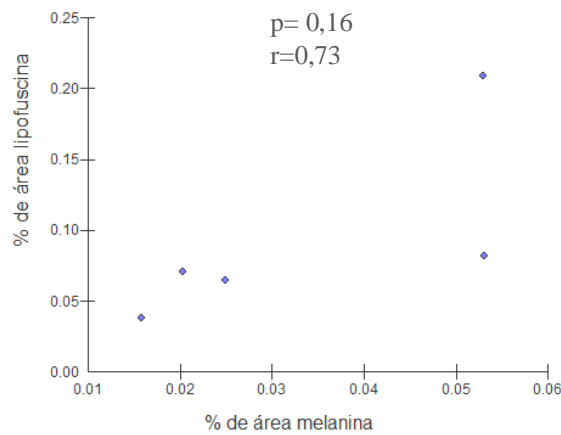


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área com lipofuscina de *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

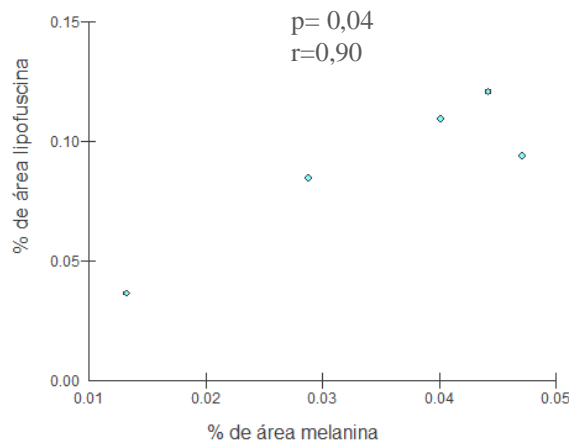


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área com lipofuscina de *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli* . As variáveis estão correlacionadas forte e positivamente.

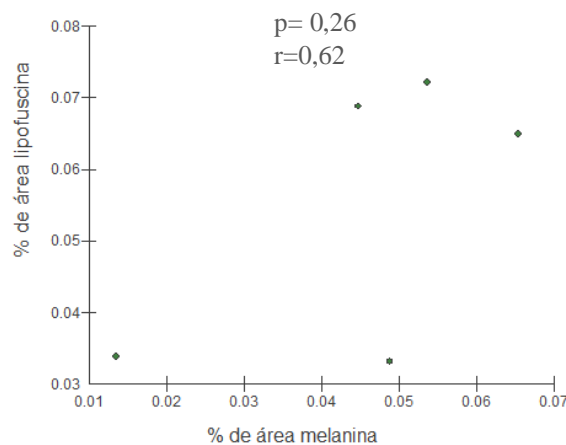


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com melanina e porcentagem de área com lipofuscina de *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli* . Não há correlação entre as variáveis.

Apêndice 6: Correlação entre porcentagem de área com hemosiderina e lipofuscina

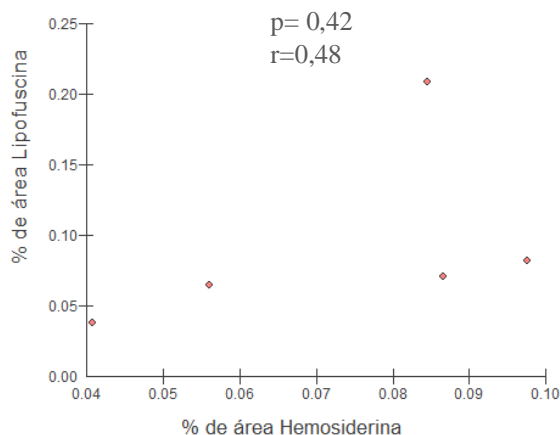


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com lipofuscina e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

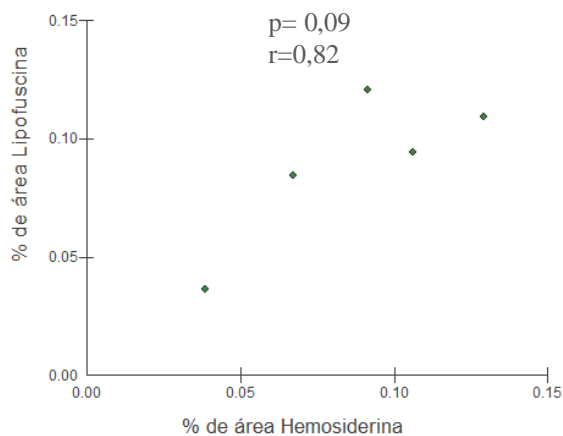


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com lipofuscina e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Não há correlação entre as variáveis.

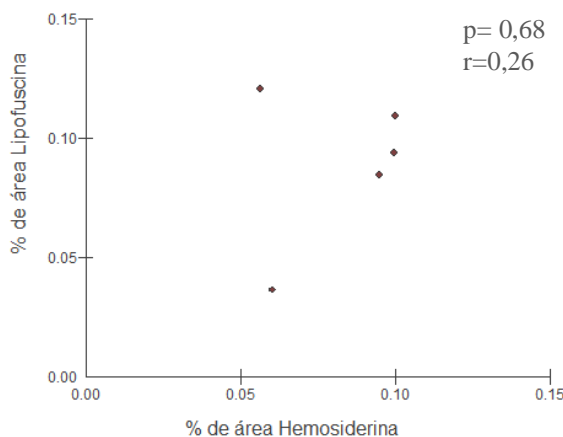


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre porcentagem de área com lipofuscina e porcentagem de área com hemosiderina de *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Não há correlação entre as variáveis.

Capítulo 3

Processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* induz a pigmentação no testículo do anuro *Eupemphix nattereri*

Processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* induz a pigmentação no testículo do anuro *Eupemphix nattereri*

Lilian Franco-Belussi¹, Amílcar Sabino Damazo², Classius de Oliveira³

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

² Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – UFMT/ Cuiabá-MT

² Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto – SP

Manuscrito a ser submetido ao periódico *The Anatomical Record*.

Resumo: Vertebrados ectotérmicos possuem um sistema pigmentar extracutâneo bem desenvolvido, com células contendo pigmentos melânicos em diversos órgãos (fígado, pulmões, coração, timo e gônadas) e tecidos (meninges e tecidos conectivos ao redor de vasos sanguíneos). A melanina é um polímero capaz de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado, sendo importante para os ectotérmicos contra componentes bacterianos. Este estudo visa avaliar os efeitos do processo inflamatório sistêmico, induzido experimentalmente pelo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, na pigmentação testicular do anuro *Eupemphix nattereri*. A fim de avaliar mudanças na quantidade e presença de substâncias pigmentares que ocorre no testículo foram realizadas análises morfológicas, estereológicas e histoquímicas. Para o estudo, foram utilizados 10 machos adultos de *Eupemphix nattereri*, os quais foram inoculados intraperitonealmente com dose única de lipopolissacarídeo de *E. coli*, sendo eutanasiados e analisada a pigmentação testicular após 2 e 24 horas de inoculação do patógeno. Para o controle 5 animais foram inoculados com solução fisiológica estéril. As células pigmentares presentes nos testículos do anuro *Eupemphix nattereri* apresentam-se com aspecto dendrítico e localizam-se na região intersticial, ao redor dos lóculos seminíferos, associadas a vasos sanguíneos presentes nessa região; bem como na cápsula albugínea que recobre esse órgão. A pigmentação presente nas gônadas aumenta em animais inoculados com componente da parede bacteriana após 2 horas. Já em animais analisados após 24 horas, essa pigmentação diminui. Não foi detectada presença de hemosiderina nem de lipofuscina no interior dos melanócitos testiculares, bem como essas substâncias não foram observadas nesse tecido. As células pigmentares viscerais presentes nos testículos possuem resposta rápida frente à infecção por *E. coli* o que pode estar relacionado à proteção das células germinativas.

Palavras chave: Melanócito, Testículo, Anura, Lipopolissacarídeo, Infecção.

Introdução

Os anfíbios possuem um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células contendo pigmentos melânicos localizados em vários órgãos e tecidos (GALLONE *et al.*, 2002), as quais são freqüentemente presentes no fígado, baço, rins, peritônio, pulmão, coração, vasos sanguíneos, timo, gônadas e meninges (FRANCO-BELUSSI, *et al.* 2010a; MORESCO e OLIVEIRA, 2009; ZIERI *et al.*, 2007; BAGNARA e MATSUMOTO, 2006; GALLONE *et al.*, 2002; ZUASTI *et al.*, 1998; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; ZUASTI *et al.*, 1990; AGIUS e AGBEDE, 1984; AGIUS, 1980). Essas células pigmentares também são observadas, em quantidade reduzida, no órgão de Bidder de *Rhinella ornata* (Bufonidae) (OLIVEIRA *et al.*, 2003), sendo também relatadas em testículos de *Rhinella schneideri* (MORESCO e OLIVEIRA, 2009).

Essas células, descritas na epiderme e em diversos órgãos são semelhantes a melanócitos (ZUASTI *et al.*, 1998; AGIUS e AGBEDE, 1984) provenientes da crista neural ectodérmica (SICHEL *et al.*, 1997), sendo capazes de produzir e armazenar melanina em seu interior (AGIUS e ROBERTS, 2003). A melanina é um polímero complexo que pode absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (ZUASTI *et al.*, 1989). É importante para os ectotérmicos contra componentes bacterianos devido à ação da hidrogeno-peroxidase e suas quinonas precursoras, as quais agem como bactericida, favorecendo as atividades enzimáticas, que podem ser restritas em baixas temperaturas (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996). Ainda no interior dos melanócitos viscerais, são encontradas outras substâncias pigmentares, provenientes do catabolismo celular, a hemosiderina, a qual é um composto de ferro e proteínas derivadas da destruição da hemoglobina dos eritrócitos e conseqüentemente um produto metabólico intermediário que ocorre durante a reciclagem dos componentes na eritropoiese (KRANS, 1989). E a lipofuscina, a qual é resultante da polimerização oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, sendo acumulado em peixes como resultado de dietas

alimentares deficientes (PICKFORD, 1953). No entanto, o papel funcional dessas células pigmentares presentes nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos ainda não está definido, havendo várias hipóteses (GALLONE *et al.*, 2002), dentre elas, funções citoprotetoras relacionadas aos radicais livres (MCGRAW, 2005) e processos de detoxificação por poluentes (FENOGLIO *et al.*, 2005); sendo ainda demonstrado um aumento na quantidade de melanina no fígado, conjuntamente com modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *Rana esculenta* durante o inverno (BARNI *et al.*, 1999). Ainda com relação ao fígado, o aumento da pigmentação está relacionado com patologias em peixes (ROBERTS, 1975). Em relação às células pigmentares presentes nos demais órgãos, não há estudos que permitam avaliar suas possíveis funções, embora uma hipótese alternativa refere-se à melanina como parte do sistema imune inato (MACKINTOSH, 2001). Assim, o objetivo desse estudo é avaliar o efeito da infecção induzida experimentalmente pelo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* nas células pigmentares presentes nos testículos.

Metodologia

Para o estudo, foram utilizados 15 machos adultos de *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae), coletados em várzeas, lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto – SP, em época de atividade reprodutiva (Janeiro e Fevereiro / 2008) (RAN/IBAMA/MMA 18573-1).

Os animais experimentais (n=10) foram inoculados via intraperitoneal com dose única de 3 mg/Kg de LPS de *Escherichia coli*, Serotype 0127:B8 (Sigma, St. Louis, MO) (adaptado de FLORES QUINTANA e RUAS DE MORAES, 2001) diluído em solução fisiológica estéril (0,02 mL). Para o controle, 5 animais foram injetados com solução fisiológica estéril, na mesma quantidade.

As respostas celulares foram avaliadas 2 horas (LPS 2h) após as inoculações a fim de observar a ativação das células residentes nos tecidos, e 24 horas (LPS 24h) após a inoculação

para observar a ativação do sistema imune inato e migração de células circulantes do sangue periférico.

O manuseio experimental e eutanásia dos animais seguiram recomendações do Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, seguindo o *Guia de cuidados e uso de animais em laboratório* (70/07-CEEA). Decorridos os tempos experimentais os animais foram anestesiados e eutanasiados benzocaína (0,5 g/500 mL de água), foram pesados, e a cavidade abdominal foi exposta por meio de incisão mediana desde a cloaca até a altura da cintura dos membros dianteiros. Os testículos foram retirados, pesados em balança analítica de precisão (0,05 g) e seguiram-se os procedimentos para inclusão e análise do órgão.

Para as análises morfológicas e histoquímicas fragmentos de testículos foram fixados em solução fixadora Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0,1 M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído a 5% e glutaraldeído a 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 2 µm foram obtidas em micrótomo (RM 2265, Leica, Suíça). Os cortes foram observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280).

Para as análises estereológicas os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e a quantificação da pigmentação foi realizada com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 4.5) de acordo com a proposta de Lehr (1997), com adaptações, a qual se baseia na diferença de intensidade de coloração para quantificar a expressão de receptores hormonais.

Para a detecção da lipofuscina, os cortes histológicos de testículo foram incubados por 15 min em solução de Schmorl, composta de 75 mL de cloreto férrico a 1%, 10 mL de ferricianeto de potássio e 15 mL de água destilada, posteriormente foram imersas em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina 1%. Para detecção da

hemossiderina, os cortes foram incubados pelo mesmo tempo, em solução ácida de ferrocianídeo, obtido com a dissolução de 2 g de ferrocianeto de potássio em 100 mL de solução de ácido clorídrico a 0,75 mol/L. Posteriormente foram imersas em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina a 1% .

As diferenças nas quantidades pigmentação presentes nos tratamentos experimentais foram analisadas por meio de análise de variância; ANOVA: Um critério quando os dados foram paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, nesse caso, anteriormente os dados foram transformados com a utilização da raiz quadrada. Para análise de correlação, foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson pra dados paramétricos e coeficiente de correlação de Spearman para dados não paramétricos.

Resultados

As células pigmentares presentes nos testículos do anuro *Eupemphix nattereri* apresentam-se com aspecto dendrítico e localizam-se na região intersticial, ao redor dos lóculos seminíferos, preferencialmente associadas a vasos sanguíneos presentes nessa região; bem como na cápsula albugínea que recobre esse órgão (Figura 1).

A pigmentação testicular aumenta em animais inoculados com o patógeno e analisados após 2 horas. Porém, em animais analisados após 24 horas, essa pigmentação diminui (Kruskal-Wallis: $H= 9,15$; $p= 0,01$) (Figuras 2 e 3).

Não foi detectada presença de hemossiderina (Figuras 4 e 5) e lipofuscina (Figuras 6 e 7) no interior dos melanócitos testiculares, bem como essas substâncias não foram observadas nesse tecido.

Em relação aos dados biométricos, o peso dos testículos não se apresenta correlacionado com a quantidade de pigmentação nos animais de nenhum dos grupos experimentais (Correlação de Pearson: CONT: $r= -0,06$; $p= 0,92$; LPS 2h: $r= 0,11$; $p= 0,86$; LPS 24h: $r= -0,14$; $p= 0,82$) (Apêndice 1).

Discussão

A pigmentação presentes nos testículos do anuro *E. nattereri* aumenta em animais inoculados intraperitonealmente com LPS de *E. coli* e analisados após 2 horas, enquanto nos animais analisados após 24 horas da administração é observada diminuição da área pigmentada. Uma possível explicação para o ocorrido é que as células germinativas necessitam de maior proteção contra agentes infecciosos que poderiam causar danos irreversíveis a seu material genético, desta maneira as células pigmentares, que conferem tal proteção, aumentam sua área de ocupação rapidamente, sendo verificada uma resposta imediata de aumento da pigmentação, visto que a melanina apresenta funções inerentes ao sistema imune inato (MACKINTOSH, 2001). São também encontradas nos melanócitos, diversas enzimas lisossomais, as quais, em conjunto, atuam na degradação de bactérias (MACKINTOSH, 2001). Entretanto, devido a característica pigmentar desses melanócitos, não foi possível distinguir se ocorreu um aumento do número de células, aumento na produção de grânulos citoplasmáticos das células pigmentares, ou dispersão dos grânulos de melanina, uma vez que a grande quantidade de pigmento impede a identificação dos núcleos e individualização das células.

O aumento na área pigmentar presente nos testículos pode estar intimamente relacionado à característica angioarquitetural do órgão, uma vez que o patógeno foi inoculado na cavidade abdominal e utiliza-se dos vasos sanguíneos para atingir os tecidos, assim, o estímulo atinge os melanócitos presentes na medula do órgão. Tal característica pode ser corroborada também pelo fato da resposta na pigmentação na superfície do órgão não ter sido observada com duas horas de inoculação do patógeno, embora após 24 horas é observado declínio (FRANCO-BELUSSI, *et al.* 2010b). Desta maneira, é possível supor que o aumento na área pigmentar testicular trata-se de movimentação dos grânulos de melanina no interior da célula, visto que com 2 horas de inoculação do patógeno é um período curto para que possa ser realizada síntese de melanina ou proliferação celular.

Quando comparado a pigmentação testicular à hepática (FRANCO-BELUSSI, *et al.* 2010c), observa-se diferenças entre os tratamentos, onde a pigmentação testicular aumenta em resposta rápida (2h após a inoculação do patógeno) e a pigmentação hepática apresenta resposta tardia, onde a pigmentação está aumentada após 24 horas de administração do componente bacteriano, demonstrando que as células pigmentares respondem diferentemente nesses órgãos, frente à infecção com LPS. Embora esses órgãos apresentem como característica convergente a presença de células com citoplasma repleto de melanina, o mesmo também é observado em outras vísceras (FRANCO-BELUSSI, *et al.* 2010a; MORESCO e OLIVEIRA, 2009; GALLONE *et al.*, 2002), porém com características morfológicas e fisiológicas específicas, tais como funções imunológicas das células pigmentares viscerais hepáticas, o que explicaria essas respostas distintas.

As células pigmentadas presentes nas gônadas localizam-se na região intersticial, próximo aos vasos sanguíneos, apresentam prolongamentos celulares e citoplasma repletos de grânulos pigmentados, assim como relatado por Oliveira e Zieri (2005); sendo desta maneira caracterizada como melanócitos típicos assim como o descrito por Zuasti *et al.* (1998), diferindo dos melanomacrófagos encontrados em órgãos hematopoiéticos, os quais possuem aspecto puntiforme, onde não são observados prolongamentos citoplasmáticos, e a principal função é a fagocítica, semelhante aos macrófagos (ZUASTI *et al.*, 1998). Os melanomacrófagos estão relacionados com a defesa imunológica do organismo, na destruição, detoxificação e reciclagem de produtos oriundos do metabolismo celular, gerando outras substâncias pigmentares, além da melanina, que se acumulam em seu citoplasma, tais como a lipofuscina e hemosiderina, as quais são resultantes do catabolismo celular (AGIUS e AGBEDE, 1984), embora essas outras substâncias pigmentares não são encontradas nos melanócitos testiculares, nem no tecido gonadal, evidenciando as diferenças fisiológicas entre esses dois tipos de células pigmentares.

Em suma, a pigmentação presentes nos testículos do anuro *E. nattereri* possui ação protetora contra agentes bacterianos, apresentando-se aumentada nos animais inoculados com LPS de *E. coli* e analisados após 2 horas, demonstrando tratar-se de uma resposta rápida frente ao processo infeccioso, o que também possibilita distinguir esse tipo celular das células pigmentares de órgãos hematopoéticos, que além da morfologia distinta, apresentam tempos de resposta diferentes quando inoculados com o componente da parede de bactérias gram negativas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Diogo Borges Provete pela revisão e sugestões ao manuscrito, ao Msc. Rodrigo Zieri e Msc. Lia Raquel de Souza Santos pela contribuição nas coletas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lilian Franco Belussi (Proc. 2008/52389-0).

Figuras

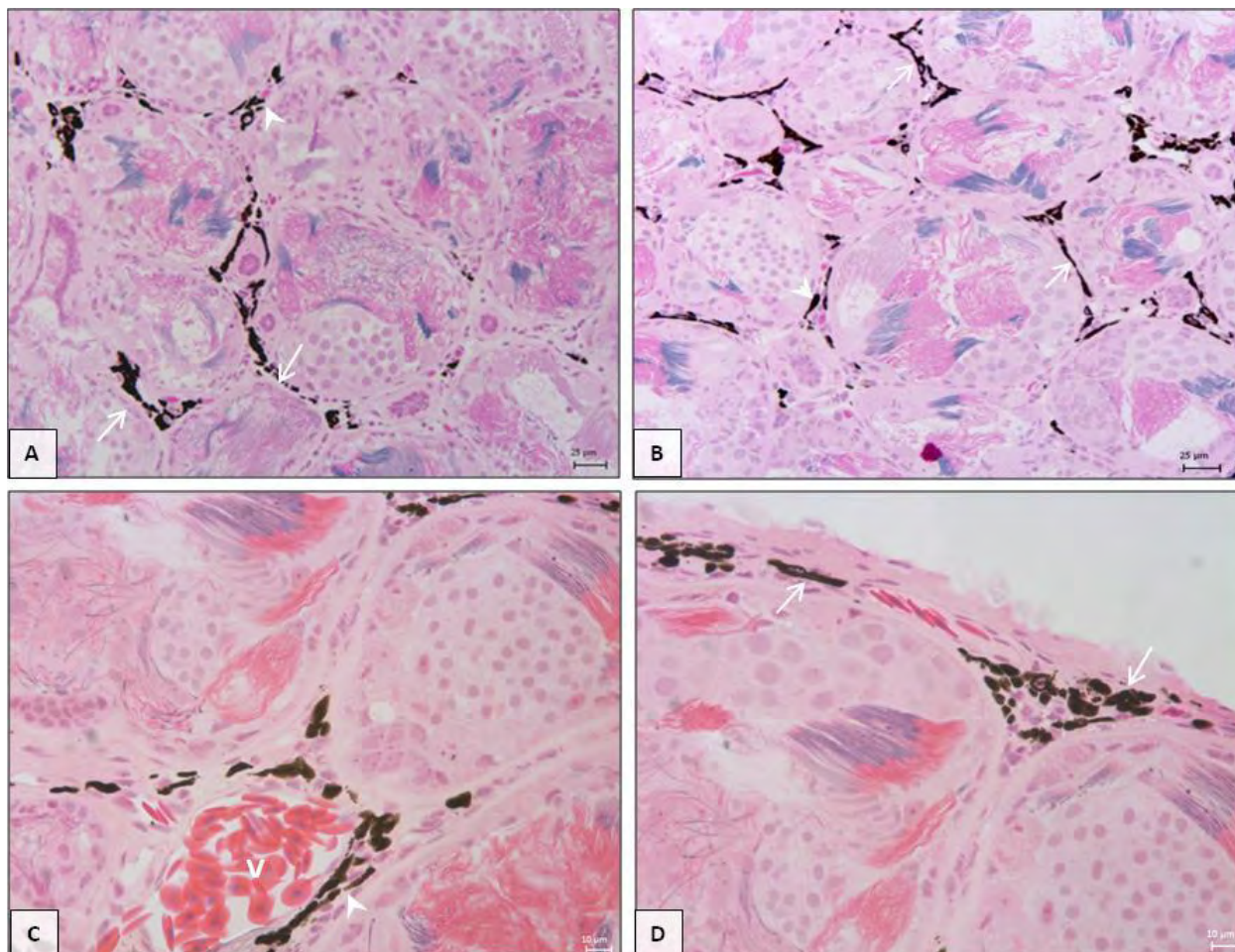


Figura 1: Cortes histológicas de testículo de *Eupemphix nattereri*. Evidenciando a presença de células pigmentares (setas) na região entre os lóculos seminíferos, e sua associação à vasos sanguíneos (V) (cabeça de seta). Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras = 25µm (Figuras A e B) e 10µm (Figuras C e D).

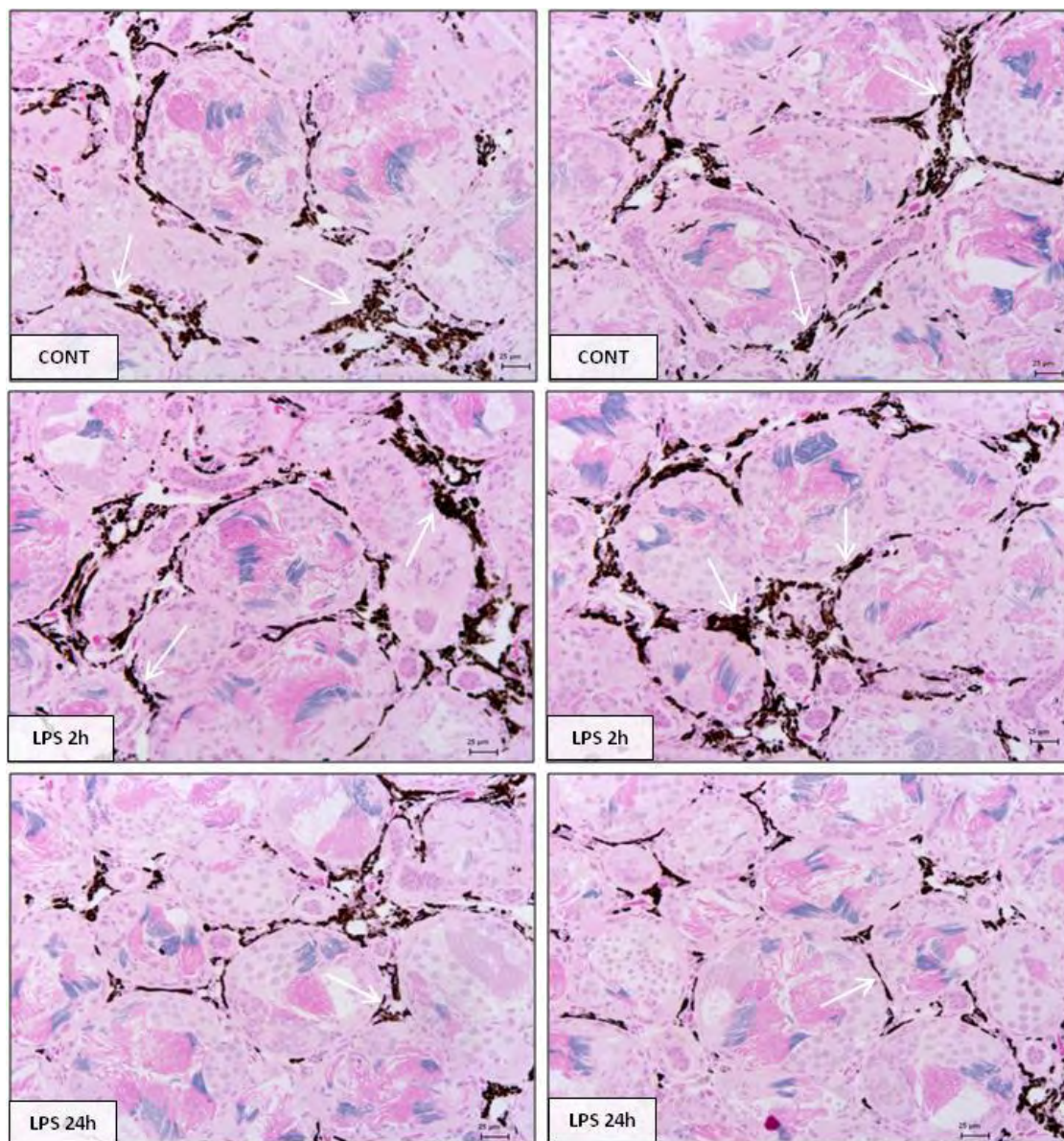


Figura 2: Cortes histológicos de testículo de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. CONT: Controle; LPS 2h: Grupo experimental analisado após 2 horas de inoculação; LPS 24h: Grupo experimental analisado 24 horas após inoculação. Em cada grupo experimental são representados 2 exemplares distintos. Células pigmentares viscerais (setas) observadas na lâmina própria dos túbulos seminíferos. Coloração: Hematoxilina-eosina. Barras = 25 µm.

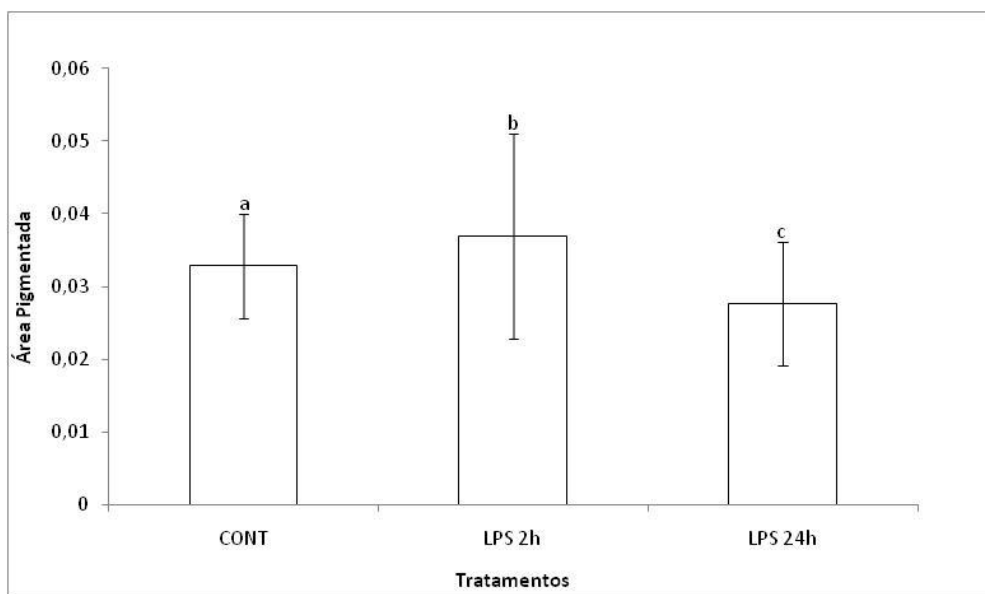


Figura 3: Diferenças na porcentagem de área pigmentada presente no testículo de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS de *E. coli*. Média \pm Erro padrão. CONT: grupo controle, LPS 2h: grupo experimental analisado após 2 horas da inoculação, LPS 24h: grupo experimental analisado 24 horas após inoculação do patógeno. Diferentes letras representam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$).

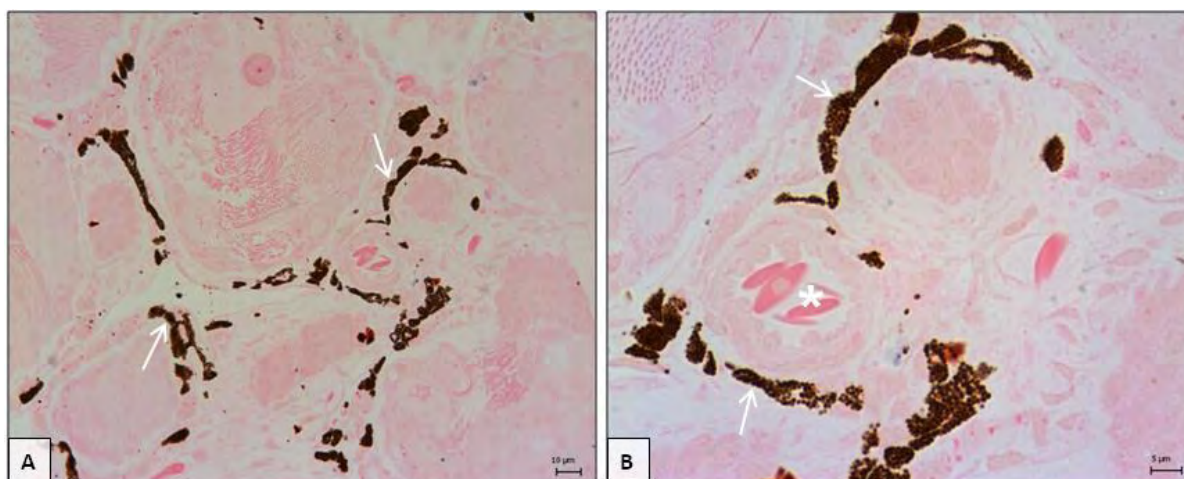


Figura 4: Cortes histológicos de testículo de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. Células pigmentares (setas) dispostas na região intersticial, próxima a vasos sanguíneos (*), ausência de hemosiderina. Coloração: Solução ácida de ferrocianeto, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 10µm (Figura A); 5µm (Figura B).

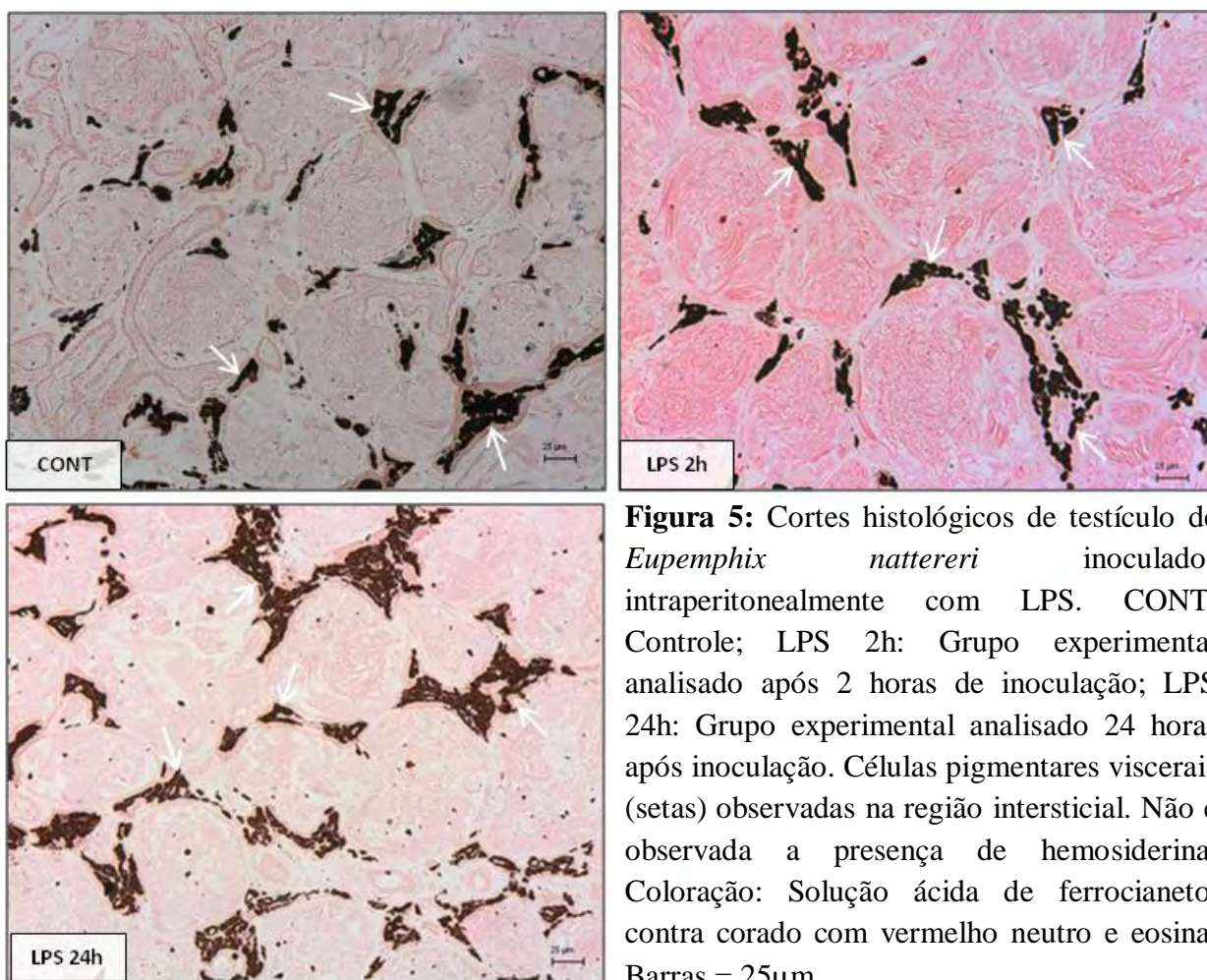


Figura 5: Cortes histológicos de testículo de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. CONT: Controle; LPS 2h: Grupo experimental analisado após 2 horas de inoculação; LPS 24h: Grupo experimental analisado 24 horas após inoculação. Células pigmentares viscerais (setas) observadas na região intersticial. Não é observada a presença de hemosiderina. Coloração: Solução ácida de ferrocianeto, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 25µm

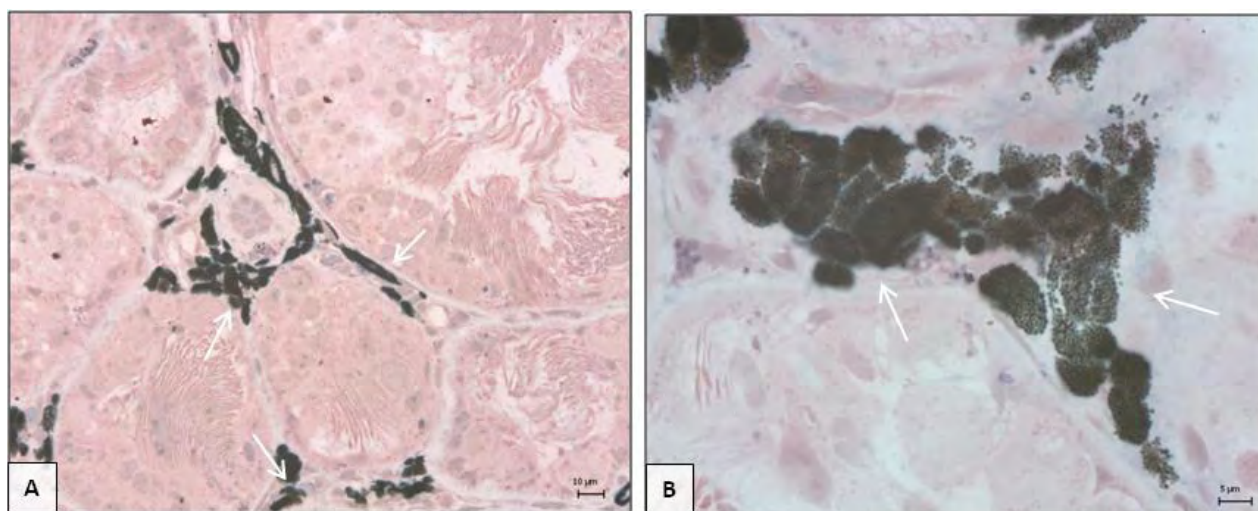


Figura 6: Cortes histológicos de testículo de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. Células pigmentares presentes no interstício (setas), ausência de lipofuscina. Coloração: Solução de Schmorl, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 10µm (Figura A); 5µm (Figura B).

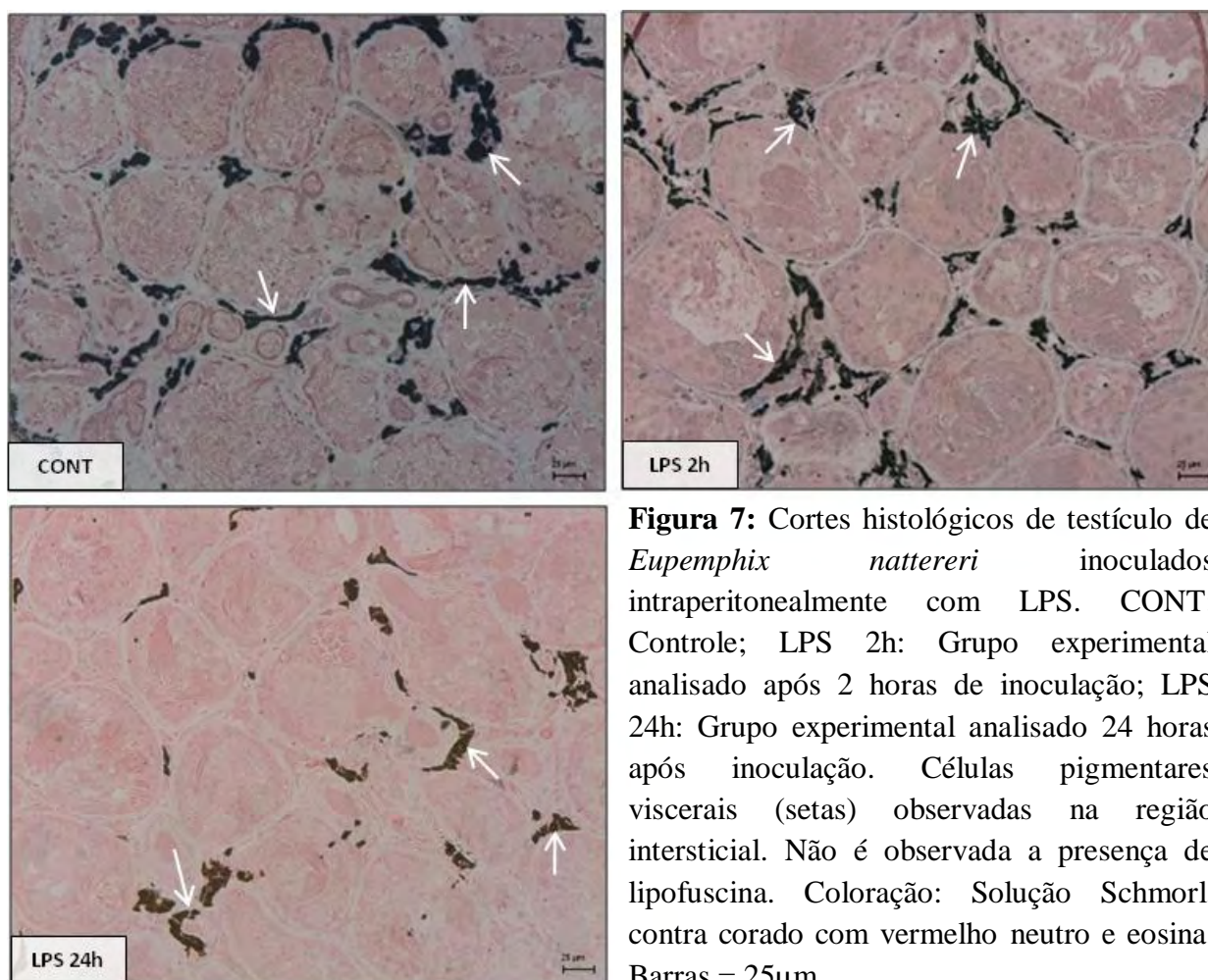


Figura 7: Cortes histológicos de testículo de *Eupemphix nattereri* inoculados intraperitonealmente com LPS. CONT: Controle; LPS 2h: Grupo experimental analisado após 2 horas de inoculação; LPS 24h: Grupo experimental analisado 24 horas após inoculação. Células pigmentares viscerais (setas) observadas na região intersticial. Não é observada a presença de lipofuscina. Coloração: Solução Schmorl, contra corado com vermelho neutro e eosina. Barras = 25µm.

Referências Bibliográficas

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic Development of Melano-Macrophage 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 Patology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.499-509.
- BAGNARA J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. In: Nordlund J. J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R. A.; Ortonne, J-P; eds. **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. New York, Oxford: Oxford University Press, p. 9–40.
- 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.
- 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.
- 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.
- FLORES QUINTANA, C.; RUAS DE MORAES, F. 2001 Respuesta Inflamatoria a la Inoculación de LPS em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Suplementados com Cromo. **Revista de Ictiologia**. v.9, 13-19.
- FRANCO-BELUSSI, L.; SANTOS, L.R.S; ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2010a. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. **Zoologischer Anzeiger (In Press)**.
- FRANCO-BELUSSI, L.; DAMAZO, A. S.; OLIVEIRA, C. 2010b. Pigmentação visceral em *Eupemphix nattereri* infectado com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. In: Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae) **Dissertação de Mestrado**. p. 25-43.
- FRANCO-BELUSSI, L.; DAMAZO, A. S.; OLIVEIRA, C. 2010c. Efeitos do processo inflamatório na pigmentação hepática do anuro *Eupemphix nattereri*. In: Efeitos do processo inflamatório sobre o sistema pigmentar extracutâneo em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae) **Dissertação de Mestrado**. p. 59-90.
- GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CICERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. v.15, n.1, p. 32-40.

- KRANZ, H. 1989. Changes in Splenic Melano-Macrophages Centres of Dab, *Limanda limanda* During and After Infection with Ulcer Disease. **Disease of Aquatic Organisms**. v.6, 167-173.
- 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
- 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.
- 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,(1), p. 1-8.
- OLIVEIRA, C.; SANT'ANA, 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 curvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**. Porto Alegre, v.11, n.1, p.39-46.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação Testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com Observações Anatômicas sobre o Sistema Pigmentar Extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.22, n.2, junho, p.454-460.
- PICKFORD, G.W. 1953. Fish Endocrinology. A Study of the Hypophysectomized Male Killifish, *Fundulus heteroclitus* (L.). **Bulletim of the Bingham Oceanographic Collection, Yale University**. v.14, p. 5-41.
- ROBERTS, R.J. 1975. Melanin-Containing Cells of Teleost Fish and their Relation to Disease. In: **The Pathology of fishes** (ed. By W.E. Ribelin & G. Migaki). University of Wisconsin Press, Madison, W.I. p. 399-428.
- 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.
- ZIERI, R.; TABOGA, S.R.; OLIVEIRA, C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Etereological and Ultrastructural Aspects. **The Anatomical Record**. v.290, p. 795-800.
- 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.; 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.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C., GARCIA-BORRÓN, J.C., FERRER, C. 1998. The Melanogenic System of *Xenopus laevis*. **Archives Histology Cytology**. v.61, p.305-316.

Apêndice

Apêndice 1: Correlação entre peso do testículo e porcentagem de área pigmentada

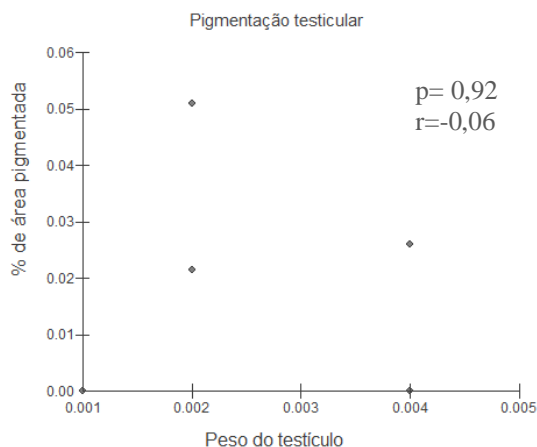


Figura 1: Correlação linear de Pearson entre peso do órgão e porcentagem de área pigmentada em *Eupemphix nattereri* do grupo controle. Não há correlação entre as variáveis.

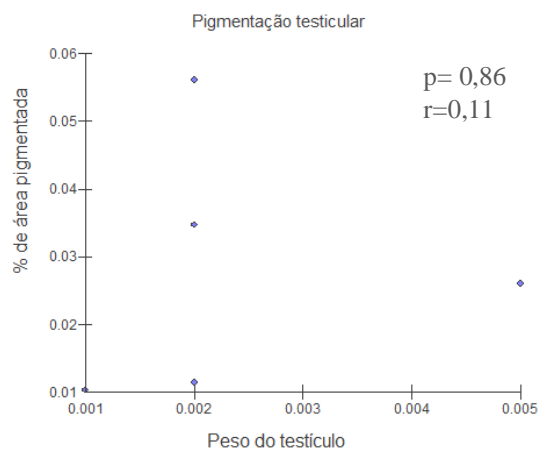


Figura 2: Correlação linear de Pearson entre peso do órgão e porcentagem de área pigmentada em *Eupemphix nattereri* analisados 2 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Há correlação entre pigmentação hepática e peso do órgão.

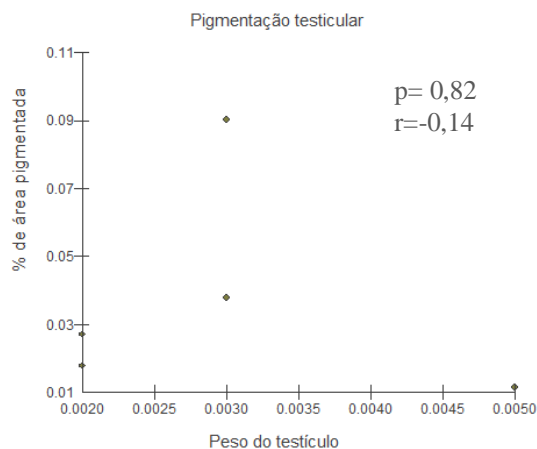


Figura 3: Correlação linear de Pearson entre peso do órgão e porcentagem de área pigmentada em *Eupemphix nattereri* analisados 24 horas após a inoculação intraperitoneal com LPS de *E. coli*. Não há correlação entre as variáveis.

VI – Conclusões

- O anuro *Eupemphix nattereri* possui um sistema pigmentar extracutâneo bem desenvolvido, constituído por células contendo pigmentos melânicos na superfície de alguns órgãos e tecidos.
- Esse sistema pigmentar de *E. nattereri* sofre alterações frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, sendo observada, por meio de análise estereoscópica, redução da pigmentação na superfície dos testículos em animais inoculados com o patógeno e analisados após 24h.
- Análises histológicas dos testículos demonstraram a ocorrência de melanócitos viscerais, além da superfície do órgão, no interstício testicular, ao redor dos lóculos seminíferos. Quantificações histológicas permitiram diagnosticar aumento da pigmentação testicular em animais inoculados com LPS de *E. coli* e analisados após 2h; sendo observada redução em animais analisados após 24h da administração do patógeno, assim como a observada na superfície do órgão.
- A pigmentação hepática apresenta-se aumentada após 24h de administração do componente da parede bacteriana, sendo que no interior dessas células pigmentadas são encontradas outras substâncias pigmentares, além da melanina, como a hemosiderina e lipofuscina.
- As células contendo pigmentos melânicos encontradas nos testículos e fígado são células distintas, com morfologia, origem e componentes pigmentares diferenciados, o

que explica a diferente resposta dessas células frente ao processo inflamatório induzido experimentalmente por *E. coli*.

- O fígado de *E. nattereri* é um órgão ímpar e que ocupa grande parte da cavidade abdominal desses animais, localiza-se na região ventral, recobrando os demais órgãos. É dividido em três lobos, não apresentando subdivisão em lóbulos. Os hepatócitos estão dispostos em um arranjo do tipo cordonal duplo, sendo as células pigmentares observadas entre esses cordões de hepatócitos.

VII – Apêndice

Apêndice 1: 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).

