

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 03/03/2025

Danusy Lopes Santos

**Varição morfológica em girinos bentônicos e nectônicos: influência de  
fatores espaciais ou ambientais?**

**São José do Rio Preto**

**2023**

Danusy Lopes Santos

**Varição morfológica em girinos bentônicos e nectônicos: influência de fatores espaciais ou ambientais?**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração – Sistemática e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CAPES – Proc: 88887.342372/2019-00

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise de Cerqueira Rossa-Feres

Coorientador: Prof. Dr. Fausto Nomura

São José do Rio Preto

2023

S237v

Santos, Danusy Lopes

Varição morfológica em girinos bentônicos e nectônicos: : influência de fatores espaciais ou ambientais? / Danusy Lopes Santos. -- , 2023

94 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto,

Orientadora: Denise Rossa Feres

Coorientador: Fausto Nomura

1. Girinos. 2. microtomografia. 3. guildas. 4. padrões espaciais. 5. morfologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Danusy Lopes Santos

## **Variação morfológica em girinos bentônicos e nectônicos: influência de fatores espaciais ou ambientais?**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração – Sistemática e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: CAPES – Proc: 88887.342372/2019-00

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise de Cerqueira Rossa-Feres

Coorientador: Prof. Dr. Fausto Nomura

### **Comissão Examinadora**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dra. Denise de Cerqueira Rossa Feres

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Luiz Norberto Weber

Universidade Federal do Sul da Bahia

Prof. Dr. Dra. Lucélia Vieira

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Dra. Lilian Casatti

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

2023

*Ao meu pai João Natal dos Santos (in memoriam),  
que partiu antes que esse momento chegasse  
Saudades*

## AGRADECIMENTOS

É nessa hora que passa um filme diante dos nossos olhos. E nesse filme tem história, MUITA história! E muitos personagens! História essa que passou longe do meu roteiro original, mas que se desenrolou como quis, me mostrando e ensinando, que eu não controlo nada, mas que eu até sou muito boa em fazer dos limões uma boa dose de caipirinha!

Posso começar dizendo que essa tese está muito longe do que eu sonhei um dia, mas apesar de tudo, posso dizer que tenho muito orgulho dela, afinal ela foi escrita na pior fase da minha vida. Quando se começa um doutorado, não se imagina quanta coisa pode acontecer nesses anos. Sonhei com uma tese com muitos capítulos, já publicados no momento da defesa (inocente), sonhei com um sanduíche que nunca aconteceu, e jamais imaginei uma pandemia parando o mundo e levando embora tantas pessoas amadas, conhecidos queridos e tantos desconhecidos.

Mas se depois de tanta coisa, se esse momento chegou, preciso agradecer a duas pessoas maravilhosas: Minha orientadora, professora Denise e meu coorientador professor Fausto. Só posso agradecer a oportunidade de estar junto de pessoas extremamente humanas, pacientes, sensíveis, um grande exemplo de pessoas e profissionais, e do qual me faltam elogios. Dizer que a professora Denise é uma mãe é repetir o que todos já sabem. Mas eu gostaria de dizer o quanto me sinto honrada e feliz por ter aproveitado um pouquinho de tanta coisa boa que você nos passa. A senhora não tem noção do quanto me ensinou!

Junto com a professora veio também o Let! Como eu amo esse lab!!! Mesmo com a pandemia roubando meu tempo de vivência nele. Tanta gente querida e sempre pronta a ajudar... Foram muitas hospedagens na casa da Yasmim, e na casa da Fabi! Muitas risadas junto com a Fabi, Carlão e Kati! Muita ajuda do Cristiano!

E ao Fausto, obrigada por me aguentar tanto tempo! Foi ele que estava lá no começo de tudo. Quando do nada eu puxei a camisa dele no congresso, atrás de um orientador pra trabalhar com comportamento de anfíbios adultos. E ele me oferece girinos (logo eu que nunca tinha visto a boca de um girino!). Ele tava lá me tirando da minha zona de conforto e me mostrando um mundo totalmente novo. Ele tava lá me

ensinado estágio de Gosner, desenhando papilas, retas de gráficos, tornando ideias pequenas em projetos grandões. Ele está sempre lá quando a gente precisa! A figura dele hoje é bem mais que a de um profissional e orientador, mas a de um irmão que eu não tive.

Gostaria de deixar meu agradecimento aos professores e amigos dos laboratórios de Ecologia e Comunidades e Laboratório de Herpetofauna por onde transitei (e cresci muito) durante todo esse tempo na UFG.

Agradeço também aos professores e curadores de coleções que colocaram os girinos em suas bagagens para me entregar no congresso: Professor Célio Haddad, Diego Santanna, Gilda, e Filipe Nascimento. Obrigada também ao professor Wilfried Klein e ao Diego por me receberem em Ribeirão Preto, me apresentando novas técnicas e possibilidades. Professor Marcos Colaço, chegou no finalzinho salvando a pátria, dando apoio e o gás que faltava. Aos professores que dedicaram seu tempo participando da banca e enriquecendo o trabalho.

Aos amigos queridos trazidos seja pela vida ou pela pós, que de alguma forma fizeram parte da jornada, seja compartilhando o tempo de um café, uma risada, ou uma palavra de apoio: Sheila Andrade, Nati, Ingrid, Wanessa Carvalho, Pri Gambale, Lu Signorelli, Vanessa Leonel, Silas, Fabrício, e tantos outros que não conseguiria listar aqui.

Zairon... Não sei o que teria sido de mim sem seu apoio. Eu TE AMO POR TUDO e TE ODEIO POR TUDO.

Aos amigos da Naturae Consultoria Ambiental: Professor Nelson, Anita, Carlos Perereca, Letícia e Erica Rebeca pelo apoio psicológico, pelos empurrões quando a depressão me estacionava, e auxiliando no andamento do segundo capítulo.

Ao IBILCE/UNESP, e a Pós em Biodiversidade pelos ensinamentos e prestatividade. Tenho tanto orgulho de encher a boca em dizer Unesp, Let, Denise! Que sorte a minha né, só nome de peso nesses agradecimentos Unesp, UFG, USP, Let, Denise Rossa-Feres, LeFunc, Fausto Nomura... Uma dose extrema de gente boa, competência, e instituições excelentes, moldando toda minha formação.

Por fim e de MUITA IMPORTANCIA o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Processo: 88887.342372/2019-00.

## RESUMO

A morfologia é um dos principais componentes do fenótipo de um organismo. Os girinos apresentam grande diversidade morfológica e comportamental, e ocupam uma ampla gama de habitats aquáticos e terrestres. Essa diversidade tem disso atribuída às características físicas do ambiente e à presença a predadores e competidores. Apesar dos girinos serem excelentes modelos para estudos morfológicos e de variação fenotípica, existe uma carência em estudos envolvendo variação morfológica, suas origens e distribuição no espaço e no tempo. Outra carência envolvendo o estudo de girinos está na relação entre as estruturas anatômicas e suas respectivas funções, e variações morfológicas apresentadas por essas estruturas. Considerando a ausência de estudos com ampla abrangência geográfica acerca das variações morfológicas, assim como sobre a organização e funcionamento de órgãos e sistemas, e se eles sofrem modificações de acordo com diferenças no uso do ambiente, nossos objetivos gerais foram: (1) determinar a variação em caracteres morfológicos externos em girinos de diferentes guildas ecomorfológicas, verificando a existência de padrões associados a distância espacial entre populações ao longo da distribuição geográfica das espécies alvo; (2) caracterizar o sistema nervoso de girinos de diferentes guildas ecomorfológicas, buscando correlacionar a morfologia do sistema nervoso ao ambiente utilizado. Utilizando técnicas de morfometria geométrica, além de imagens tridimensionais, nós analisamos a variação da morfologia externa. Por meio de modelos tridimensionais analisamos as variações morfológicas no cérebro de girinos de três diferentes guildas ecomorfológicas e verificamos se as variações morfológicas observadas podem estar associadas a diferenças no uso do habitat. Nossos resultados demonstram que a morfologia externa dos girinos é correlacionada com a distância espacial entre as populações de todas as espécies analisadas, com exceção de *Rhinella diptycha*. A morfologia do cérebro variou acima do esperado, principalmente as regiões do cerebelo, optic tectum e diencéfalo. Observamos também que essas variações estão associadas ao uso da coluna d'água e também ao tamanho do cérebro. Girinos nectônicos de *D. minutus*, que usam o ambiente em três dimensões, apresentaram cérebro com maior tamanho e cerebelo mais volumoso

**Palavras-chave:** Girinos. Morfologia. Microtomografia computadorizada. Guildas ecomorfológicas. Padrões espaciais.

## ABSTRACT

Morphology is one of the main components of an organism's phenotype. Thus questions and hypotheses related to the origin of morphological variation and its distribution in space and time are common within biology. Tadpoles occupy a wide range of aquatic and terrestrial habitats and include a great diversity of ecomorphotypes, with diverse morphological and behavioral adaptations, differences in developmental time, size at metamorphosis and in physiological aspects, both in response to the physical characteristics of the environment and/or in response to the presence of predators and competitors, thus being excellent models for morphological and phenotypic variation studies. However, there is a lack of studies involving morphological variation, its origins and distribution in space and time using tadpoles. Another deficiency involving the study of tadpoles is the relationship between anatomical structures and their respective functions, and morphological variations presented by these structures. Considering the absence of basic information and studies with a wide geographical distribution about morphological variations, as well as about the organization and functioning of organs and systems, and how they are modified to meet the demands of different types of environment our general objective was: (1) to determine the variation in larval morphological characters in tadpoles from different ecomorphological guilds, verifying the existence of patterns, associated with distance between populations or environmental variables along the geographic distribution of the target species, (2) to characterize the nervous system of tadpoles from different ecomorphological guilds, seeking to correlate the morphology of the nervous system to the environment used. Using geometric morphometric techniques, in addition to three-dimensional images, we analyzed the variation in external morphology found in tadpole populations from different ecomorphological guilds and whether this variation is associated with the spatial distance between populations along their geographic distribution. In addition, through three-dimensional models, we analyzed the morphological variations presented by the brain of tadpoles from three different guilds and whether the observed morphological variations could be associated with these guilds. Our results indicate that the external morphology of tadpoles presents a spatial correlation for all species analyzed with the exception of *Rhinella diptycha*.

As for the brains, we observed a variation above the expected, mainly for the regions of the cerebellum, optic tectum and diencephalon. We also observed that these variations are associated with guilds and brain size.

**Key words:** Tadpoles. Morphology. Micro computed tomography ( $\mu$ CT). Ecomorphological guilds. Spatial patterns.

## **Lista de Figuras**

<b>Figure 1.</b> Graphical representation of a tadpole of Scinax showing the locations of 33 landmarks. ....	34
<b>Figure 2.</b> Multivariate regression between the sampled species.....	42
<b>Figure 3.</b> Canonical variates analyses (CVA).....	76
<b>Figure 4.</b> Multivariate regression between the sampled species.....	77
<b>Figure 5.</b> Relationship between brain size and total length. ....	77
<b>Figure 6.</b> Relationship between cerebellum volume and brain size. ....	78
<b>Figure 7.</b> Relationship between brain volume and brain size. ....	79

## Lista de Tabelas

<b>Table 1.</b> Principal Component Analysis (PCA) table, showing correlation coefficients for variables on the 3 PCs extracted from the analysis of data. ....	36
<b>Table 2.</b> Percentage of variation explained by each canonical axis. ....	38
<b>Table 3.</b> P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups for <i>B. albopunctata</i> . ....	38
<b>Table 4.</b> P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups for <i>P. cuvieri</i> . ....	39
<b>Table 5.</b> P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups for <i>R. diptycha</i> . ....	40
<b>Table 6.</b> P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups for <i>D. minutus</i> . ....	40
<b>Table 7.</b> P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups for <i>S. fuscovarius</i> . ....	41
<b>Table 8.</b> P-values from permutation tests (10000 permutation rounds) for Mahalanobis distances among groups for <i>T. typhoni</i> . ....	41

## Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. CAPÍTULO 1: Intraspecific morphological variation tadpoles along of the geographic distribution .....	30
3. CAPÍTULO 2: Brain variation in tadpoles of different ecomorphological guilds...	66
4. CONCLUSÃO GERAL.....	91

## 1. INTRODUÇÃO

As análises de dados morfológicos têm sido cruciais para o avanço da biologia comparativa, melhorando a compreensão sobre uma infinidade de processos ecológicos e evolutivos (Ricklefs & Miles, 1994). A morfologia é, sem dúvida, um dos principais componentes do fenótipo de um organismo (Adams et al., 2004). Assim, os traços morfológicos sempre estiveram no centro das atenções da pesquisa biológica, constituindo importantes evidências para uma ampla variedade de campos de investigação. Dessa forma da taxonomia tradicional à escola moderna de sistemática, passando pela fisiologia, desenvolvimento, ecologia, biogeografia e até a biologia evolutiva moderna, praticamente todos os campos biológicos incluem questões e hipóteses relacionadas a como a variação morfológica surge e como ela é distribuída no tempo e na escala espacial (Kaliontzopoulou, 2011).

Ainda não está claro como e por que a variação fenotípica é estruturada geograficamente em espécies amplamente distribuídas, especialmente em regiões tropicais (Monteiro et al., 2003; Alvarado-Serrano et al., 2013; Maestri et al. 2016). Uma compreensão da variação morfológica e sua estrutura espacial é de importância crucial para questões fundamentais em biologia evolutiva, e pode ajudar em questões sistemáticas e decisões de conservação (Thomassen et al., 2010; Zamudio et al., 2016; Wood et al., 2017; Cadotte & Tucker, 2018; Morales et al., 2021). O padrão espacial de distribuição de um taxon é definido pelo arranjo de entidades individuais no espaço e as relações geográficas entre elas. A capacidade de avaliar padrões espaciais é um pré-requisito para entender os complicados processos espaciais subjacentes à distribuição de um fenômeno (Chou, 2005).

Dessa forma, nos últimos anos, tem-se reconhecido que a variação morfológica e genética entre populações também deve ser investigada em um contexto espacial (Diniz-Filho

et al., 2000). Isso porque, ao longo de sua distribuição geográfica, uma espécie pode enfrentar ambientes distintos e pressões seletivas, o que pode gerar descontinuidades nas características genóticas e fenóticas entre diferentes populações (Trevisan et al. 2014), levando a diferentes estruturas de variação morfológica (Berthouly-Salazar et al., 2012). Assim, mesmo espécies intimamente relacionadas e com estratégias de história de vida semelhantes podem variar em grau e estrutura geográfica de variação morfológica e diferir em padrões de distribuição geográfica (Hopkins & Thurman, 2010; Lezcanon et al., 2012).

A variação intraespecífica pode ser definida como a variação total de uma determinada característica morfológica (ou conjunto de características) expressa por indivíduos de uma mesma espécie (Albert et al., 2011). As causas da variação intraespecífica dependem de uma variedade de mecanismos, incluindo adaptação local, seleção artificial, condições parentais e plasticidade fenotípica (Violle et al, 2012; Des Roche et al, 2018). A plasticidade fenotípica é a capacidade de um organismo de alterar sua fisiologia e/ou morfologia como resultado de sua interação com o meio ambiente, sendo bastante comum em girinos (McIntyre et al., 2004). Então, quando gerada por mecanismos evolutivos, a variação de características intraespecíficas pode refletir adaptação microgeográfica, seleção divergente e até especiação incipiente (Mimura et al., 2017). Quando gerados pela plasticidade, os traços podem mudar rapidamente dentro de gerações e diferir drasticamente entre populações em habitats diferentes (Des Roche et al., 2018). Além disso, a ocorrência de variação nos caracteres morfológicos é relativamente comum em organismos amplamente distribuídos e, portanto, suas populações são geograficamente segregadas (West-Eberhard et al., 1989; Des Roches et al., 2013; Des Roches et al., 2018).

A variação geográfica entre populações de uma determinada espécie é um resultado inevitável da variação espacial no ambiente, impulsionada pela divergência genética e/ou plasticidade fenotípica (Mayr, 1977). Portanto, variações fenotípicas, refletindo as pressões

seletivas que atuam nas populações (Hopkins & Thurman, 2010), podem mostrar claramente padrões morfológicos criados por essas pressões na distribuição geográfica das espécies (Hopkins & Thurman, 2010; Lezcano et al., 2012; Trevisan et al., 2014; Hošková et al., 2020). Por outro lado, algumas espécies tendem a possuir padrões espaciais diferentes. Por exemplo, complexos de caracteres morfológicos usualmente distinguidos em abelhas tendem a apresentar diferentes padrões espaciais em grandes escalas. Assim, caracteres de tamanho são caracterizados por fortes padrões espaciais de longa distância, já os ângulos de pigmentação e venação das asas são caracterizados pela ausência desses padrões de grande escala, e os caracteres podem possuir autocorrelação local e regional mais forte, provavelmente refletindo os principais processos microevolutivos que provavelmente determinam sua variação no espaço (Diniz-Filho et al., 2000).

Dessa forma, a variação morfológica intraespecífica está no centro da teoria da evolução. Mais recentemente, tem grande importância também no âmbito de estudos interessados em variação neutra (Sokal et al., 1989; Barbuji, 2000; Relethford, 2008). Isso se deve ao fato de que a maioria dos processos evolutivos neutros ocorrem em um contexto espacial (Epperson, 2003), onde a variação genética originada por mutações aleatórias dentro de populações locais pode se dispersar por meio de fluxo gênico mediado geograficamente (Perez et al., 2010). Os padrões de variação morfológica entre populações fornecem material fundamental para a compreensão do papel da diferenciação genética e da seleção natural na especiação e adaptação dos organismos (Van Buskirk, 2017). Desta forma, a variação intraespecífica pode mediar a coexistência de espécies (Turcotte & Levine, 2016).

As primeiras tentativas de caracterizar geometricamente as diferenças entre formas biológicas foi realizada por Albrecht Durer (*Vier Bucher von Menschlicher Proportion*, 1524), responsável pela primeira caracterização geométrica da forma humana sobre uma grade sobreposta, inclusive antes da noção sobre as coordenadas retangulares propostas por

Reneé Descartes (Monteiro & Reis, 1999). Grandes pensadores como Galileu (1638) ilustraram as diferenças na forma de ossos de animais, e ao longo do tempo, grandes naturalistas como Darwin têm fundamentado suas teorias com base em observações nas diferenças das formas biológicas. No início do século 20, a biologia passou de um campo descritivo, para uma ciência quantitativa, e as análises morfológicas entraram na chamada “revolução quantitativa” (Bookstein, 1998). Durante muitos anos pesquisadores buscaram técnicas que permitissem quantificar estatisticamente a variação de forma de organismos e/ ou estruturas até que na década de 1980 houve o surgimento da Morfometria Geométrica (MG), técnica que permite analisar a forma dos organismos ou de determinada estrutura considerando o espaço de forma geométrica e usando métodos estatísticos multivariados (Souto et al., 2021).

A morfometria geométrica (GM) revolucionou a forma de medir, estudar e perceber a diversidade morfológica (Rohlf & Marcus, 1993; Adams et al., 2004). Ao preservar as propriedades geométricas das estruturas de interesse e estabelecer uma base matemática sólida para o estudo da forma, a morfometria geométrica fornece uma ferramenta poderosa para representar e estudar a variação morfológica de forma mais realista e integrada (Bookstein, 1991; Rohlf, 2000). Além disso, esse método captura diferenças de forma mais sutis que geralmente não são recuperadas em medições lineares (Ilić et al., 2019). Em função disso, a morfometria geométrica tem sido amplamente utilizada para estudar a variação intraespecífica em vários grupos taxonômicos, como morcegos (Schmieder et al., 2015), besouros (Benitez et al., 2020), caranguejos (Hampton et al., 2014), cobras (Huntley et al., 2021), lagartos (Kaliontzopoulou et al., 2010), além de estudos com plantas (Dalastra et al., 2021) e vários outros grupos.

Os anfíbios, sendo excelentes organismos modelo, têm sido objeto de extensa pesquisa morfológica, servindo muitas vezes como casos paradigmáticos no estudo da variação

fenotípica (Kaliontzopoulou, 2011; Baldo et al., 2014; Barrionuevo, 2020; Lopes et al., 2020; Quinzio & Goldberg, 2020). Paralelamente aos anuros adultos, os girinos anuros se diversificaram em uma ampla gama de habitats aquáticos e terrestres e incluem uma grande diversidade de ecomorfotipos (Ilić et al., 2019). Os girinos apresentam uma gama diversificada de adaptações morfológicas e comportamentais, diferenças no tempo de desenvolvimento, tamanho na metamorfose e nos aspectos fisiológicos, tanto em resposta às características físicas do ambiente (Eterovick & Barata, 2006; Eterovick et al., 2010) e/ou em resposta à presença de predadores e competidores (Releya, 2001; Michel, 2012).

Estudos abrangendo variação morfológica em girinos são escassos na literatura (e.g. Conte et al., 2007; Provet et al., 2013; Pezzuti et al., 2016), e podem ajudar a avançar a nossa compreensão sobre a influência do ambiente e da filogenia na variação morfológica e no desenvolvimento da fase larval. A escassez de informações acerca do grau de variação morfológica intra- e interpopulacional, é uma das grandes dificuldades encontradas em estudos de ecologia de comunidades de anuros (Verdade et al., 2012; Toledo et al., 2014). Jordani et al. (2018) apresentou a primeira quantificação da variação morfológica intraespecífica de girinos, com base em oito características funcionais de 22 espécies da Mata Atlântica e de 13 espécies da Floresta Amazônica . Apesar de algumas características apresentarem grande variação intraespecífica, considerando todas as características juntas, a variabilidade intraespecífica foi de cerca de 30% da variação total, menor que a interespecífica, tanto para girinos da Mata Atlântica quanto para os da Floresta Amazônica (Jordani et al., 2018). Vários estudos mostraram que essa porcentagem de variação morfológica intraespecífica pode ter um papel importante nos padrões de diversidade e na estrutura da comunidade (Jung et al., 2010; Albert et al., 2012). Além disso, a plasticidade fenotípica em girinos pode resultar em variação morfológica significativa entre populações de diferentes os ambientes e, conseqüentemente, aumentar a variabilidade morfológica entre as

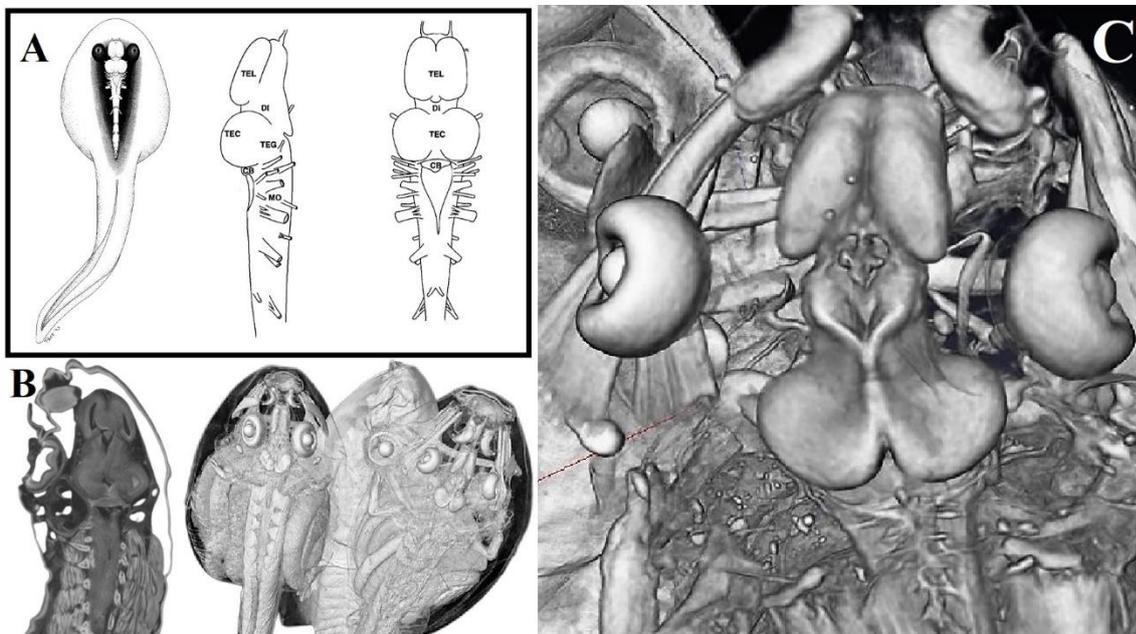
populações de girinos (Marques & Nomura, 2015). Assim, diferentes fatores ambientais, como tamanho da área úmida, estresse por perda de água, densidade de girinos, disponibilidade de recursos alimentares, presença e densidade de predadores, entre outros, são capazes de induzir mudanças morfológicas que aumentam a variação intraespecífica (Van Buskirk, 2017; Touchon e Robertson, 2018).

Rossa-Feres et al. (2015) reconheceram que a compreensão dos fatores que controlam a variação morfológica é uma das lacunas de conhecimento mais importantes nos estudos sobre o estágio larval. Compreender quais fatores estão associados à plasticidade fenotípica e como eles influenciam a variação morfológica em sistemas naturais, além do grau de variação morfológica inter e intraespecífica em diferentes escalas espaciais, são necessários para formular melhores hipóteses ecológicas.

Também é uma lacuna de conhecimento a avaliação da relação entre as estruturas anatômicas das larvas e suas respectivas funções (Rossa-Feres et al., 2015). Muitas das informações disponíveis sobre o assunto são derivadas de estudos realizados principalmente com *Xenopus laevis*, e em alguns casos com girinos dos gêneros *Rana* e *Bufo*, e adotadas como padrão para a maioria das espécies (Vera Candiotti, 2006).

Um girino é um mosaico de órgãos que são remodelados como o pâncreas exócrino e o trato digestivo, degenerados durante a metamorfose (e.g. tegumento), permanecem funcionalmente em repouso (e.g. partes do sistema excretor e reprodutivo), ou são funcionais tanto em girinos como nos adultos embora possam apresentar funções distintas nas diferentes fases (e.g. pulmão, Altig & McDiarmid, 1999). Em vários casos como o do sistema nervoso, as informações são escassas e fragmentadas (Quinzio & Fabrezi, 2018). O sistema nervoso, constituído pelo cérebro e seus nervos cranianos (Figura 1) e pela medula espinhal e seus nervos, está associado a todos os comportamentos dos vertebrados (Lanoo, 1999).

Um excelente resumo sobre a neurobiologia de anfíbios, incluindo estruturas adultas, é fornecido por Wilczynski (1992). Outros estudos abordaram o crescimento do cerebelo (e.g. Hauser et al. 1986, a,b). Uray et al. (1987) descreveu as mudanças do sistema nervoso durante o processo de metamorfose. Mais recentemente, pesquisadores têm mostrado que apesar de estudos associando genes a doenças serem realizados principalmente em camundongos, os girinos também podem fornecer evidências muito fortes sobre a função de genes em humanos. Sendo o processo de recriar algumas variantes de um gene em girinos bem mais simples e mais rápido (Macken et al., 2021).



**Figura 1:** A. Vista dorsal do cérebro e da medula espinhal em um girino. Os nervos cranianos e espinhais são mostrados como se tivessem sido cortados (imagem de Lannoo em Altig & McDiarmid, 1999). B. Imagem segmentada e renderizada do sistema nervoso em girinos. C. Renderização da imagem com destaque para o cérebro. \*CB= cerebellum; TEC= tectum; DI= diencephalon; TEL= telencephalon.

Além da escassez e fragmentação das informações sobre o sistema nervoso, o significado funcional e evolutivo das variações no cérebro dos girinos ainda não foi investigado (Altig & McDiarmid, 1999), talvez pelo fato do sistema nervoso ser considerado um sistema anatômico invariável (Quinzio & Fabrezi, 2018). Entretanto o cérebro dos girinos

das diferentes espécies não é igual, e estão disponíveis poucas informações básicas sobre a organização e funcionamento do sistema nervoso como, por exemplo, como se dá a integração do desenvolvimento com a diferenciação do sistema nervoso, e como ele é alterado para atender às demandas de diferentes ambientes (Quinzio & Fabrezi, 2018). Para outros grupos, como os Primatas, há evidências para uma associação entre o tamanho do cérebro e variáveis ecológicas, como às demandas de forrageamento do nicho ecológico de uma espécie (Powell et al., 2017).

A diversidade morfológica entre girinos de diferentes espécies é imensa, bem como os tipos de habitats aquáticos e semiaquáticos onde ocorre seu desenvolvimento. Uma relação ecomorfológica usualmente aceita é aquela entre a morfologia externa e a profundidade da coluna d'água ocupada pelos girinos. Assim, girinos bentônicos ocupam o fundo dos ambientes aquáticos, e apresentam corpo deprimido, olhos dorsais e nadadeiras baixas, girinos nectônicos ocupam o meio da coluna d'água e tem corpo comprimido, olhos laterais e nadadeiras altas, e girinos neustônicos se alimentam no filme d'água e se posicionam próximo à superfície, apresentam corpo comprimido, olhos laterais, nadadeira dorsal baixa e nadadeira ventral alta, além de disco oral terminal ou dorsalmente direcionado. Apesar de proposta há bastante tempo (Altig, 1989) e ser considerada como uma associação comprovada, a relação entre a morfologia externa e a profundidade da coluna d'água ocupada pelos girinos começou a ser testada apenas recentemente (Marques et al., 2019). Apesar da profundidade da coluna d'água ocupada requerer diferentes habilidades dos girinos, como fluabilidade, percepção do habitat e de possíveis predadores em duas (girinos bentônicos) ou em três dimensões (girinos nectônicos), até hoje nenhum estudo avaliou a relação do uso diferencial do espaço com o sistema nervoso.

Considerando a ausência de informações básicas e estudos com ampla abrangência geográfica acerca das variações morfológicas, assim como sobre a organização e

funcionamento de órgãos e sistemas, e como eles são modificados para atender às demandas de diferentes tipos de ambiente e do uso diferencial da profundidade da coluna d'água, esta tese está estruturada em dois capítulos.

No primeiro capítulo buscamos determinar a variação em caracteres da morfologia externa em girinos de seis espécies com ampla distribuição geográfica, verificando se existem padrões associados à distância entre populações ao longo da distribuição geográfica das espécies alvo.

No segundo capítulo, nosso objetivo foi caracterizar o sistema nervoso central de girinos bentônicos e nectônicos, buscando verificar sua associação com o uso da coluna d'água.

## 6. References

- AHMED, N.I. et al. Brain morphology of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) varies inconsistently with respect to habitat complexity: A test of the clever foraging hypothesis. *Ecology and Evolution* 7: 3372-3380, 2017.
- ALTIG, R. & JOHNSTON, G.F.S. Guilds of Anuran Larvae: Relationships among Developmental Modes, Morphologies, and Habitats. *Herpetological Monographs* 3: 81, 1989.
- ALTIG, R. & R.W. MCDIARMID. Body plan: development and morphology. Pp. 24-51 In *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. McDiarmid, R.W., and R. Altig (Eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, 1999a.
- AXELROD, C. et al. Interspecific and intraspecific comparisons reveal the importance of evolutionary context in sunfish brain form divergence. *Journal of Evolutionary Biology* 34:639-652, 2021.
- AXELROD, C. J. et al.2. Intraspecific brain size variation between coexisting sunfish ecotypes. *Proceedings of the Royal Society. B, Biological Sciences*, 285, 2018.
- BOLHUIS, J.J. & MACPHAIL, E.M. A critique of the neuroecology of learning and memory. *Trends in Cognitive Science* 5: 426-432, 2001.
- BURNS, J.G. & RODD, H. Hastiness, brain size and predation regime affect the performance of wild guppies in a spatial memory task. *Anim. Behav.* 76: 911-922, 2008.
- BUTLER, A.B. & HODOS, H. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*, 2005.
- EAGLESON, G.W. & HARRIS, W.A. Mapping of the presumptive brain regions in the neural plate of *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 21(3), 1990.
- FREEMAN, J.A. Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *Journal of Neurophysiology* 38(2): 356-68, 1975.
- Fischer, S. et al. Rearing-group size determines social competence and brain structure in a cooperatively breeding cichlid. *The American Naturalist* 186: 123-140, 2015.

- GARAMSZEGI, L.Z. & EENS, M. The evolution of hippocampus volume and brain size in relation to food hoarding in birds. *Ecology Letters* 7: 1216-1224, 2004.
- GONDA, A. et al. Adaptive brain size divergence in nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*)? *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1721-1726, 2009.
- GONDA, A. et al. Predation and competition-mediated brain plasticity in *Rana temporaria* tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 2300-2308, 2010.
- GONDA, A. et al. Population variation in brain size of nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*) - Local adaptation or environmentally induced variation? *BMC Evolutionary Biology* 11, 2011.
- GONZÁLEZ, A. et al. The Organization of the Central Nervous System of Amphibians *Evolutionary Neuroscience*. Amsterdam, 2020.
- HUBER, R. et al. Microhabitat use, trophic patterns, and the evolution of brain structure in African cichlids. *Brain Behavior Evolutionary* 50(3): 167-82, 1997.
- LANOO, M.J. Integration Nervous and Sensory Systems. In *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. McDiarmid, R.W., and R. Altig (Eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, 1999.
- LEDÓN-RETTIG, C.C. & RAGSDALE, E.J. Physiological mechanisms and the evolution of plasticity. In. D.W. Pfennig (Ed.), *Phenotypic plasticity & evolution: Causes, consequences, controversies*, 2021.
- LIAO, W.B. et al. Evolution of anuran brains: disentangling ecological and phylogenetic sources of variation. *Journal of Evolutionary Biology* 28: 1986-1996, 2015.
- KIECKER, C. & LUMSDEN, A. Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 553- 564, 2005.
- KIHSLINGER, R.L. et al. Environmental rearing conditions produce forebrain differences in wild Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145(2): 145-151, 2006.

- KLINGENBERG, C.P. & MONTEIRO, L.R. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology* 54(4): 678-688, 2005.
- KOTRSCHAL, K. et al. Fish brains: evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8: 373-408, 1998.
- LECCHINI, D. et al. Variation in brain organization of coral reef fish larvae according to life history traits. *Brain, Behavior and Evolution* 83: 17-23, 2014.
- LEFEBVRE, L. et al. Brains, innovations and evolution in birds and primates. *Brain Behavior and Evolution* 63: 233-246, 2004.
- MANZANO, A.S. et al. Variation in brain anatomy in frogs and its possible bearing on their locomotor ecology. *Journal Anatomy* (1):38-58, 2017.
- MCCLELLAND, S.J. & WOODLEY, S.K. Developmental exposure to trace concentrations of chlorpyrifos results in nonmonotonic changes in brain shape and behavior in amphibians. *Environmental Science & Technology* (13): 9379-9386, 2022.
- NIEUWENHUYS, R. et al. *The Central Nervous System of Vertebrates*, 1998.
- NORTHCUTT, R.G. et al. Olfactory bulb projections in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Journal of Morphology* 3: 251-267, 1975.
- ORTON, G.L. The systematic of vertebrates larvae. *Systematic Zoology* 2: 63-75, 1953.
- POLLEN, A.A. et al. 2007. Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain, Behavior and Evolution* 70: 21-39, 2007.
- QUINZIO, S.I. & M. FABREZI. The peripheral nerves of *Lepidobatrachus* tadpoles (Anura, Ceratophryidae). *Journal of Morphology* 280(5):1-16, 2018.
- ROT-NIKCEVIC, I. et al. The influence of visual and tactile stimulation on growth and metamorphosis in anuran larvae. *Functional Ecology* 19(6): 1008-1016, 2005.
- ROSSA-FERES, D.C. et al. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Zoologia* 21(4): 745-754, 2004.

- ROSSA-FERES, D.C. & NOMURA, F. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica* 6:1-26, 2006.
- RUSHTON, J.P. & ANKNEY, C.D. Whole brain size and general mental ability: a review. *International Journal of Neuroscience* 119: 691-731, 2009.
- RUTKOSKI, C.F. et al. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Chemosphere*, 2020.
- SAFI, K. & DECHMANN, D.K. Adaptation of brain regions to habitat complexity: a comparative analysis in bats (Chiroptera). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272:179-186, 2005.
- SPIRHANZLOVA, P. et al. Short- and Long-Term Effects of Chlorpyrifos on Thyroid Hormone Axis and Brain Development in *Xenopus laevis*. *Neuroendocrinology*, 2022.
- STRIEDTER, G.F. *Principles of Brain Evolution*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, 2005.
- SOL, D. et al. Brain size predicts the success of mammal species introduced into novel environments. *American Naturalist* 172: S63-S71, 2008.
- TAYLOR, G.M. et al. Brain regions and encephalization in anurans: adaptation or stability? *Brain, Behavior and Evolution* 45(2):96-109, 1995.
- TOOLEY, U.A. et al. Environmental influences on the pace of brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 22: 372-384, 2021.
- TROKOVIC, N. et al. Brain plasticity over the metamorphic boundary: carry-over effect of larval environment on froglet brain development. *Journal of Evolutionary Biology* 24(6):1380-5, 2011.
- VAN DIJK, D.E. The behaviour of southern African anuran tadpoles with particular reference to the ecology and related external morphological features. *Zool. Afr.* 7: 49-55, 1972.

- YOPAK, K.E. et al. Exploring adaptive evolution in the brains of bathyal skates (family: Rajidae): phylogenetic and ecological perspectives. *Brain, Behavior and Evolution* 75:316, 2010.
- YOPAK, K. & LISNEY, T.J. Allometric scaling of the optic tectum in cartilaginous fishes. *Brain Behav Evol* 80, 108-126, 2012.
- YOST, E.E. et al. Estimating the Potential Toxicity of Chemicals Associated with Hydraulic Fracturing Operations Using Quantitative Structure-Activity Relationship Modeling. *Environ Sci Technol*, 2016.
- ZELDITCH, M.L. et al. Geometric morphometrics for biologists: a primer. London: Academic Press, 2004.
- WEST, R.J.D. The evolution of large brain size in birds is related to social, not genetic, monogamy. *Biological Journal of the Linnean Society* 111 (3) 668-678, 2014.
- WITELSON, S.F. et al. Intelligence and brain size in 100 post-mortem brains: sex, lateralization and age factor. *Brain* 129:386-398, 2006.
- WILSON, A.D.M. & MCLAUGHLIN, R.L. Foraging behaviour and brain morphology in recently emerged brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Behav. Ecol. Sociobiology* 64: 1905-1914, 2010.
- WILCZYNSKI, W. Evolution of the Brain in Amphibians. In: Binder, M.D., Hirokawa, N., Windhorst, U. (eds) *Encyclopedia of neuroscience*. Springer, Berlin, 2009.
- WOODLEY, S.K. et al. Exposure to sublethal concentrations of a pesticide or predator cues induces changes in brain architecture in larval amphibians. *Oecologia*, 179(3), 655-665, 2015.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

A variação morfológica sempre despertou a atenção de pesquisadores de várias áreas da biologia. Sua compreensão e de sua estrutura espacial é de importância crucial para questões fundamentais em biologia evolutiva, e pode ajudar em questões sistemáticas e decisões de conservação. Por utilizarem uma ampla gama de habitats girinos apresentam uma ampla diversidade morfológica, o que pode ocasionar uma gama diferente de soluções adaptativas, sendo assim excelentes modelos para estudos morfológicos e de variação fenotípica. Entretanto existe uma carência em estudos envolvendo variação morfológica, suas origens e distribuição no espaço e no tempo utilizando girinos.

Em nosso primeiro capítulo, nossos dados mostram clara variação na morfologia externa entre as populações das espécies analisadas, cinco (*Boana albopunctata*, *Dendropsophus minutus*, *Physalaemus cuvieri*, *Scinax fuscovarius*, e *Trachycephalus typhonius*) delas associadas a distância geográfica. *Rhinella diptycha* foi a única espécie analisada que não apresentou correlação entre o grau de variação morfológica e a distância geográfica. Espécies amplamente distribuídas geralmente tendem a apresentar considerável variação dentro de suas áreas de distribuição, o que pode ter implicações na história taxonômica das espécies, dificultando a identificação correta das espécies e transformando variações intrapopulacionais em diferenças diagnósticas.

Algumas espécies como *Physalaemus cuvieri* apresentaram grande sobreposição entre as populações amostradas. Outras como *Trachycephalus typhonius* apresentaram segregações claras entre as populações.

Nosso segundo capítulo trouxe informações sobre a morfologia e a variação observada no cérebro e cerebelo das espécies *Dendropsophus minutus*, *Physalaemus*

*cuvieri* e *Rhinella diptycha*. Essa análise é inédita para girinos no Brasil. Com isso podemos observar diferenças morfológicas entre as espécies, demonstrando que o cérebro dos girinos não são todos iguais e, também, que apresentam variações intraespecíficas. Nossos dados mostraram também que os girinos de *Dendropsophus minutus* apresentaram cérebros maiores que as outras espécies analisadas, e que o tamanho do cérebro não está correlacionada com o comprimento total dos indivíduos.

Não observamos relação entre o volume do cerebelo com o tamanho do cérebro, indicando que a variação nessa característica pode estar associada as guildas ecomorfológicas as quais as espécies pertencem. Novamente, girinos de *Dendropsophus minutus*, representantes da guilda nectônica, apresentaram maior volume do cerebelo.

Já quando analisamos o volume do cérebro observamos uma interação entre o tamanho do cérebro e as guildas ecomorfológicas, com o volume do cérebro de *Dendropsophus minutus* aumentando com o tamanho do cérebro. Entretanto essa relação foi observada apenas para essa espécie.

Outra observação interessante foi a indicação de assimetria no cérebro das espécies analisadas. Entretanto ressaltamos que novas análises precisam ser realizadas para corroborar essa observação.

Trouxemos aqui os primeiros esforços para uma melhor compreensão do sistema nervoso dos girinos brasileiros e sua relação com outras variáveis. Ressaltamos, entretanto, que novos estudos precisam ser realizados para um melhor conhecimento da diversidade morfológica, suas relações entre forma e função e associação com uso de ambiente e fatores ambientais.