



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

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

GABRIELA BARONI LEITE

MESTRADO



2016

**PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Biologia
Estrutural**



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

Gabriela Baroni Leite

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

São José do Rio Preto
2016

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Gabriela Baroni Leite

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

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

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

**São José do Rio Preto
2016**

Leite, Gabriela Baroni.

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

97f. : il.

Orientador: Classius de Oliveira

Co-orientadora: Lilian Franco Belussi

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

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

CDU – 597.8

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

Gabriela Baroni Leite

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

BANCA EXAMINADORA

Titulares

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

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

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini
UNESP – Bauru

SUPLENTES

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

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira
UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto
22 de Fevereiro de 2016

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

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

Agradecimentos:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sumário:

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

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

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

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

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

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

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

1. Introdução:

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

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

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

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

1.1. O grupo animal:

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

Atualmente são conhecidas três ordens de anfíbios: Caudata, representada pelas salamandras; Gymnophiona, pelas cobras-cegas e Anura, representada pelos anuros. A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possuem os membros posteriores modificados para o salto (Orr, 1986). Ocorrem em todos os continentes, com exceção da Antártica, com a proporção de 77% das suas famílias com centro de distribuição tropical (Pough et al., 2003). Possuem diferentes hábitos, ocupam ambientes diversificados e não habitam somente regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas (Duellman e Trueb, 1999).

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

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

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

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

Esses animais apresentam porte médio, com cerca de 4 cm de comprimento rostro-cloacal e habitam áreas abertas com ocorrência na região central e sudeste do Brasil, Paraguai e Bolívia (Frost, 2010; Brasileiro et al., 2005) (Figura1b). Os machos vocalizam durante a estação chuvosa em bordas de poças temporárias, e são responsáveis por formar o ninho de espuma batendo com as pernas traseiras na secreção gelatinosa expelida pela fêmea (Brasileiro et al., 2005; Rossa-Feres e Jim, 2001) (Figura 1c).

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

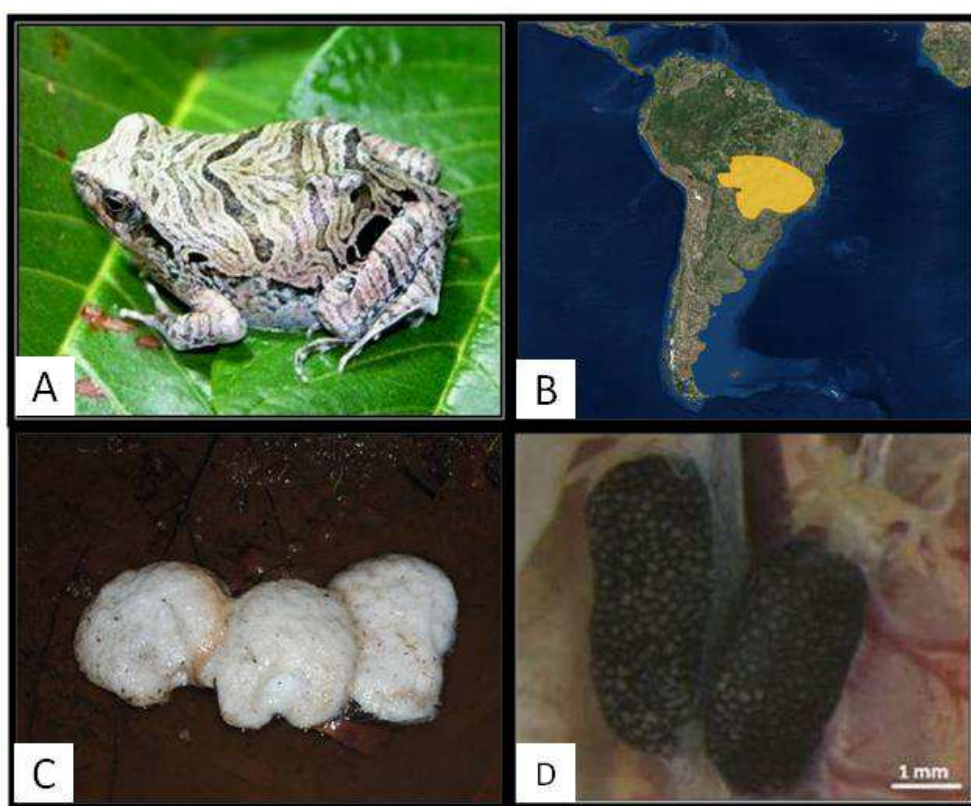


Figura 1: Caracterização da espécie *Physalaemus nattereri*. Espécime vivo (A), distribuição geográfica - <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57267> - (B), ninho de espuma associada a margem - <https://www.herpetofauna.com.br/AnfibiosReproduction.html> - (C), testículos (D).

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

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

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

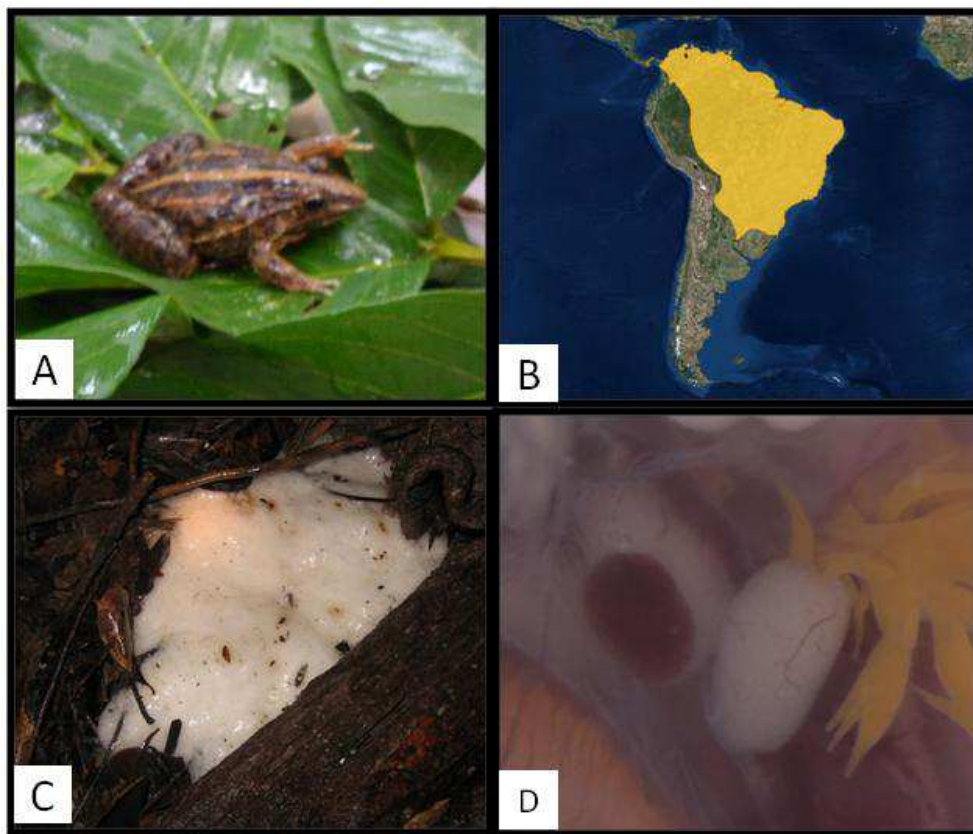


Figura 2: Caracterização da espécie *Leptodactylus fuscus*. Espécime vivo (A), distribuição geográfica - <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57129> - (B), ninho de espuma em câmera subterrânea - <https://www.herpetofauna.com.br/AnfibiosReproduction.html> - (C), testículos (D).

1.2. Coloração em animais ectotérmicos

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

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

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

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

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

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

1.3. Pigmentação visceral

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 - O aparelho reprodutor masculino e espermatogênese

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5. Aspectos do sangue e alterações hematológicas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6. Efeitos da temperatura em anuros

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Objetivos

2.1. Gerais:

- O objetivo do trabalho é avaliar os efeitos sistêmicos da alta temperatura em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*, a fim de descrever alterações hepáticas e testiculares além de efeitos genotóxicos em anuros expostos a altas temperaturas. Em adição, responder perguntas referentes a comparação entre as duas espécies.

2.2. Específicos:

- Avaliar o volume das células pigmentares hepáticas e testiculares frente ao aumento de temperatura, buscando comparar as respostas nas duas espécies;

- Avaliar os efeitos da alta temperatura no metabolismo hepático, medido por meio da quantificação de substâncias catabólicas presentes no fígado; como hemosiderina e lipofuscina;
- Avaliar os efeitos genotóxicos da exposição a altas temperaturas por meio de análises de micronúcleo pelo sangue e desta maneira comparar as espécies, buscando elucidar qual delas é a mais sensível a variação de temperatura;
- Realizar análises morfométricas como, volume dos cistos espermatogênicos em todas as fases da espermatogênese, além dos volumes locais e intersticiais sob a influência hipertérmica, correlacionando com a exposição a altas temperaturas em diferentes tempos experimentais.

3. Material e Métodos

Para os experimentos foram utilizados no total 110 animais sendo 55 exemplares de cada espécie (n=5), capturados na época reprodutiva de 2013 e 2014 no Município de São José do Rio Preto (20°49'12.65"S e 49°22'46.85"W) – São Paulo, Brasil. Os animais foram aclimatados por 7 dias antes do início dos experimentos. Destes 110 animais, 80 exemplares (40 de cada espécie) foram sacrificados. Os 30 restantes (15 exemplares de cada espécie) foram retiradas amostras sanguíneas para o teste de micronúcleo em tempos específicos.

Todos os animais foram coletados sob licença n.18573-1, autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e eutanasiados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) por meio do Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) nº097/2014.

3.1. Experimento de aumento de temperatura

Os animais foram distribuídos em 8 grupos experimentais (n=5): Controle, 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias, sendo os animais tratados dispostos em terrários submetidos à Hipertermia (35,1°C) em câmara incubadora do tipo B.O.D. (Modelo 121 FC). Além disto, o fotoperíodo foi ajustado respeitando o comprimento do dia de 12 horas claro / 12 horas escuro, umidade adequada e alimentados com *Drosophila* *ad libitum*. Cabe esclarecer que a temperatura estipulada foi referente a elevação da temperatura em 30% - medidos em graus Celsius - em relação à temperatura do ambiente (27°C) onde estavam aclimatados, resultando, portanto, uma temperatura de 35,1°C.

Os animais foram sacrificados após cada tempo experimental sendo o grupo controle mantido nas mesmas condições dos animais expostos a altas temperaturas, porém sem alteração da temperatura ambiental e sendo sacrificados após 10 dias de experimentação, sendo este tempo intermediário.

3.2. Processamento do material

Foram coletados dados biométricos como o massa (g) corporal total do animal, e massa (g) dos testículos e fígado para comparar entre os animais tratados durante o mesmo período, em períodos diferentes e com o grupo controle. Além disso, foram realizadas análises macroscópicas e de fotodocumentação utilizando microscópio estereoscópico (Leica MZ16) em programa de captura de imagens (Image Manager-IM50) para as descrições da arquitetura morfológica geral dos testículos e fígado.

Para análises histológicas foi realizada fixação dos fragmentos do testículo e fígado em Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, tampão fosfato pH 7,2 contendo

paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2,5%) por 24 horas, posteriormente destinados a rotina histológica convencional para a microscopia de luz. Cortes (2µm) foram montados em lâminas e corados com hematoxilina/eosina (Bancroft e Gamble, 2002).

3.3. Análises histoquímicas

Para a detecção das substâncias lipofuscina e hemosiderina foram utilizados cortes histológicos de fígado com 2 µm de espessura, em historresina.

Para 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 imersos em solução aquosa de vermelho neutro a 1% seguida de solução aquosa de eosina 1% .

Já 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 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.

3.4. Análises morfológicas e quantitativas

As imagens foram capturadas com câmara (Leica DFC280) acoplada ao sistema de captura (Image Manager-IM50) e analisadas em programa Image Pró-plus versão 6.0. Foram analisadas 25 fotos por animal totalizando 125 fotos por análise e grupo experimental, sendo avaliada a área pigmentada do fígado de ambas as espécies e também dos testículos de *P. nattereri*. A quantificação da área de ocorrência de cada tipo celular pertencente a espermatogênese, além das áreas locais e intersticiais, foram feitas pela

ferramenta polígono do software utilizado onde é possível circular os cistos e lóculos sendo que todas as fotomicrografias estavam aumento de 20x.

3.5. Análise do micronúcleo

A análise da frequência de micronúcleo seguiu o protocolo de Lajmanovich et al., (2014) sendo consideradas anormalidades celulares em hemáceas, como micronúcleos, anucleadas, binucleadas, núcleos lobulados, com formato de rim e células apoptóticas. Porém, neste estudo foi considerado apenas a frequência de micronúcleos.

O teste de micronúcleo foi realizado após a quantificação da melanina no fígado das duas espécies em todos os tempos experimentais e escolhidos dois tempos em que houve pico no volume de melanina, sendo os tempos escolhidos de dois e 10 dias.

Após os tempos experimentais, extensões sanguíneas foram fixadas em metanol a 4° C durante 20 min e posteriormente coradas com solução Giemsa 7,5% por 15 minutos. Foram avaliadas 1000 células por animal em microscópio (Leica DM4000 B), com objetiva de 100x. Os resultados foram expressos em frequência de micronúcleos por 1000 células.

3.6. Análise estatística

Para análises estatísticas foram testadas diferenças entre os parâmetros morfométricos dos testículos, fígado e sangue (Variável resposta) entre as diferentes espécies e em uma mesma espécie entre os tempos experimentais (Variável preditora) foi realizado o teste Two-WayANOVA, com teste *a posteriori* de Tukey. Previamente à análise, testamos o pressuposto de normalidade e homogeneidade.

Caso os dados não fossem normais ou apresentassem heterogeneidade de variância, os mesmos foram transformados utilizando raiz quadrada ou log. Todos os testes foram conduzidos no software R versão 3.2.2 (R Development Core Team. 2015).

4. Resultados

Os resultados foram agrupados em dois capítulos sendo o primeiro a apresentação dos efeitos nos pigmentos hepáticos e efeitos genotóxicos frente à hipertermia. Já no segundo capítulo foram relatados os efeitos da alta temperatura em melanócitos testiculares e células germinativas masculinas.

5. Referências Bibliográficas

Agius, C. 1980. Phylogenetic Development of Melano-Macrophage Centers in Fish. *Journal of Zoology*. 191:11-31.

Agius, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melamacrophages of teleost hematopoietic tissues and age-related changes. *Developmental and Comparative Immunology*. 5:597:606.

Agius, C.; Agbede, S.A. 1984. An electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology, Malden*. 24:471-488.

Agius, C., Roberts, R.J. 2003. Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Patology. *Journal of Fish Biology*. 26:499-509.

Aichinger, M. 1987. Annual activity patterns of anurans in the seasonal neotropical environment. *Oecologia*. 71:583-592.

Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343:121 - 135.

Angilletta M. J., Niewiarowski P. H., Navas C. A. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.* 27:249-268.

Anitha, B., Chandra, N., Gopinath, P.M., Durairaj, G., 2000. Genotoxicity evaluation of heat shock in goldfish (*Carassius auratus*). *Mutat. Res.* 469:1–8.

Araujo, M. B., Guisan, A. 2006. Five (or so) challenges for species distribution modelling. *33*:1677-1688.

Arikan H., K. Çiçek 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-western Journal of Zoology.* 10:190-209.

Artacho, P., M. Soto-Gamboa, C. Verdugo & R.F. Nespolo. 2007. Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of an endangered blacknecked swan population. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 147:1060-1066.

Atatür, M.K., Arikan, H., Çevik, I.E. 1999. Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey. *Turk. J. Zool.* 23:111-114.

Bancroft, J. D.; Gamble, M. 2002. *Theory & Practice of Histological Techniques*. 5th Edition. 793pp, ISBN: 0-443-06435-0.

Bagnara, J., Matsumoto, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in non-mammalian tissues: In: Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Ortonne, J.P. (Eds) *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. Oxford University Press. New York. 9-40.

Báo, S.N., Dalton, G.C., Oliveira, S.F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA, Journal of Morphology. 207:303-314.

Baraquet, M., Salas, N.E., Martino, A.L. 2013. C-banding patterns and meiotic behavior in *Hypsiboas pulchellus* and *H. cordobae* (Anura, Hylidae). BAG 24: 32-39.

Barni S., Bertone V., Croce A.C., Bottiroli G., Bernini F., Gerzeli G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. J Anat. 195:19-25.

Barni S., Boncompagni E., Grosso A., Bertone V., Freitas I., Fasola M., Fenoglio C. 2007. Evaluation of *Rana esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. Aquat. Toxicol. 81:45-54.

Barni S., Vaccarone R., Bertone V., Frascini A., Bernini F., Fenoglio C. 2002. Mechanism of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. Journal of Anatomy. 200:185-194.

Blaustein, A.R., Walls S.C., Bancroft B.A., Lawler J.J., Searle C.L., Gervasi S.G. 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. Diversity 2: 281-313.

Blaustein, A.R., Wake, D.B. 1995. Declive de las poblaciones de anfibios. Investigación e Ciencia. p.8-13.

Boaratti, A.Z., Silva, F.R. 2015. Relationships between environmental gradients and geographic variation in the intraspecific body size of three species of frogs (Anura). 40:869-876.

Bonassi, S. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. PMID: 16973674: Carcinogenesis, 28:625–631.

Brasileiro, C.A., Sawaya, R.J., Kiefer, M.C., Martins, M. 2005. Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica*. 5:1-17.

Cabagna, M. C., Lajmanovich, R.C., Stringhini, G. A., Sanchez-Hermandes, J. C., Peltzer, P. M. 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in the agroecosystems of Santa Fe province, Argentina. – *Applied Herpetology*, 2:373-380.

Cabagna Zenklusen, M.C., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Fiorenza Binucci, G., Basso, A. 2014. Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros. Museo Provincial de Ciencias Naturales “Florentino Ameghino”. 18:1-16.

Callard, I.P., Callard, G.V., Lance, V., Bolaffi, J.L., Rosset, J.S. 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biology of Reproduction*, 18:16-43.

Carey, C. 2005. How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. *Integrative and Comparative Biology* 45:4–11.

Caro, T. 2005. Antipredator Defenses in Birds and Mammals, The University of Chicago Press, London, UK.

Cavicchia, J. C., Moviglia, G.A. 1983. The blood-testis barrier in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): a freeze-fracture and lanthanum tracer study. *The Anatomical Record*. 205:387-396.

Cei, J.M. 1980, Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano, Monografia* 2, 609p.

Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., Bonassi, S. 2010. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutation Research*. 705:11-19.

Cianciarullo, A.M.; Bertho, A.L., Meirelles, M.D. 2000. Mitochondrial kinetics during amphibian erythropoiesis related to haeme synthesis. *Cell Biol. Int.* 24:183 - 192.

Cicero R., Scalia M., Sinatra F., Zappala C. 1977. Changes in the Melanin Content in the Kupffer Cells of *Rana esculenta* L. Induced by Parenteral Administration of Heme. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*. 53:764-769.

Clark, E.R., Clark, E.L., Rex, R.O. 1936. Observations on polymorphonuclear leukocytes in the living animal. *Am. j. anat.* 59:123-173.

Corsaro C., Scalia M., Leotta M., Mondio F., Sichel G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. *J Anat* 196:249–261.

Davis A. K., Maney D. L., Maers J. C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. – *Functional Ecology*, 22:760-772.

Dawson, J., Patei, F., Griffiths, R.A., Young, R.P. 2015. Assessing the global zoo response to the amphibian crisis through 20-year trends in captive collections. *Conservation Biology*. doi: 10.1111/cobi.12563

De Abreu Manso, P.P., de Brito-Gitirana, L., Pelajo-Machado, M. 2009. Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Cell Tissue Res.* 337:301-312.

Duellman, W. E., Trueb, L. 1999. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-hill. 405p.

Edmunds, M. 1974. *Defence in Animals: A Survey of Anti-Predator Defences*, Longman, New York, NY, USA.

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 Fish Biology*. 8:67-78.

Endler, J.A. 1987. A predator's view of animal color patterns. *Evolutionary Biology*, 11:319–364.

Farias. C.F., Carvalho-E-Silva, S. P., Brito-Gitirana, L. 2002. Bidder's organ of *Bufo ictericus*: a light and electron microscopy analysis. *Micron* 33: 673-679.

Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanesi, G., Barni, S. 2005. Effects of Environmental Pollution on the Liver Parenchymal Cells and Kupffer-Melanomacrophagic Cells of the Frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60:259–268.

Flores, M., Yamaguchi M. U. 2009. Teste do Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde e Pesquisa* 1.3: 337-340.

Forbes, M.R., McRuer, D.L., Shutler, D. 2006. White blood cell profiles of breeding American toads (*Bufo americanus*) relative to sex and body size. *Comp. Clin. Pathol.* 15: 155 - 159.

Franchi, E., Camatini, M., De-Curtis, I. 1982. Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. *Journal of Ultrastructure Research*. 80: 253-263.

Franco-Belussi L., Leite G. B.; Freitas J. S., Oliveira C. 2014. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Animal Biology*. In press.

Franco-Belussi L., Santos L.R.S., Zieri R., Oliveira C. 2011. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): occurrence and comparison. *Zoologischer anzeiger*. 250,102-110.

Franco-Belussi, L., Zieri, R., Santos, L. R. S., Moresco, R.M., Oliveira, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 292:178-182.

Franco-Belussi, L. Castrucci, A.M.L., Oliveira, C. 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle 4, D-Phe 7- α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology* 116:316–324.

Frangioni, G., Borgioli, G., Bianche, S., Pillozzi, S. 2000. Relationships Between Hepatic Melanogenesis and Respiratory Conditions in the Newt, *Triturus carnifex*. *Journal of Experimental Zoology*. 287:120-127.

Frost. 2010. Amphibian species of the world, 5.4, an online reference. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>.

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*. 15:32-40.

Glomski, C.A.; Tamburlin, J.; Hard, R. y Chainani M. 1997. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. *Histol.Histopathol*. 12: 147 - 170.

Goin, C. J., Goin, O. B. 1962. Introduction to herpetology. San Francisco: W. H. Freeman. 341p.

Granick, S. 1949. Iron Metabolism and Hemochromatosis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 25:403-428.

Gül, Ç.; Tosunoğlu, M.; Erdoğan, D., Özdamar, D. 2011. Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica* 6: 137 - 147.

Haddad, C.F.B., Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. 55:207-217.

Harvey, G.A., Semlitsch, R.D. 1988. Effects of temperature on growth, development and color polymorphism in the Ornate Chorus frog *Pseudacris ornata*. 4: 1001-1007.

Haugen, L. 1992. Background color selection and color change in the cryptic hylid frog, *Pseudacris regilla*. M.S. thesis. California State University, Northridge.

Heating, 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, 197-212.

Heddle, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation research*,

Herráez, M.P., Zapata, A.G. 1986. Structure and function of the melano-macrophage centers of the Goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12:117- 126.

Heyer RW. 1978. Systematics of the fuscus group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Natural History Museum of Los Angeles County , Sci Bull*. 29:1–75.

Hildebrand, M. 1995. Análise da estrutura dos vertebrados. *São Paulo: Atheneu*, 700p.

Hill, R.W; Wyse, G.A., Anderson, M. 2006. Circulación. En *Fisiología animal*, Parte V: Transporte de oxígeno, dióxido de carbono y sustancias internas. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, p. 725 - 762.

Hillman, S.S., Withers, P.C., Drewes, R.C., Hillyard, S.D. 2009. *Ecological and environmental physiology of amphibians*. Oxford University Press, United Kingdom.

Hoogmoed, M., Gorzula S. 1979. Checklist of the savanna inhabiting frogs of the El Manteco region with notes on their ecology and the description of a new species of tree frogs (Hylidae, Anura). *Zoologische Mededelingen*. 54: 183-216.

Huang, W. S., Lin, J.Y., Yu, J.Y.L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zoologist Sciences*. 14: 497-503.

IUCN – International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species, 2009. Disponible em: <<http://www.iucnredlist.org>>.

Kalashnikova, M.M. 1992. Erythrophagocytosis and Pigment Cells of the Amphibian Liver. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 113:82-84.

Kranz, H. 1989. Changes in Splenic Melano-Macrophages Centres of Dab, *Limanda limanda* During and After Infection with Ulcer Disease. Disease of Aquatic Organisms. 6:167-173.

Kurz, T. 2008. Can Lipofuscin Accumulation be Prevented? Rejuvenation Research. 11:441-443.

Lajmanovich R. C., J. C. Sánchez-Hernández, P. M. Peltzer, A. M. Attademo, G. S. Fiorenza, M. C. Cabagna and A. Basso 2008. Leves of plasma B-esterase and GlutathioneS-transferase activities in three South American toads. – Journal of Toxicological and Environmental Chemistry, 90: 1145-1161.

Lajmanovich R. C., P. M. Peltzer, A. M. Attademo, M. C. Cabagna and C. M. Junges 2012. Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilemma de difícil solución. – Revista Química Viva, 11: 184-198.

Lajmanovich R. C., Cabagna-Zenkhusen M. C., Attademo A. M., Junges C. M., Peltzer P. M., Bassò A., Lorenzatti, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty and glufosinate-ammonium. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 769:7–12.

Li, Y., Cohen, J.M., Rohr, J.R. 2013. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. Integrative Zoology. 8:145-161.

Lindquist, E.D., Hetherington, T.E. 1996. Field studies on visual and acoustic signaling in the “earless” Panamanian golden frog, *Atelopus zeteki*. *Journal of Herpetology*, 30:347–354.

Linzey, D. 2001. *Vertebrate biology*. New York: McGraw-Hill, 596p.

Lofts, B. 1974. *Reproduction. Physiology of the amphibia*. New York: Academic Press. 2: 107-218.

Lourdais O, Shine R., Bonnet X., Guillon M., Naulleau G. 2004. Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*. 104: 551-560.

Mackey, J. P. 1958. Morphological variation among populations of the Pacific tree frog (*Hyla regilla* Baird and Girard) at several elevations in western Oregon. Ph.D. thesis. University of Oregon, Eugene.

Majhi S. K., Choundhary B. K. 2014. Elevated Water Temperature Induces Germ Cell Proliferation in Loach *Lepidocephalus guntea* (Hamilton): Implication for Brood Stock Development. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 37:107-111.

Martins, M. 1988. Biologia reprodutiva de *Leptodactylus fuscus* em Boa Vista, Roraima (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de biologia*, 48:969-977.

Mcgraw, K.J. 2005. The Antioxidant Function of many Animal Pigments: are there Consistent Health Benefits of Sexually Selected Colourants? *Review Animal Behavior*. 69:757-764.

Meneguetti, D.U.O. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari -Rondônia, Brazil. X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), São Pedro-SP, 2011.

Mineeva O. V., A. K. Mineev 2010. Violations of the morphology of peripheral blood erythrocytes of the lake frog *Rana ridibunda* Pallas, 1771. – Bulletin of the University of Nizhny Novgorod, 2:664-667.

Mineeva O. V., A. K. Mineev 2011. Disorders of blood leukocyte formula in the lake frog of the Saratov reservoir. – Bulletin of the University of Nizhny Novgorod, 2:94-97.

Mitsui, T. 1965. Histochemical studies on the distribution of enzymes, especially oxidases and phosphatases in the living body. Final report En línea: <http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/625955.pdf>

Mondal, S., Rai, U. 2001. In vitro effect of temperature on phagocytic and cytotoxic activities of splenic phagocytes of the wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. Comp. Bioch. Phys. Part A: Mol. Int. Phys., 129:p. 391-398.

Moresco, R.M.; Oliveira, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. South American Journal of Herpetology. 4:1-8.

Navas C.A.; Otani L., 2007. Physiology, environmental change, and anuran conservation. Phyllomedusa. 6:83-103.

Oliveira, C. 1996. Estudo morfológico de testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Botucatu, 131p.

Oliveira, C.; Franco-Belussi, L. 2012. Melanic Pigmentation in Ectothermic Vertebrates: Occurrence and Function. In: Xiao-Peng Ma ; Xiao-Xiao Sun. (Org.). Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects.

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, 11:39-46.

Oliveira, C., Zanetoni, C., Zieri, R. 2002. Morphological Observations on the Testes of *Physalaemus curvieri* (Amphibia, Anura). Revista Chilena de Anatomia. 20:263-268.

Oliveira, C., Zieri, R. 2005. Pigmentação Testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com Observações Anatômicas sobre o Sistema Pigmentar Extracutâneo. Revista Brasileira de Zoologia. 22:454-460.

Oliveira, F. F., Júnior, G.P.L. 2000. Biologia Geral e Experimental: Anfíbios anuros do campus da universidade federal de Sergipe. 1: 42 – 74

Orr, R. T. 1986. Biologia dos vertebrados. 5º ed. São Paulo: Roca, 508p.

Pancak-Roessler, M. K., Norris, D. O. 1991. The effects of the orchidectomy and gonadotropins on steroidogenesis and oogenesis em Bidder's organ of the toad *Bufo woodhousii*. Journal of Experimental Zoology. 260: 323-336.

Pearson, R.G., Dawson, T.P. 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? Global Ecology and Biogeography , 12: 361 -371.

Pessier, A.P. 2007. Cytologic diagnosis of disease in amphibians. Vet. Clin.Exot. Anim. 10: 187 - 206.

Pickford, G.W. 1953. Fish Endocrinology. A Study of the Hypophysectomized Male Killifish, *Fundulus heteroclitus* (L.). Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection, Yale University. 14:5-41.

Pough, F.H., Christine, M.J., Heiser, J.B. 2003. A vida dos vertebrados. Atheneu, 3^a edição. São Paulo, 699p.

Prota, G. 1992. Melanins and Melanogenesis. Academic Press, New York. 290p.

Pyburn, W. F. 1961. The inheritance and distribution of vertebral stripe color in the cricket frog. Pages 235–261 in W. F. Blair, ed. Vertebrate speciation. University of Texas Press, Austin.

R Development Core Team. 2015. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>. Last accessed on 26 May 2015.

Rabb, G.B. 1990. Declining amphibian population. *Species*. 13:33-34.

Rastogi, R. K., Bagnara, J. T., Iela, L., Krasovich, M. A. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*. 197: 277-302.

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, Madisson, W.I. p. 399-428.

Roe J.H., Hopkins W.A., Snodgrass J.W., Congdon J.D. 2004. The influence of circadian rhythms on pre- and post-prandial metabolism in the snake *Lamprophis fuliginosus*. *Comp. Bioch. Phys. Part A: Mol. Int. Phys.* V. 139, n. 2, p. 159-168.

Rossa-Feres, D.C., Jim, J. 2001. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 18:439-454.

Roulin, A. 2014. Melanin-based colour polymorphism responding to climate change. *Global Change Biology*. doi: 10.1111/gcb.12594. 1-7.

Sanabria, E.A., Vaira, M., Quiroga, L.B., Akmentins, M.S., Pereyra, L.C. 2014. Variations of thermal parameters in two different color morphs of a diurnal poison toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae). 41. 1-5.

Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R. E., Oliveira, C. 2014. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). The Anatomical Records. 297:864-875.

Santos, L.R.S., Oliveira, C. 2008. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). Micron, 39: 1266–1270.

Santos, L. R. S. 2010. Efeitos da variação térmica no Sistema Pigmentar Extracutâneo do anuro *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). Tese de Doutorado Instituto de Bionciências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista São José do Rio Preto, 125p.

Sazima, I. 1975. Hábitos reprodutivos e fase larvária de *Leptodactylus mystacinus* e *L. sibilatrix* (Anura, Leptodactylidae). Dissertação de Mestrado. USP, São Paulo, SP. 71p.

Schartl, M., Larue, L., Goda, M., Bosenberg, M.W., Hashimoto, H., Kelsh, R.N. 2015. What is a vertebrate pigment cell? Pigmente Cell Melanoma Research. doi: 10.1111/pcmr.12409

Schmid, W. The micronucleus test. Mutation research,. 31:9–15.

Shutler D. T., D. J. Marcogliese 2011. Leukocyte profiles of northern leopard frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. –Copeia, 2: 301-307.

Sichel, G., Scalia, M., Mondio, F., Corsaro, C. 1997. The Amphibian Kupffer Cells Build and Demolish Melanosomes: an Ultrastructural Point of View. Pigment Cell Research. 10:271-287.

Sils E. A. 2008. Specific of amphibian (genus *Rana*) peripheral blood leucogram under condition of anthropogenic load. – In: Ananjeva N. B. (Ed.): The Problems of Herpetology. Saint-Petersburg, Russian Collection publishing, 369-374.

Silva, F. C. 2011. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 2:13-22.

Singh, K. 1977a. Haematology of the common Indian frog *Rana tigrina* I. Erythrocytes. Anat Anz. 141: 280 - 284.

Singh, K. 1977b. Hematology of the common Indian Frog *Rana tigrina*. II. Leucocytes. Anat Anz. 141: 445 - 449.

Sköld, H.N., Aspengren, S., Wallin, M. 2013. Rapid color change in fish and amphibians – Function, regulation and emerging applications. Pigment Cell & Melanoma Research. 26:29–38.

Stuart, S.N., Hanson, J. S. C., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306, 1783–1786.

Terman, A., Brunk, U. T. 2004. Lipofuscin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 36:1400-1404.

Toranza, C., Maneyro, R., 2013. Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). 12: 97-106.

Turner, R.J. (1988) Amphibians. En Vertebrate blood cells (Rawley, A.F. y Ratcliffe, N.A. eds.). Cambridge University. Cambridge, Inglaterra, p. 129 - 209.

Tuttle, M.D., Taft, L.K., Ryan, M.J. 1981. Acoustical location of calling frogs by *Philander opossums*. *Biotropica*, 13:233–234.

Tweats, D. J. 2007. Report of the iwgt working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests ii. identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutation research*. 627:92–105.

Ucci, A. A. 1982. A fine-structural study of interstitial cell changes in the testes of *Necturus maculosus* during a portion of the annual cycle, and possible evidence for local feedback control by seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*., 65: 27-38.

Varela, M.E y Mancini, R.E. 1938. Sistema hemocitopoyético del *Bufo arenarum* (Hensel). Topografía, citología y observaciones sobre sus variaciones estacionales. *Rev. Soc. Arg. Biol*, 14: 468 - 475.

Varela, M.E, Sellares M.E. 1937a. Sobre la morfología hemática del *Bufo arenarum* (Hensel). *Rev. Soc. Arg. Biol*. 13: 351 - 361.

Varela, M.E, Sellares, M.E. 1937b. Variaciones estacionales del cuadro hemático en el *Bufo arenarum* (Hensel). *Rev. Soc. Arg. Biol*. 13: 412 - 416.

Varela, M.E, Sellares, M.E. 1938. Nuevas observaciones sobre las variaciones estacionales del cuadro hemático en el *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. Soc. Arg. Biol*. 14: 229 - 235.

Venturino A., A. M. Pechen de D'Angelo 2005. Biochemical targets of xenobiotics: biomarkers in amphibian ecotoxicology. – *Applied Herpetology*, 2: 335-353

Villela, I.V. et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*.

Vitt, L.J., Caldwell, J.P., Wilbur, H.M., Smith, D.C. 1990. Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience*. 40:418.

Wake, M. H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. the gonads and the fat bodies. *Journal of Morphology*. 126: 291-331.

Wake, M.H. 1980. The reproductive biology of *Nectophrynoides malcomi* (Amphibia: Bufonidae), with comments on the evolution of reproductive modes in the genus *Nectophrynoides*. *Copeia* 2: 193–209.

Wallin, M. 2002. Nature's palette: How animals, including humans, produce colours. *Bioscience Explained*. 1:1-12.

Wassermann, H.P. 1965b. Leukocytes and melanin pigmentation. Demonstration of pigmented leukocytes in blood of amphibians, reptiles and normal man. *J. Invest. Dermatol.* 45: 104 - 109.

Weil M. R., Aldridge R. D. 1979. The effect of temperature on the male reproductive system of the common water snake (*Nerodia sipedon*). *J. Exp.Zool.* 210:327-332,

Weygoldt, P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 24:249-155.

Wikelski, M.; S. J. Cooke. 2006. Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution*. 21: 38–46.

Witschi, E. 1933. Studies in sex differentiation and sex determination in amphibians. VI. The nature of Bidder's organs in the toad. *American Journal of Anatomy*. 52: 461-515.

Wojtaszek, J. y Adamowicz, A. 2003. Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Comp. Clin. Path.* 12: 129 - 134.

Wolke, R.E., George, C.J., Blazer, V.S. 1985. Pigmented macrophages accumulations (MMC;PMB): Possible monitors of fish health. In: Parasitology and pathology os marine organisms of the world ocean. WG Hargis Jr(ed). 93-97.

Wynn A., Heyer W.R. 2001. Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae). Tropical Zoology 14: 255–285.

Zenklusen M. C., R. C. Lajmanovich, A. M. Attad emo, P. M. Peltzer, C. M. Junges, G. Fiorenza Bincucci and A. Basso 2014. Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros. – Museo Provincial de Ciencias Natu rales “Florentino Ameghino”, Santa Fe Argentina, 18: 1-16.

Zhelev Zh. M. 2012a. Ecology of tailless amphibians living under the influence of anthropogenic factors in Bulgaria. Usage of some population characteristics of three common amphibian species for the biomonitoring purposes. Saarbrucken, Lambert Academic publishing. 272 p.

Zhelev, Z.M. 2007. Investigation on the blood differential formula in *Rana ridibunda* (Anura, Amphibia) from the Area of the Maritsa – Iztok 1 Steam Power Plant. Acta Zool. Bulg. 59: 181 - 190.

Zieri, R., Taboga, S.R., Oliveira, C. 2007. Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae): Histological, stereological and ultrastructural aspects. The Anatomical Record. 290:795-800.

Zuasti A., Jará J.R., Ferrer C., Solano F. 1989. Ocurrence of melanin grabules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. Pigment Cell Reserch. 2:93-99.

Zuniga, G.; Torres-Bugarin, O.; Ramirez-Munoz, M.P.; Ramos, A.; Fanti-Rodriguez, E.; Portilla, E.; Garcia-Martinez, D.; Cantu, J.M.; Gallegos-Arreola, M.P. y

Sanchez-Corona, J. (1996) Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat. Res.* 369: 123 - 127.

Capítulo 1

Hepatotoxicidade e genotoxicidade em anfíbios submetidos a alta temperatura (Anura: Leptodactylidae)

Gabriela Baroni Leite¹, Lilian Franco-Belussi², Classius de Oliveira².

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

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

Manuscrito a ser submetido ao periódico The Experimental Biology.

Resumo: A temperatura influencia aspectos fisiológicos e morfológicos em animais ectotérmicos. No fígado de anuros, existem células denominadas melanomacrófagos que contêm melanina, hemosiderina e lipofuscina e respondem às variações de temperatura. Alta temperatura também possui efeito genotóxico, gerando micronúcleos em eritrócitos, sendo utilizados como biomarcadores de danos genéticos decorrentes de alterações ambientais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos sistêmicos da alta temperatura em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*, buscando indícios sobre efeitos hepatotóxicos e genotóxicos. Foram utilizados 80 animais em 8 grupos amostrais expostos a temperatura de 35,1°C em câmara B.O.D. Outros 30 animais foram expostos a alta temperatura em dois e 10 dias para extrair amostras sanguíneas. Os animais sacrificados tiveram fragmentos do fígado retirados e encaminhados para rotina histológica. Os anuros *P. nattereri* e *L. fuscus* são afetados pela hipertermia, sendo que *P. nattereri* é mais afetado que *L. fuscus* já que, as respostas são mais intensas em *P. nattereri*. De forma geral, o volume dos pigmentos nos melanomacrófagos são maiores nos grupos expostos a alta temperatura, sendo comprovado assim o efeito hepatotóxico da temperatura, uma vez que melanina neutraliza os radicais livres, hemosiderina é o pigmento oriundo da degradação do ferro das hemáceas e lipofuscina é gerado pela degradação dos ácidos poliinsaturados. A frequência de micronúcleos também é maior em 10 dias de exposição em relação ao grupo controle, sendo que a taxa em *P. nattereri* foi maior que em *L. fuscus*. Alta temperatura causa hepatotoxicidade e genotoxicidade em anuros em intensidade diferentes, variando de acordo com a biologia intraespecífica.

Palavras-chave: Hipertermia, Melanomacrófago, Anuros, Leptodactylidae.

Introdução

A família Leptodactylidae é uma das famílias de anuros mais ameaçadas de extinção, sendo uma das causas as mudanças climáticas (Stuart et al., 2004, Li et al., 2013). Alterações na umidade e temperatura são indicadores da mudança climática, sendo elas extremamente importantes para a sobrevivência dos anuros (Li et al., 2013).

O fígado é um dos principais órgãos do metabolismo de anuros. Além de realizar o anabolismo e catabolismo de diversas substâncias, ele também é responsável pela detoxificação (Hildebrand e Goslow, 2006). No fígado existem células pigmentadas denominadas melanomacrófagos, consideradas biomarcadores de interferentes ambientais, uma vez que mudanças causam efeitos tanto na melanina quanto na hemosiderina e na lipofuscina presentes nesta célula (Santos et al., 2014; Franco-Belussi et al., 2012).

Existe uma associação positiva do aumento da melanina com a hepatotoxicidade demonstrado em anuros (*Rana catesbiana*; Grassi et al., 2007), salamandras (*Lissotriton italicus*; Bernabò et al., 2014) e peixes *Puntius altus* (Sirimongkolvorakul et al., 2011). Além disso, variações na temperatura influenciam a área tanto de melanina quanto hemosiderina e lipofuscina em *Physalaemus nattereri* (Santos et al., 2014). Dessa maneira, o aumento da temperatura está associado a alterações hepáticas como aumento na taxa metabólica, o que compromete o *fitness* dos animais (Bruslé e Anadon, 1996, Li et al., 2013).

Integridade nucleolar também pode ser afetada pelo *stress* térmico, causando efeitos negativos na estrutura e função do centrossoma (Brown et al., 1996). Outros efeitos observados são a incapacidade das células em iniciar a mitose e atraso na progressão do ciclo celular (Welch, 1990). Assim, a exposição de organismos a elevadas temperaturas é conhecida por resultar em alterações na integridade do nucléolo, afirmando desta maneira

efeitos genotóxicos do choque térmico (Anitha et al., 2000). Os dados obtidos *in vivo* mostraram aumento de danos no DNA em aumento de temperatura em mexilhões (Buschini et al., 2003). Desta forma, a temperatura interfere na taxa mitótica influenciando a formação de micronúcleos (Barsiene et al., 2012, Schiedek et al., 2006).

Assim, acreditamos que exposição a alta temperatura cause alterações hepáticas, especificamente nos pigmentos dos melanomacrófagos além de efeitos genotóxicos em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*.

Material e métodos

Foram utilizados 110 espécimes sendo 55 exemplares de cada espécie (*P. nattereri* e *L. fuscus*), capturados em época reprodutiva de 2013 e 2014 no Município de São José do Rio Preto (20°49'12.65"S e 49°22'46.85"W) – São Paulo, Brasil. Do total dos espécimes, 80 exemplares (40 de cada espécie) foram sacrificados para análises hepáticas e outros 30 exemplares, sendo 15 de cada espécie, para análises genotóxicas. Os animais foram aclimatados em terrários plásticos contendo terra e água por 7 dias e após este período submetidos a alta temperatura.

Todos os animais foram coletados sob licença n.18573-1, autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e eutanasiados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) por meio do Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) nº097/2014.

Experimento de aumento de temperatura

Os animais foram distribuídos em 8 grupos experimentais (n=5): Controle, 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias, sendo dispostos em caixas plásticas (28x21x15cm), com

água e sem terra para que os animais não se enterrassem, e os tratados foram submetidos á Hipertermia (35,1°C; 30% da temperatura ambiente na aclimação 27°C) em estufa incubadora B.O.D. (Modelo 121 FC) com fotoperíodo ajustado para 12:12 (claro/escuro).

Processamento do material

Após cada tempo experimental os animais foram anestesiados e eutanasiados em solução de Benzocaína (5mg/L). Os animais foram pesados e fragmentos de fígados foram retirados e fixados em Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0,1M, tampão fostato pH 7,2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2,5%) por 24 horas, posteriormente, as amostras foram lavadas com água, desidratadas em séries de álcool e incorporado em historesina (Leica Historesin incorporação kit). Cortes (2µm) foram montados em lâminas e corados com hematoxilina/eosina (Bancroft e Gamble, 2002) incubadas em solução de Schmorl e solução ácida de ferrocianídeo. Para a detecção de pigmentos de lipofuscina, as lâminas foram incubadas secções em solução Schmorl durante 15 min, composto por 75 ml de cloreto férrico a 1%, 10 ml de ferricianeto de potássio, e 15 ml de água destilada. A seguir imersos secções em solução aquosa de 1% de vermelho neutro, seguido de um 1% de solução aquosa eosina. Para a detecção de hemossiderina, as lâminas foram incubadas em uma solução de ferrocianeto de ácido, obtido por dissolução de 2 g de ferrocianeto de potássio em 100 mL de ácido clorídrico 0,75 mol / L. As secções foram imersas em solução de vermelho neutro aquoso a 1%, seguido por eosina aquosa a 1%.

Análises morfológicas e quantitativas

As imagens foram capturadas em microscópio óptico (Leica DM4000B) com câmara (Leica DFC280) acoplada ao sistema de captura (Image Manager-IM50) e

analisadas em programa Image Pró-plus versão 6.0. Foram analisadas 25 fotos por animal, avaliando a área das substâncias pigmentares do fígado (melanina, hemosiderina e lipofuscina) de ambas as espécies e posteriormente transformada para volume relativo por meio da multiplicação da área relativa (área pigmentada pela área total da fotomicrografia) pela massa total do fígado, baseado na determinação que 1 mg de tecido é o volume de aproximadamente 1mm³, segundo Vilamaior et al., (2006).

Análise do micronúcleo

A análise da frequência de micronúcleo seguiu o protocolo de Lajmanovich et al., (2014) sendo considerada apenas a frequência de micronúcleos.

Para a análise do micronúcleo foram escolhidos dois tempos experimentais, estes tempos foram determinados após a quantificação da área de melanina em todos os tempos experimentais para ambas espécies, sendo que dois dias foi o pico de melanina em *L. fuscus* e 10 dias o pico de melanina em *P. nattereri*. Assim, estes tempos foram escolhidos para realização do teste de micronúcleo em outros 30 animais (15 exemplares de cada espécie). Assim, foram distribuídos em grupos Controle, dois e 10 dias com extração de amostras sanguíneas retiradas da veia femural localizada na parte posterior do membro inferior sendo posteriormente depositadas as gotas de sangue em lâminas, realizadas as extensões e fixadas em metanol a 4° C por 20 min e coradas com solução Giemsa 7.5% por 15min. Para a avaliação foram verificadas 1000 células em microscópio (Leica DM4000 B), com objetiva de 100x (Amphlett e Delow, 1984).

Análise estatística

Para análises estatísticas foram testadas diferenças entre os parâmetros morfométricos hepáticos e a frequência de micronúcleo (Variável resposta) entre as diferentes espécies e numa mesma espécie entre os tempos experimentais (Variáveis preditoras) foi realizada o teste Two-WayANOVA, com teste a posteriori de Tukey. Previamente à análise, testamos o pressuposto de normalidade e homogeneidade. Caso os dados não fossem normais ou apresentem heterogeneidade de variância, os mesmos foram transformados utilizando raiz quadrada ou log. Todos os testes foram conduzidos no software R versão 3.2.0 (R Development Core Team. 2015).

Resultados

Pigmentos entre as espécies

O volume dos pigmentos hepáticos, melanina, hemosiderina e lipofuscina entre os animais do grupo controle são diferentes em *P. nattereri* e *L. fuscus* ($F=4,99$ $P<0,05$; Figura 1). O volume relativo de melanina do fígado em *P. nattereri* é cerca de três vezes menor que em *L. fuscus* ($F=4,99$; $P<0,001$) (Figura 1A,B,E). Já o volume relativo de hemosiderina é cerca de três vezes maior em *P. nattereri* que em *L. fuscus* ($F=4,99$; $P<0,05$; Figura 1A,C,F). Já lipofuscina não houve diferença significativa, apresentando volumes relativos semelhantes entre as espécies ($F=4,99$; $P=0,78$) (Figura 1A,D,G).

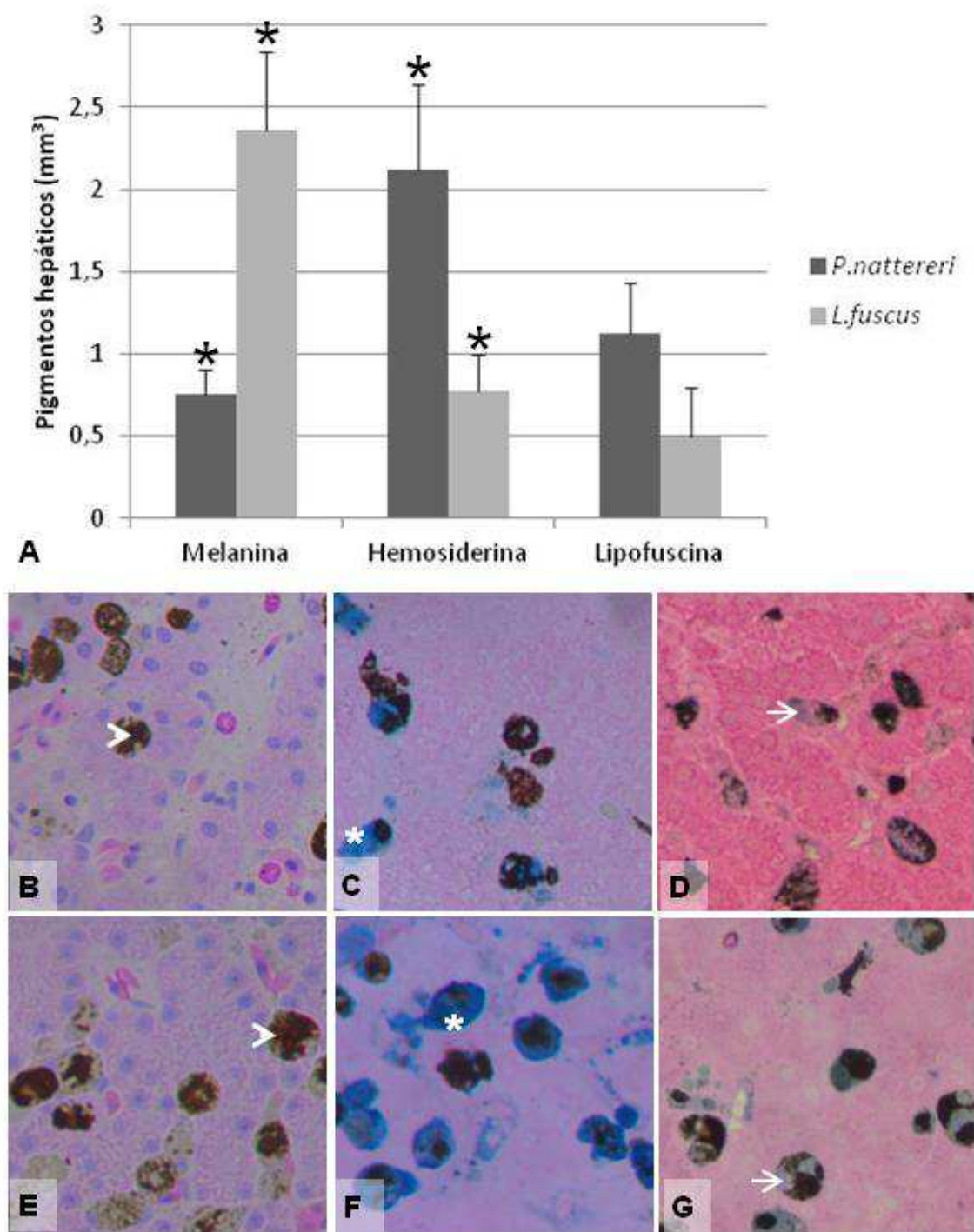


Figura 1: Diferenças dos pigmentos melanomacrofágicos no fígado em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*. A - Gráfico demonstrando diferenças estatísticas entre volume pigmentar de melanina e hemosiderina entre as espécies (*). Representação do

volume de melanina (cabeça de seta), hemosiderina (asterisco branco) e lipofuscina (seta) em *L. fuscus* (B, C, D, respectivamente) e em *P. nattereri* (E, F, G, respectivamente). Colorações: Hematoxilina e Eosina (B, E), solução ácida de ferrocianídeo (C, F) e solução de Schmorl (D, G). Aumento: 20x (B-G).

Pigmentos entre os tempos experimentais

O peso do fígado entre os tempos experimentais não variou nas duas espécies, com exceção de *P. nattereri* que aumentou o peso em 12 horas e diminuiu em 10 dias (Figura 2A).

Os três pigmentos dos melanomacrófagos hepáticos sofreram alterações em seus volumes relativos durante exposição à alta temperatura (Figura 2). Os tempos que causaram maiores alterações foram um e dois dias com alterações do volume tanto em relação a melanina quanto hemosiderina e lipofuscina (Figura 2).

As respostas no volume de melanina entre as espécies foram distintas em que *P. nattereri* apresentou dinâmica de diminuição do volume de melanina em um dia e posterior aumento em cinco e 10 dias ($F=26$; $P<0,05$) (Figura 2B). Já em *L. fuscus* houve apenas um pico em dois dias ($F=26$ $P<0,05$) (Figura 2B).

Para volumes de hemosiderina foi observado diminuição em dois e três dias para ambas espécies (Figura 2C). Além disso, em *P. nattereri* também diminuiu o volume em 12 horas, porém em 15 dias houve aumento do volume relativo (Figura 2C). Em *L. fuscus* não apresentou aumento apenas diminuição a partir de um dia até três dias ($F=118,6$; $P<0,05$) (Figura 2C).

O comportamento da lipofuscina foi bastante peculiar entre as espécies com respostas distintas em tempos curtos (até três dias) e efeitos semelhantes em tempos longos

(de cinco a 15 dias) (Figura 2D). Enquanto em *P. nattereri* foi observado diminuição do volume de lipofuscina desde 12 horas até três dias, *L. fuscus* apresentou aumento volumétrico em 12 horas, dois e três dias (Figura 2D). Entretanto, em 10 e 15 dias, ambas espécies apresentaram intenso aumento do volume de lipofuscina, sendo que *L. fuscus* relatou aumento também em cinco dias ($F=39,4$; $P<0,05$) (Figura 2D).

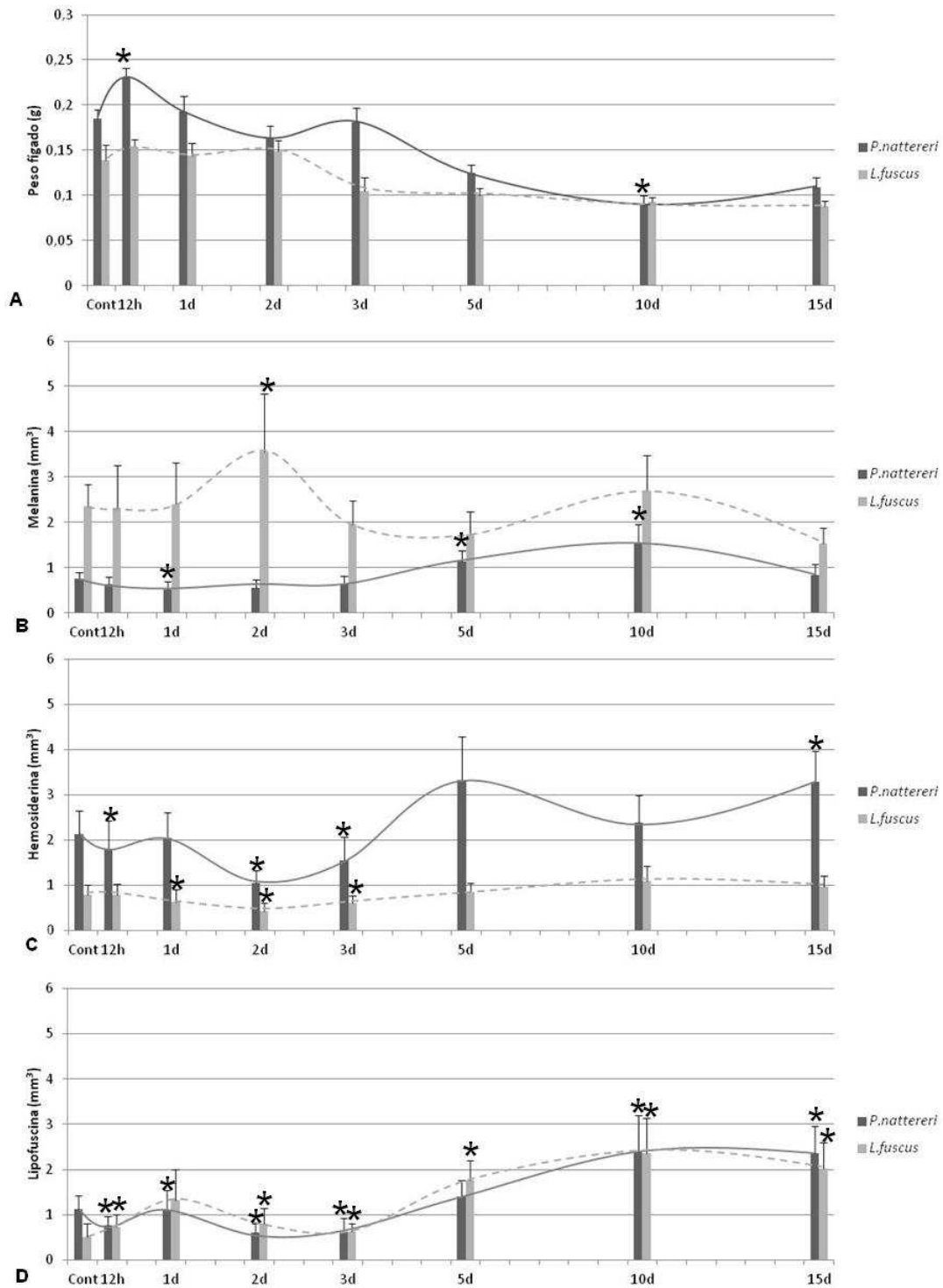


Figura 2: Diferenças das respostas no peso hepático e dos pigmentos melanomacrofágicos em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*. Gráfico

demonstrando diferenças do peso do fígado (A), volume de melanina (B), hemosiderina (C) e lipofuscina (D) entre as espécies *P. nattereri* e *L. fuscus* e os tempos experimentais (Cont, 1d, 2d, 3d, 5d, 10d, 15d). Asteriscos apontam diferenças estatísticas de cada espécie com o grupo controle respectivo ($P<0,05$).

Respostas genotóxicas

Os eritrócitos de anfíbios possuem formato elíptico com um grande núcleo arredondado ao centro (Figura 3A, B). Micronúcleos são detectados quando há presença de fragmentos de DNA menores em relação ao núcleo e excêntricos na célula (Figura 3B). A frequência de micronúcleos (MN) aumentou tanto em *P. nattereri* e *L. fuscus* em 10 dias de estresse térmico evidenciando efeito genotóxico ($F=9,46$; $P<0,05$) (Figura 3C).

A hipertermia aumentou em nove vezes a frequência de micronúcleos em *P. nattereri* e quatro vezes em *L. fuscus* em 10 dias sob temperatura de $35,1^{\circ}\text{C}$ ($F=9,46$; $P<0,5$) (Figura 3C). Em 48 horas não houve diferenças em relação ao grupo controle para ambas espécies, apresentando mesma frequência em *L. fuscus* e um aumento não significativo em *P. nattereri* ($F=0,55$; $P=0,47$) (Figura 3C).

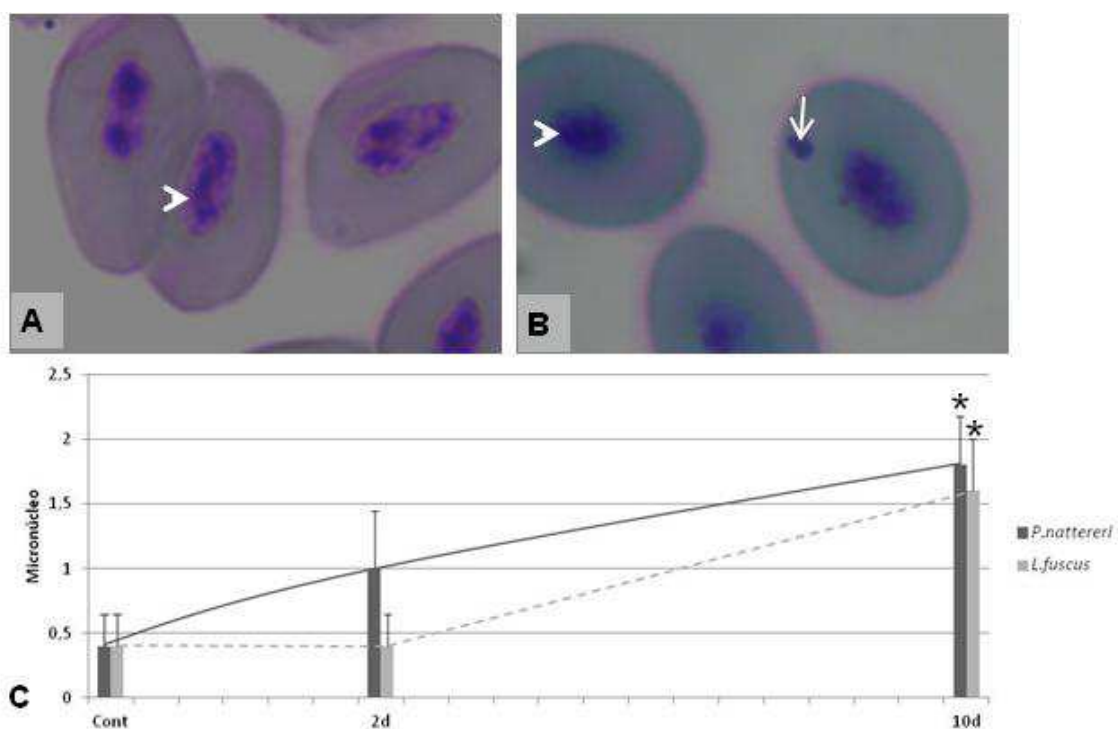


Figura 3: Fotomicrografias dos eritrócitos de *Leptodactylus fuscus* (A) e *Physalaemus nattereri* (B). Núcleo evidente e posicionado ao centro da célula (cabeça de seta). Representação de micronúcleo na periferia celular (seta branca). Gráfico demonstrando respostas da alta temperatura na frequência de micronúcleos a cada 1000 células. Diferenças estatísticas destacado por asteriscos. $P < 0,05$. Coloração: Giemsa (A, B). Aumento: 100x (A, B)

Discussão

Altas temperaturas afetam os anuros sendo que a sensibilidade térmica entre as espécies determina a intensidade do impacto desta variável.

A melanina apresenta característica protetora como neutralização de radicais livres, já a hemosiderina é um subproduto da degradação das hemácias e a lipofuscina é um pigmento oriundo da oxidação de ácidos graxos polinsaturados (Pickford, 1953; Agius e

Agbede, 1984; Kranz, 1989). Além disso, a melanina possui plasticidade frente a alterações ambientais como proteção contra radiação ultravioleta além de auxiliar na termorregulação sendo este um dos principais compostos envolvidos na adaptação ao aquecimento global (Roulin, 2014).

Espécies de anuros apresentam proporções distintas de pigmentos como melanina, hemosiderina e lipofuscina nos melanomacrófagos hepáticos. Já foi relatado diferenças na quantidade de melanomacrófagos entre diferentes espécies de tubarões, afirmando que a quantidade de melanomacrófago é interespecífica (Borucinska et al., 2009). Além disso, também foram observadas variações de melanina, lipofuscina e hemosiderina nestes animais, demonstrando que melanomacrófagos em diferentes espécies atuam de forma similar (Borucinska et al., 2009). Diferenças na intensidade de melanina na pigmentação na superfície visceral interespecífica já foi descrito por Franco-Belussi et al. (2011), entretanto, o fígado, por ser um órgão escuro, faz com que não seja possível realizar esta categorização. A diferença do volume de melanina no fígado entre espécies foi vista pela primeira vez neste estudo, demonstrando que espécies de anuros distintas apresentam volumes dos pigmentos hepáticos diferentes, mesmo estas sendo da mesma família, comprovando a interespecificidade destes pigmentos.

Em relação ao estresse térmico, de forma geral, há aumento do volume relativo de melanina, hemosiderina e lipofuscina tanto em *P. nattereri* quanto *L. fuscus* sugerindo efeito hepatotóxico da temperatura sobre os anuros. Estudos mais recentes demonstraram aumento do número de melanomacrófagos em 32°C para peixes da Índia. A mesma espécie exposta em temperatura baixa (20°C) é observado hepatotoxicidade, ou seja, efeitos deletérios nos hepatócitos como vacuolização, que não é observada em alta temperatura,

afirmando assim que o aumento dos melanomacrófagos auxiliam na proteção do tecido hepático e consequentemente manutenção das funções metabólicas (Raina et al., 2015).

Em anuros, alterações nas porcentagens dos pigmentos hepáticos estão intimamente relacionadas a variação na temperatura, resultando em mudanças na fisiologia desses animais (Santos et al., 2014). Animais ectotérmicos viventes em baixa latitude podem ser mais vulneráveis ao aquecimento do que as espécies localizadas em regiões temperadas porque seus limites térmicos máximos são atualmente mais perto das temperaturas ambientais em que são encontrados (Deutsch et al, 2008; Huey et al, 2009; 2012). Nossos dados, além de confirmarem este efeito demonstram que a resposta a hipertermia é distinta entre espécies de anuros, sendo que *P. nattereri* e *L. fuscus* apresentam respostas em tempos diferentes a mesma temperatura, sendo que, de modo geral *P. nattereri* é mais afetado que *L. fuscus*.

Todos os pigmentos apresentaram padrões semelhantes em *P. nattereri* apresentando diminuição em curtos períodos e aumento em tempos prolongados. Em *L. fuscus*, ao contrário de *P. nattereri*, não foi observado alterações no volume de melanina apresentando estabilidade em todos os tempos, exceto em dois dias. Estudos recentes demonstraram que algumas espécies tropicais podem não ser tão vulneráveis ao aquecimento quanto outras espécies, uma vez que a algumas espécies apresentam tanto alta plasticidade térmica quanto alta máxima térmica (Simon et al., 2015). Além disso, a sensibilidade a variações térmicas de *P. nattereri* já foi estudada por Santos et al. (2014) em que relata que esta espécie apresenta grande dificuldade de retornar aos padrões pigmentares normais após exposição em até 48 horas a alta temperatura. Esta diferença nas respostas pode estar associada ao período de estiagem dessas espécies sendo que *P. nattereri* por ser uma espécie de reprodução explosiva possui atividades metabólicas

adaptadas as pequenas variações ambientais por se reproduzirem em períodos menores do que *L. fuscus* que apresenta reprodução contínua, assim sendo, variações na temperatura podem ser mais hepatotóxicas em algumas espécies que em outras. A tolerância térmica entre tipos de reprodução distintos varia entre as espécies como por exemplo *Rana temporaria*, espécie que apresenta reprodução explosiva (Rastogi, 1976), apresenta baixa tolerância à temperatura crítica máxima (34.26 – 36.24°C), assim como *P. nattereri* em nossos estudos. Além disso, *Pelophylax perezi*, espécie considerada com estratégia reprodutiva contínua, (Delgado et al., 1989) apresentou alta tolerância à crítica máxima térmica (36.14 – 39.37°C) (Duarte, 2011).

A melanina apresenta comportamento distinto entre o mesmo tempo experimental nas duas espécies com o pico melânico em *L. fuscus* enquanto neste período não houve alteração no volume de melanina em *P. nattereri* apresentando diminuição em apenas um dia. A diminuição em curtos períodos deve ser pela função de termorregulação que absorve radiação, transformando em calor (Cesarini, 1996). Já o aumento posteriormente pode ser pelo fato que estudos em culturas de células pigmentares apresentam atividades melanogênicas com relógio molecular de 72 horas, apresentando aumento do volume após este período (Guida et al., 1998). Associação do aumento da melanina também está associada com hepatotoxicidade tanto em anuros quanto salamandras e peixes (Grassi et al., 2007; Bernabò et al., 2014; Sirimongkolvorakul et al., 2011).

Substâncias como a hemosiderina e a lipofuscina são originadas a partir do catabolismo celular sendo afetado pela mudança na temperatura, apresentando possíveis efeitos hepatotóxicos. A hemosiderina diminui seus volumes em ambas espécies em tempos de 12 horas em *P. nattereri*, um dia para *L. fuscus* até dois e três dias nas duas espécies. Altas temperaturas afetam o catabolismo de eritrócitos danificados diminuindo seu

metabolismo celular (Kranz, 1989). Nossos dados apresentaram respostas semelhantes que Santos et al. (2014) para *P. nattereri* expostos a hipertermia, em que houve diminuição da hemosiderina em 12 horas e dois dias, entretanto, nosso estudo demonstra que esta diminuição é pontual, uma vez que em 15 dias a quantidade de hemosiderina está aumentada. Isso pode ser explicado uma vez que em tempos iniciais não são observados danos severos nas hemácias, sendo que não houve alteração na frequência de micronúcleo e consequentemente menor volume de hemosiderina, uma vez que o fígado ajuda na degradação das hemáceas. O oposto também é observado, ou seja, aumento na frequência de micronúcleo e aumento do volume de hemosiderina em tempos prolongados como em 10 e 15 dias.

Já a lipofuscina apresentou diminuição de seus volumes de 12 horas até três dias e aumento de 5 a 15 dias em *P. nattereri*. A diminuição da lipofuscina em curtos períodos pode estar associada a presença da acetil-L-carnitina nas mitocôndrias de anuros, cuja substância em mamíferos causa a diminuição nas taxas de lipofuscina (Amenta et al., 1989; Hanada et al., 2013). Entretanto, em tempos longos de exposição hipertérmica, o aumento de lipofuscina pode estar intimamente relacionada a grande taxa de desestabilização de membranas celulares, consequentemente, causar hepatotoxicidade entre os anuros (Terman e Brunk, 2004; Kurz, 2008). Em peixes, o aumento nos níveis de pigmentação em baixas temperaturas é devido a ectotermia, já que é necessário altos níveis de gorduras insaturada para manter a fluidez das membranas, sendo propensas à peroxidação e assim aumento dos pigmentos (Agius, 1980).

A temperatura causa danos no DNA devido à interferência da taxa mitótica o que pode gerar quebras do material genético sendo identificado como micronúcleos (Buschini et al., 2003; Barsiene et al., 2012; Schiedek et al., 2006). Os efeitos genotóxicos da alta

temperatura foram vistos pelo aumento de micronúcleos nos eritrócitos das duas espécies analisadas em 10 dias de exposição hipertérmica. Em peixes, foram observados os mesmos efeitos prejudiciais quando estes foram expostos a 34 e 36°C por 3 horas evidenciando que choques térmicos são genotóxicos para animais ectotérmicos (Anitha et al., 2000).

Portanto, exposição dos anfíbios a hipertermia causa hepatotoxicidade vista por meio dos pigmentos melanomacrofágicos do fígado e genotoxicidade devido ao aumento da frequência de micronúcleos sendo *P. nattereri* mais afetado que *L. fuscus*. Assim sendo, nossos resultados demonstram que os anuros são sensíveis ao stress térmico. Além disso, a intensidade dos efeitos da temperatura entre as espécies é particular e dependente da biologia de cada espécie, entretanto, independente da intensidade ambas alterações, hepáticas e genotóxicas, podem comprometer a homeostase desses animais.

Referências Bibliográficas:

Agius, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. 1980. Journal of Zoology, West Sussex, 191:11-31.

Agius, C., Agbede, S. A. 1984. An electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. Journal of Fish Biology, Malden, 24:471-488.

Amenta, F., Ferrante, T., Lucreziotti, R., Ricci, A., Ramaeci, M. T. 1989. Reduced lipofuscin accumulation in senescent rat brain by long-term acetyl-L-carnitine treatment. Arch Geront. Geriatr. 9:147-159.

Amphlett, G.E., Delow, G.F. Statistical analysis of the micronucleus test. 1984. Mutation Research, 128, 161-166.

Anitha, B., Chandra, N., Gopinath, P.M., Durairaj, G., 2000. Genotoxicity evaluation of heat shock in goldfish (*Carassius auratus*). *Mutat. Res.* 469, 1–8.

Bancroft J. D.; Gamble, M. 2002. *Theory & Practice of Histological Techniques*, 5th Edition. 793pp. ISBN: 0-443-06435-0.

Bernabò, I., Biasone, P., Macirella, R., Tripepi, S., Brunelli, E. 2014. Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): Normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 66:455-468.

Baršienė J, Rybakovas A, Garnaga G, Andreikėnaitė L, 2012. Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels before and after an oil spill at the marine oil terminal in the Baltic Sea. *Environ. Monit. Assess.* 184:2067–78

Borucinska, J.D., Kotran, K., Shackett, M., Barker, T. 2009. Melanomacrophages in three species of free-ranging skarks from the northwestern Atlantic, the blue shark *Prionace glauca* (L.), the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus* Rafinesque, and the tresher, *Alopias vulpinus* (Bonnaterre). *Journal of Fish Diseases*. 32:883-891.

Brown, C.R., Q.H. Brown, S.H. Doxsey and W.J. Welch, 1996. Molecular chaperones and centrosomes. *J. Biol. Chem.*, 271: 824-832.

Bruslé, J., Anadon, G. G. 1996. The Structure and Function of Fish Liver. In: *Fish Morphology*. Science Publishers. pp 77-93.

Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C. 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 537:81-92.

Cesarini J. P. 1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. *Adv Space Res* 18:35–40. 10

Delgado, M.J., Gutiérrez, P., Alonso-Bedate, M. 1989. Seasonal Cycles in Testicular Activity in the Frog, *Rana perezii*. General and Comparative Endocrinology. 73, 1-11.

Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., Martin, P. R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 6668-6672.

Duarte, H. S. 2011. A comparative study of the thermal tolerance of tadpoles of Iberian anurans. Tese de Mestrado em Biologia da Conservação. Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. 21p.

Franco-Belussi L., Santos L.R.S., Zieri R., Oliveira C. 2011. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): occurrence and comparison. Zoologischer anzeiger. 250,102-110.

Franco-Belussi L., Santos L.R.S., Zieri R., Oliveira C. 2012. Visceral pigmentation in three species of the genus *Scinax* (Anura: Hylidae): Distinct morphological pattern. The Anatomical Record 295:298–306.

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. 68:71-78.

Guida G, Maida I, Gallone A, Boffoli D, Cicero R. 1998. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. In Vitro Cell Dev Biol Anim 34:393–400.

Hanada, H., Kobuchi, H., Yamamoto, M., Kashiwagi, K., Katsu, K., Utsumi, T., Kashiwagi, A., Sasaki, J., Inoue, M., Utsumi, K. 2013. Acetyl-L-carnitine suppresses

thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas*. 150, 1-9.

Hildebrand, M.; GOSLOW, G. 2006. *Análise da estrutura dos vertebrados*. 2.ed. São Paulo: Atheneu. 700p.

Huey, R. B., Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Vitt, L. J., Hertz, P. E., Alvarez Pérez, H. J. and Garland, T., Jr. 2009. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1939-1948.

Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A. M., Jess, M. and Williams, S. E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philos. Trans. R. Soc. B* 367, 1665- 1679.

Kranz, H. 1989. Changes in splenic melano-macrophages centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Dis Aquat Org* 6:167–173.

Kurz, T. 2008. Can lipofuscin accumulation be prevented? *Rejuvenation Res* 11:441–443.

Lajmanovich R. C., Cabagna-Zenkhusen M. C., Attademo A. M., Junges C. M., Peltzer P. M., Bassò A., Lorenzatti, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. [769](#):7–12.

Li, Y., Cohen, J.M., Rohr, J.R. 2013. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integrative Zoology*. 8, 145-161.

Pickford, G.W. 1953. Fish endocrinology. A study of the hypophysectomized male Killifish, *Fundulus heteroclitus* (L.). Bulletin of the Bigham Oceanographic Collection, Yale University. 14:5-41.

R Development Core Team. 2015. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>. Last accessed on 26 May 2015.

Raina, S., Sachar, A., Gupta, K. 2015. Temperature fluctuations induced histopathological alterations in the liver of fish, *Labeo boga* inhabiting Jammu waters. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 2:12-16.

Rastogi R. K., Iela L., Saxena P. K., Chieffi G., 1976 - The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. Journal of Experimental Zoology, 196

Roulin, A. 2014. Melanin-based colour polymorphism responding to climate change. Global Change Biology. doi: 10.1111/gcb.12594. 1-7.

Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R. E., Oliveira, C. 2014. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). The Anatomical Records. 297, 864–875.

Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J. et al. 2006. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. Mar. Pollut. Bull., 53, 387–405.

Simon, M.N., Ribeiro, P.L., Navas, C.A. 2015. Upper thermal tolerance plasticity in tropical amphibian species from contrasting habitats: Implications for warming impact prediction. Journal of Thermal Biology. 48:36-44.

Sirimongkolvorakul, S., Tansatit, T., Preyavichyapugdee, N., Kosai, P., Jiraungkoorskul, K., Jiraungkoorskul, W. 2012. Efficiency of *Moringa oleifera* dietary supplement reducing lead toxicity in *Puntius altus*. Full Length Research Paper. 6:187-194.

Stuart, S.N., Hanson, J. S. C., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783–1786.

Terman A., Brunk U.T. 2004. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1400–1404.

Welch, W.J., 1990. *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp: 223-227.

Capítulo 2

*Alta temperatura afeta células germinativas e
melanócitos testiculares em duas espécies de anfíbios
Neotropicais (Anura: Leptodactylidae)*

Gabriela Baroni Leite¹, Lilian Franco-Belussi², Classius de Oliveira².

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

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

Manuscrito a ser submetido ao periódico Biology Letters.

Resumo: Algumas características dos anuros os tornam especialmente vulneráveis a variações ambientais, como alterações nos padrões de temperatura. Tal vulnerabilidade tem sido utilizada para explicar o declínio populacional de anfíbios ao redor do mundo e como indicador das mudanças climáticas. Este trabalho teve como objetivo analisar e comparar os efeitos da hipertermia sobre as células germinativas em *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*. Exemplares machos foram coletados e submetidos a alta temperatura (35,1°C) por 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias. Os animais foram eutanasiados e os testículos removidos e destinados à rotina histológica. A quantificação da melanina e das células germinativas foram realizadas, além das áreas locular e intersticial. A espécie *P. nattereri* apresenta melanócitos nos testículos conferindo uma coloração escura não sendo observados em *L. fuscus* com coloração branco leitosa. Esses melanócitos em *P. nattereri* foram intensamente afetados pela temperatura com grande aumento do volume em três, 10 e 15 dias. Constatou-se efeitos também na linhagem germinativa, porém, diferentemente entre as espécies. Nos grupos controle *P. nattereri* apresentou grande volume de espermatozoide e *L. fuscus*, espermátócito. Isso pode ser devido ao tipo de reprodução sendo que *P. nattereri* é explosivo enquanto *L. fuscus*, contínuo. Em geral *L. fuscus* foi mais afetada que *P. nattereri* uma vez que, houve diminuições dos volumes da maioria dos espermatozoides em *L. fuscus*. Já *P. nattereri* apresentou aumento de alguns tipos celulares em diversos tempos experimentais. O efeito mais brando em *P. nattereri* pode ser devido a presença de melanócitos que possuem papel termoprotetor. Portanto, alta temperatura causa efeitos nos melanócitos testiculares e nas células germinativas sendo que *P. nattereri* foi menos afetado que *L. fuscus*, sendo que a condição de hipertemia provocou alterações no volume espermatogênico de ambas espécies.

Palavras-chave: Hipertermia, melanina, testículos, espermatogênese.

Introdução

Os anuros apresentam alta diversidade de modos reprodutivos, sendo a família Leptodactylidae a mais diversa com 17 modos reprodutivos diferentes (Haddad e Prado, 2005, Duellman e Trueb, 1999; Pough et al., 2003). As espécies *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* depositam seus ovos em um ninho de espuma, sendo que *P. nattereri* possui desova em ninho de espuma flutuante enquanto *L. fuscus* coloca o ninho de espuma em câmaras subterrâneas (Brasileiro et al., 2005; Rossa-Feres e Jim, 2001, Sazima, 1975; Martins, 1988).

Outra diferença marcante entre essas espécies é a presença de células contendo melanina, denominadas melanócitos, nos testículos de *P. nattereri* enquanto *L. fuscus* não apresenta este tipo celular, sendo os testículos de coloração branca leitosa (Franco-Belussi et al., 2009). A melanina possui funções protetoras contra aumento na temperatura e radiação ultravioleta (UV), estas últimas sendo correlacionadas positivamente no meio ambiente, como consequências do aquecimento global (Roulin, 2014).

Os testículos são constituídos por lóculos seminíferos onde estão as células germinativas que se agrupam com células de sustentação, ou células de Sertoli, e assim constituem cistos espermatogénéticos ou espermatocistos, contendo células no mesmo estágio de diferenciação celular (Santos e Oliveira, 2008, Wake, 1968; Lofts, 1974; Franchi et al., 1982; Ucci, 1982; Cavicchia e Moviglia, 1983; Rastogi et al., 1988; Báó et al., 1991; Oliveira, 1996)

Com permeabilidade cutânea e ciclo de vida dependente do ambiente aquático e do terrestre, os anuros são vulneráveis as alterações ambientais sendo reconhecidos como bioindicador de qualidade ambiental (Blaustein e Wake, 1995; Vitt et al., 1990; Weygoldt, 1989, Duellman e Trueb, 1999; Rabb, 1990). O custo de manutenção dos anfíbios pode

aumentar diretamente como uma consequência das mudanças de temperatura podendo modificar o desempenho reprodutivo desses animais, interferindo na espermatogênese, sendo que a adaptação nestes ambientes requer alguns controles necessários do ciclo reprodutivo para produzir descendência em um período no ano em que a maioria da prole tenha maiores chances de sobrevivência (Carey 2005; Wikelski e Cooke 2006; Callard et al., 1978; Huang et al., 1997).

Sabendo que altas temperaturas causam diversos efeitos em populações de anuros, acreditamos que os melanócitos testiculares em *P. nattereri* sejam afetados positivamente aumentando seu volume, sugerindo papel protetor enquanto as células germinativas sejam afetadas negativamente em ambas espécies, sendo que *L. fuscus* possa ser mais impactado por não apresentarem pigmentação testicular quando os animais estão expostos a alta temperatura.

Material e Métodos

Coletas dos exemplares

Foram utilizados 80 exemplares machos (40 exemplares de cada espécie) capturados em época reprodutiva de 2013 e 2014 no Município de São José do Rio Preto (20°49'12.65"S e 49°22'46.85"W) – São Paulo, Brasil. Os animais foram aclimatados em terrários contendo terra e água por 7 dias e após este período submetidos a alta temperatura.

Todos os animais foram coletados sob licença n.18573-1, autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e eutanasiados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) por meio do Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) nº097/2014.

Experimento de aumento de temperatura

Os animais foram distribuídos em 8 grupos experimentais (n=5): Controle, 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias, sendo dispostos em terrários com água e sem terra, sendo os tratados submetidos à Hipertermia (35,1°C; 20% da temperatura ambiente na aclimação 27°C) em estufa incubadora B.O.D. (Modelo 121 FC) com fotoperíodo ajustado para 12:12 (claro/escuro). O grupo controle foi mantido em temperatura ambiente e sacrificados após 10 dias do início dos experimentos.

Processamento do material

Após cada tempo experimental os animais foram anestesiados e eutanasiados em solução de Benzocaína (5mg/L). Os animais foram pesados e fragmentos de fígados foram retirados e fixados em Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0,1M, tampão fostato pH 7,2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2,5%) por 24 horas, posteriormente, as amostras foram lavadas com água, desidratadas em séries de álcool e incorporado em historesina (Leica Historesin incorporação kit). Cortes (2µm) foram montados em lâminas e corados com hematoxilina/eosina (Bancroft e Gamble, 2002)

Análises morfológicas e quantitativas

As imagens foram capturadas em microscópio óptico (Leica DM4000B) com câmara (Leica DFC280) acoplada ao sistema de captura (Image Manager-IM50) e analisadas em programa Image Pró-plus versão 6.0. Foram analisadas 25 fotos por animal, avaliando a área pigmentada dos testículos em *P. nattereri* e área locular e dos espermatocistos em cada fase de desenvolvimento em ambas as espécies e posteriormente transformada para volume relativo por meio da multiplicação da área relativa pelo peso

total do órgão, baseado na determinação que 1 mg de tecido é o volume de aproximadamente 1mm³, segundo Vilamaior et al., (2006).

Análise estatística

Para análises estatísticas foram testadas diferenças entre os parâmetros morfométricos dos testículos (Variável resposta) entre as diferentes espécies e numa mesma espécie entre os tempos experimentais (Variáveis preditoras) foi realizada o teste Two-WayANOVA, com teste a posteriori de Tukey. Previamente à análise, testamos o pressuposto de normalidade e homogeneidade. Caso os dados não fossem normais ou apresentem heterogeneidade de variância, os mesmos foram transformados utilizando raiz quadrada ou log. Todos os testes foram conduzidos no software R versão 3.2.0 (R Development Core Team. 2015).

Resultados

Melanócitos testiculares em *P. nattereri*

Os testículos de *P. nattereri* são alongados, pares com coloração mesclada de branco e preto (Figura 1A). Os melanócitos, células contendo melanina, estão dispostos no interstício testicular envolvendo os lóculos seminíferos e na cápsula testicular o que lhe confere coloração escura (Figuras 1B-C).

A exposição a alta temperatura aumentou o volume de melanina nos testículos em três, 10 e 15 dias, sendo que 15 dias apresentou volume cerca de quatro vezes maior que o grupo controle (Figura 1D).

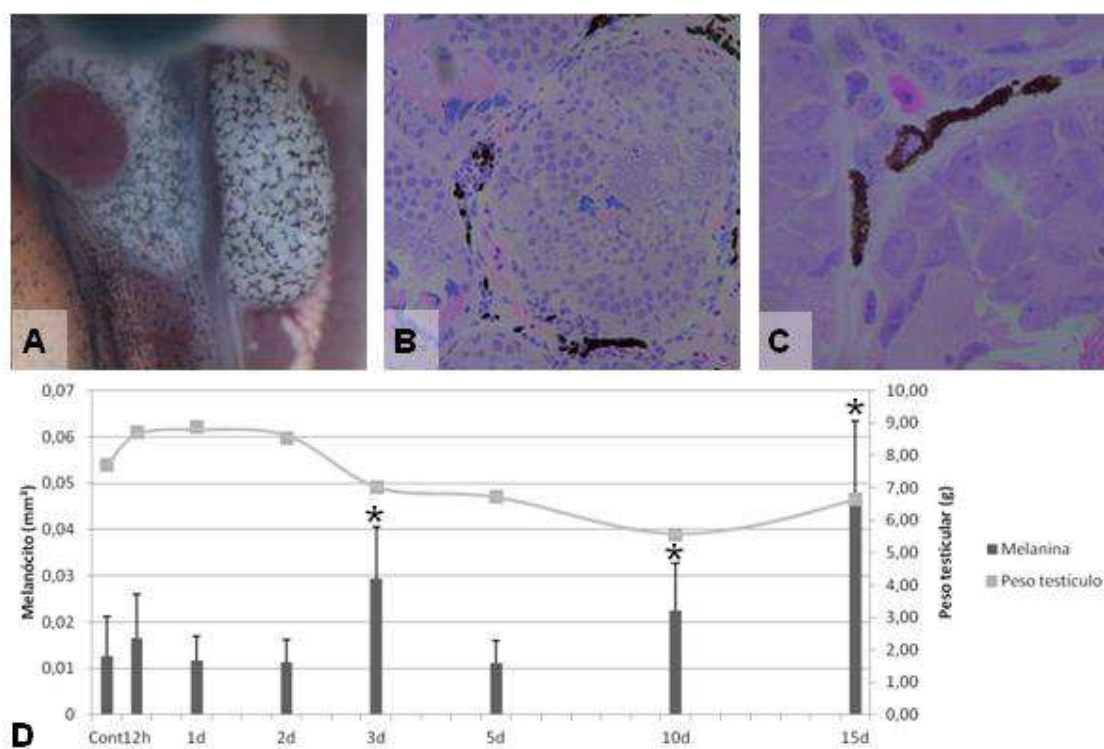


Figura 1: Foto estereoscópica dos testículos de *Physalaemus nattereri* (A). Fotomicrografia do testículo de *P. nattereri* evidenciando os melanócitos no tecido intersticial e os lóculos seminíferos em aumento de 20x (B) e detalhe da disposição dos melanócitos em aumento de 100x (C). Gráfico demonstrando diferenças do volume de melanina expostos a alta temperatura (Grupos: Controle, 12 hora, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias) (C). Diferenças estatísticas em relação ao controle marcados em asteriscos. $P < 0,05$. Coloração: Hematoxilina/Eosina.

Células germinativas em *P. nattereri* e *L. fuscus*

Tanto *P. nattereri* quanto *L. fuscus* apresentam todos os tipos espermatogênicos (Figura 2A-H), as espermatogônias com formato irregular (Figura 2A,E), espermatócitos I maiores que espermatócitos II (Figura 2B,F). As espermátides I e II apresentam formas mais alongadas (Figura 2 C,G) e espermatozoides bastante alongados (Figura 2D,H) O

volume relativo de cada tipo celular varia entre *P. nattereri* e *L. fuscus*, sendo que *P. nattereri* possuem volume dos espermátocitos menores que *L. fuscus*, enquanto o volume dos espermatozoides é maior em *L. fuscus* do que *P. nattereri* (Figura 2I).

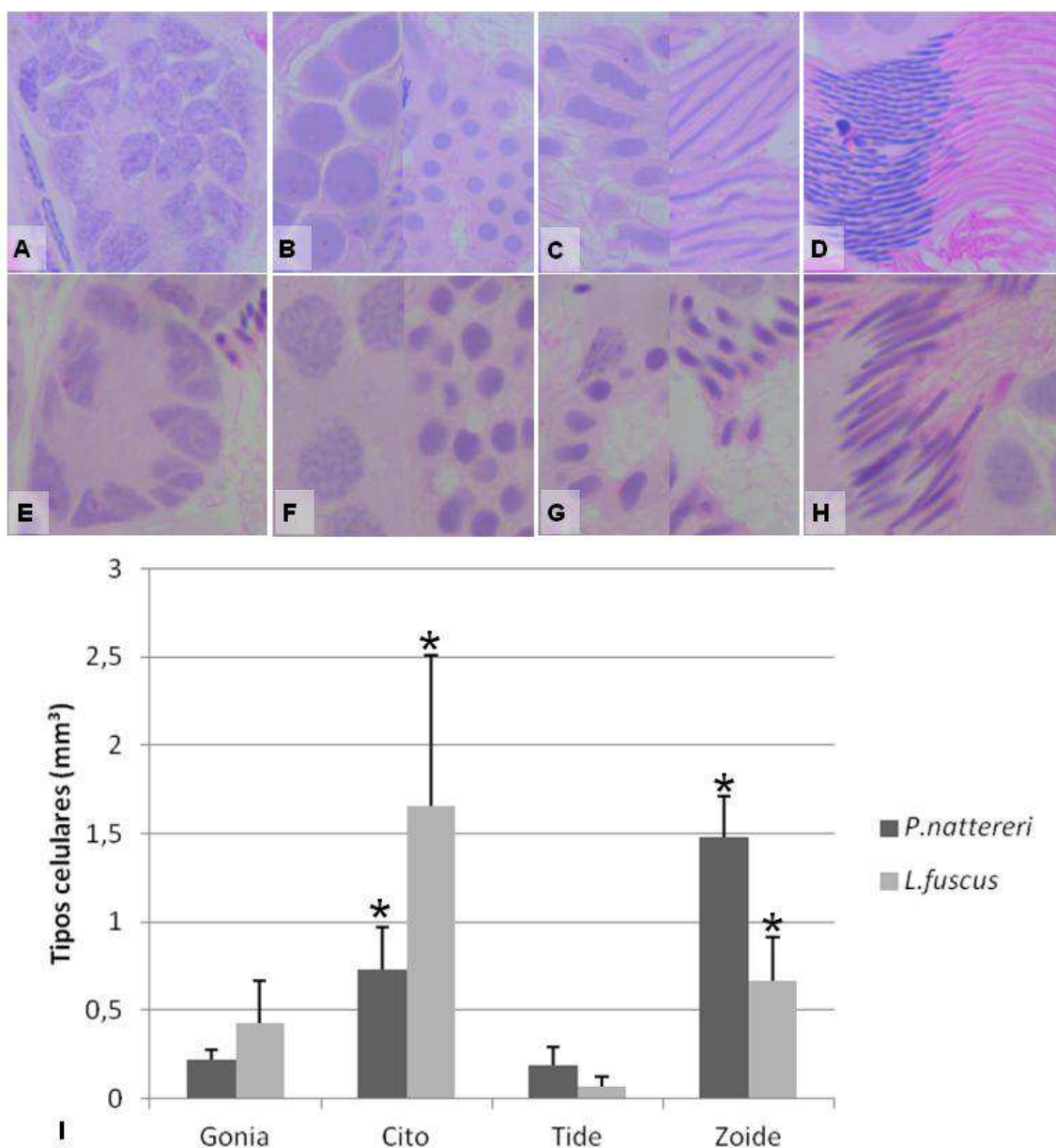


Figura 2: Fotomicrografia dos espermatocistos de *P. nattereri* (A-D) e *L. fuscus* (E-H) evidenciando espermatogônias (A,E), espermátocitos (B, F), espermátides (C, G) e espermatozoides em feixe (D,H). Gráfico demonstrando diferenças do volume de cada tipo

celular no grupo controle (I). Diferenças estatísticas marcadas em asteriscos. $P < 0,05$.
 Coloração: Hematoxilina/Eosina. Aumento: 100x.

Influência da temperatura nos tipos espermato gênicos

Os volumes locular e intersticial apresentaram respostas semelhantes quando expostos a alta temperatura (Figura 3A-B). De forma geral os lóculos e interstícios de *P. nattereri* tiveram aumento em tempos curtos, como em um dia, e diminuição do volume em tempos mais prolongados, como em cinco a 15 dias (Figura 3A,B). Já em *L. fuscus* houve diminuição dos volumes locular e intersticial em todos os tempos experimentais, com exceção de cinco dias para volume dos lóculos (Figura 3A,B).

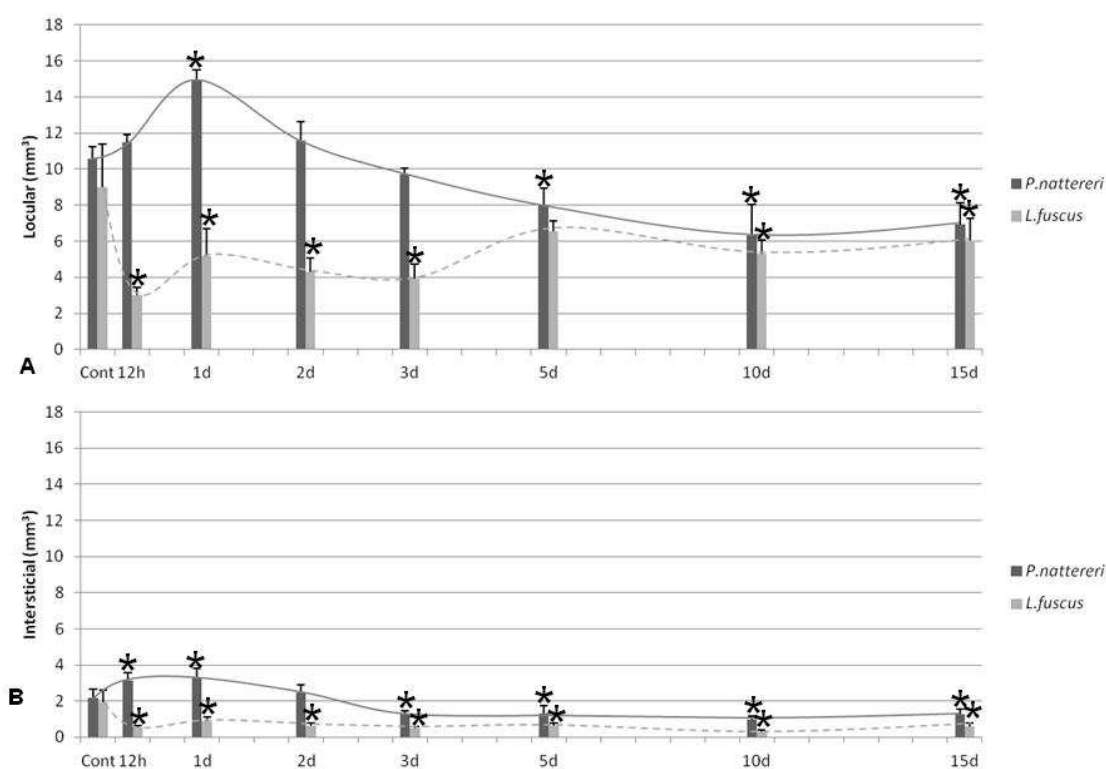


Figura 3: Gráfico demonstrando diferenças em *P. nattereri* e *L. fuscus* no volume locular e intersticial exposto a hipertermia (35,1°C). (A-B). Diferenças estatísticas marcados em asteriscos. $P < 0,05$

Nos tipos celulares da espermatogênese foi observado respostas semelhantes em alta temperatura com diminuição dos volumes da maioria dos espermatocistos em *L. fuscus* e aumento dos volumes em *P. nattereri* (Figura 4A-D).

As espermatogônias em *P. nattereri* apresentaram aumento apenas a partir de três dias enquanto os espermatócitos são afetados pela hipertermia com aumento volumétrico desde 12 horas até 15 dias (Figura 4A-B). Já os tipos celulares mais tardios como espermatídes e espermatozoides não foram afetados pela exposição a alta temperatura (Figura 4C-D).

Para *L. fuscus* os efeitos foram mais drásticos com diminuição dos volumes espermatogênicos em espermatogônias, espermatócitos e espermatozoide em apenas 12 horas de exposição hipertérmica (Figura 4A,B e D). Nos espermatozoides a diminuição foi observada em todos os tempos experimentais enquanto no espermatócitos em cinco dias não houve alteração e nas espermatogônias não tiveram efeitos em um, dois, cinco e 15 dias (Figura 4A, B e D). As espermatídes não foram afetadas em nenhuma espécie e em nenhum tempo experimental (Figura 4C).

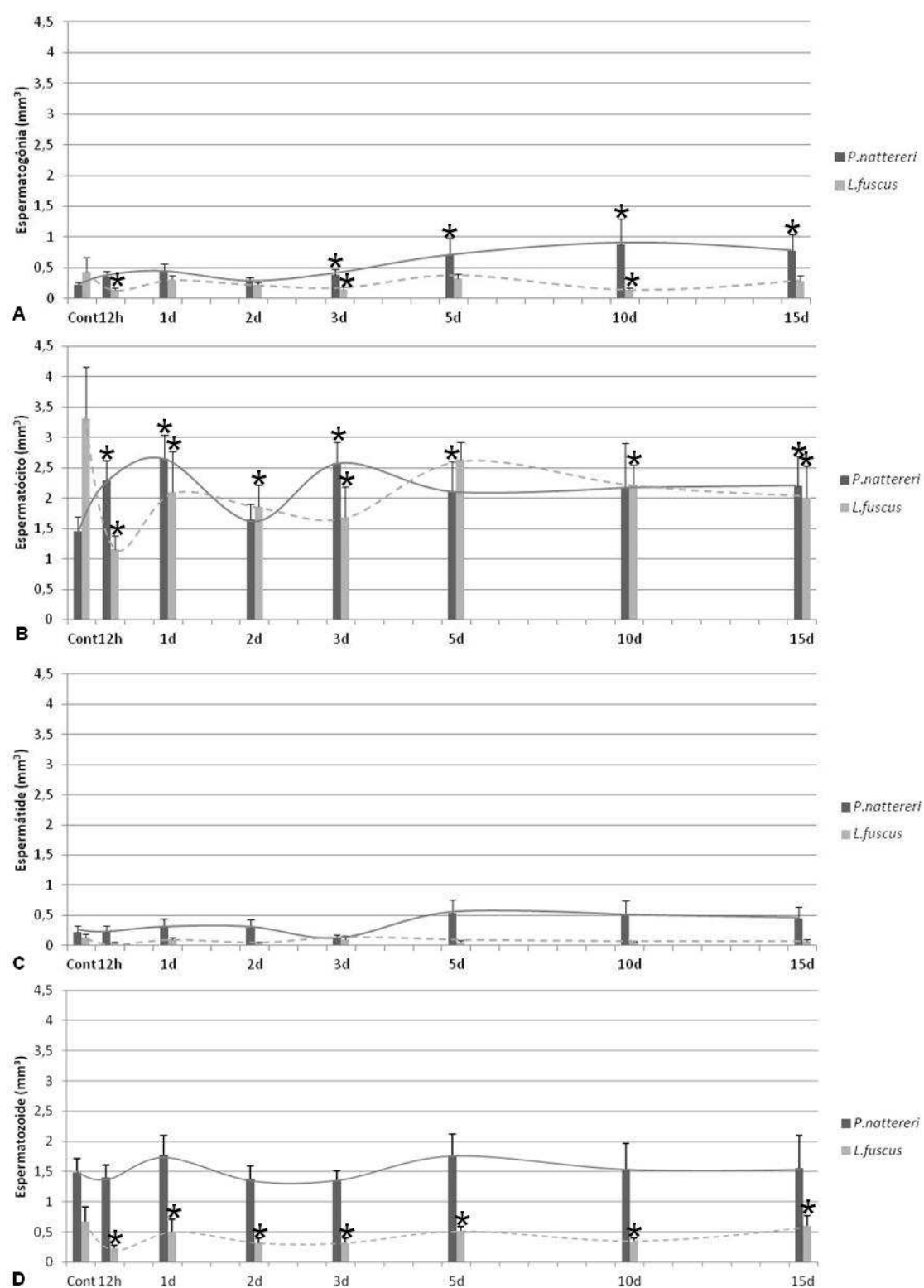


Figura 4: Gráfico demonstrando diferenças em *P. nattereri* e *L. fuscus* no volume de espermatogônias (A), espermatócitos (B), espermátide (C) e espermatozoide em feixe (D)

exposto a hipertermia (35,1°C) nos grupos Controle, 12 horas, um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias. Diferenças estatísticas marcados em asteriscos. $P < 0,05$

Discussão

Altas temperaturas interferem na homeostase dos anuros, causando respostas tanto imediatas (de 12 horas até dois dias) quanto a longo prazo (três até 15 dias) nos órgãos reprodutores de *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*.

Apesar de serem da mesma família Leptodactylidae, *P. nattereri* e *L. fuscus* apresentam uma notável diferença nos testículos, enquanto *P. nattereri* apresenta de moderada a intensa pigmentação devida a presença de melanócitos, em *L. fuscus* não existe este tipo celular. A presença de melanócitos nos testículos é visto em diversas espécies do gênero *Physalaemus*, como por exemplo *P. marmoratus*, *P. centralis* e *P. cuvieri* (Franco-Belussi et al. 2009). Da mesma forma, a ausência de pigmentação em *Leptodactylus* também é observado em outros representantes como *L. mystacinus*, *L. podicipinus* e *L. bokermanni*, por exemplo (Franco-Belussi et al. 2009).

A pigmentação cutânea em anuros é responsiva a diversos fatores entre eles hormônios como o estimulante de melanóforos (α -MSH) (Camargo et al., 1999) além de fatores ambientais como baixas temperaturas (Roubos et al., 2010). Já a pigmentação visceral também apresenta plasticidade similar, sendo que a pigmentação testicular apresenta alteração quando exposto ao α -MSH (Franco-Belussi et al., 2013). Nossos resultados demonstram que altas temperaturas causam intenso aumento do volume de melanina nos testículos de *P. nattereri*. A melanina possui funções protetoras como ação bactericida (Wolke et al., 1985) além de proteger os tecidos contra aumento na temperatura

e radiação ultravioleta (UV) por absorver e neutralizar radicais livres (Roulin, 2014, Zuasti et al., 1989).

A análise comparativa entre as espécies demonstrou que *P. nattereri* possui grande volume testicular de espermatozoides em feixe, enquanto que em *L. fuscus* o tipo celular predominante são os espermatócitos primários. Essa diferença é possivelmente atribuída à estratégia reprodutiva, sendo *P. nattereri* considerado reprodutor explosivo, sendo necessário um volume grande de espermatozoide para obter sucesso reprodutivo em pouco tempo enquanto *L. fuscus* um reprodutor contínuo com renovação do ciclo continuamente apresenta grande volume de células iniciais, no caso espermatócito (Wells 1977; Bastos 1995; Prado e Haddad, 2005).

Os resultados mostraram o impacto do aumento da temperatura na espermatogênese de *P. nattereri* e *L. fuscus*, uma vez que foram observadas alterações em quase todos os tipos celulares nas duas espécies analisadas frente aos tratamentos de hipertermia. Observamos ainda que mesmo em curtos períodos de exposição (12 horas), alguns volumes espermatozóides também sofreram alterações. A temperatura, como sugestão para controle do ciclo testicular, tem recebido muita atenção e os dados disponíveis, de fato, têm estabelecido que a temperatura influencia o ciclo testicular em anuros (Rastogi, 1976).

Apesar de *L. fuscus* estar ativo ao longo do ano, atravessando diversas variações ambientais eles foram mais afetados que *P. nattereri* apresentando efeitos negativos do volume germinativo quando exposto a alta temperatura. É, no entanto, importante notar que a temperatura tem diferentes efeitos em diferentes espécies, sendo a sensibilidade térmica relativamente diferente em cada espécie (Rastogi, 1976), assim como visto no estudo. *L. fuscus* ser mais afetada que *P. nattereri* pode estar relacionada a ausência de melanócitos testiculares, assim, não apresentando proteção da melanina afetando

diretamente as células espermatogênicas. Além disso, a grande variedade de padrões na atividade testicular entre diferentes espécies não deve necessariamente obedecer a um mecanismo comum dependente da temperatura (Rastogi, 1976).

O entendimento da influência hipertérmica sobre a espermatogênese é importante para a compreensão dos limites de prever impactos das mudanças climáticas sobre a biodiversidade sendo evidente que a maioria das espécies estará em perigo de exposição às elevadas temperaturas em seus ambientes (Duarte, 2011; Pearson e Dawson, 2003; Araujo e Guisan, 2006). Assim, observamos que a exposição das espécies *P. nattereri* e *L. fuscus* à condição de hipertemia provocou alterações tanto no volume de melanina nos testículos de *P. nattereri*, com aumento progressivo temporalmente, quanto no volume espermatogênico de ambas espécies sendo que a células germinativas de *L. fuscus* foram mais afetadas que *P. nattereri*, possivelmente pela ausência de melanócitos em *L. fuscus* que confere papel protetor sendo que talvez os efeitos da alta temperatura foram abrandados em *P. nattereri* por apresentarem este tipo celular.

Referências Bibliográficas

Araujo, M. B., Guisan, A. 2006. Five (or so) challenges for species distribution modelling. 33, 1677-1688.

Báo, S.N., Dalton, G.C., Oliveira, S. F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA, Journal of Morphology. 207:303-314.

Bastos, R.P. 1995. Vocalização, Territorialidade e Comportamento Reprodutivo de *Scinax rizibilis* (Anura: Hylidae) na Região de Ribeirão Branco, Sul do Estado de São

Paulo. Ph.D. dissertation, Universidade do Estado de São Paulo, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Blaustein, A.R., Wake, D.B. 1995. Declive de las poblaciones de anfibios. *Investigación e Ciencia*. p.8-13.

Brasileiro, C.A., Sawaya, R.J., Kiefer, M.C., Martins, M. 2005. Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica*. 5:1- 17.

Callard, I. P., Callard, G.V., Lance, V., Bolaffi, J.L., Rosset, J. S. 1978. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biology of Reproduction*, 18: 16-43.

Camargo, C.R., Visconti, M.A., and Castrucci, A.M. 1999. Physiological color change in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.* 283, 160–169.

Carey, C. 2005. How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. *Integrative and Comparative Biology* 45: 4–11.

Cavicchia, J. C., Moviglia, G. A. 1983. The blood-testis barrier in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): a freeze-fracture and lanthanum tracer study. *The Anatomical Record*. 205: 387-396.

Duarte, H. S. 2011. A comparative study of the thermal tolerance of tadpoles of Iberian anurans. Tese de Mestrado em Biologia da Conservação. Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. 21p.

Duellman, W. E., Trueb, L. 1999. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-hill. 405p.

Franchi, E., Camatini, M., De-Curtis, I. 1982. Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. *Journal of Ultrastructure Research*. 80: 253-263.

Franco-Belussi, L., Zieri, R.; Santos, L. R. S., Moresco, R.M., Oliveira, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, v. 292, p. 178-182.

Franco-Belussi, L., Silberschmidt Freitas, J., Oliveira, C. 2013. Visceral colouration of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae): Effects of NDP- α -melanocyte stimulating hormone. *Italian Journal of Zoology*. 80:364-372.

Haddad, C.F.B., Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. 55:207-217.

Huang, W. S., Lin, J. Y., Yu, J.Y.L. 1997. Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan. *Zoologist Sciences*. 14: 497-503.

Lofts, B. 1974. Reproduction. *Physiology of the amphibia*. New York: Academic Press. 2: 107-218.

Martins, M. 1988. Biologia reprodutiva de *Leptodactylus fuscus* em Boa Vista, Roraima (Amphibia, Anura), *Revista Brasileira de biologia*, 48:969-977.

Oliveira, C. 1996. Estudo morfológico de testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Botucatu, 131p.

Prado, C.P.A., Haddad, C.F. B. 2005. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, south-western Brazil. *Herpetological Journal* 15:181-189.

Pearson, R.G., Dawson, T.P. 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, 12: 361 -371.

Pough, F. H., Christine, M. J., Heiser, J. B. 2003. A vida dos vertebrados. Atheneu, 3^a edição. São Paulo, 699p.

R Development Core Team. 2015. R: a language and environment for statistical

Rabb, G.B. 1990. Declining amphibian population. *Species*. 13:33-34.

Rastogi R. K., Iela L., Saxena P. K., Chieffi G., 1976 - The control of .spermziogenesis in the green frog, *Raria escrrenfa*. *Journal of Experimental Zoology*, 196:

Rastogi, R.K., Bagnara, J. T., Iela, L., Krasovich, M. A. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*. 197: 277-302.

Rossa-Feres, D.C., Jim, J. 2001. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 18:439-454.

Roubos, E.W., Van Wijk, D.C., Kozicz, T., Scheenen, W.J., and Jenks, B.G. 2010. Plasticity of melanotrope cell regulations in *Xenopus laevis*. *Eur. J. Neurosci*. 32, 2082–2086.

Roulin, A. 2014. Melanin-based colour polymorphism responding to climate change. *Global Change Biology*. doi: 10.1111/gcb.12594. 1-7.

Sazima, I. 1975. Hábitos reprodutivos e fase larvária de *Leptodactylus mystacinus e L. sibilatrix* (Anura, Leptodactylidae). *Disertação de Mestrado*. USP, São Paulo, SP. 71p.

Ucci, A. A. 1982. A fine-structural study of interstitial cell changes in the testes of *Necturus maculosus* during a portion of the annual cycle, and possible evidence for local feedback control by seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*., 65: 27-38

Vitt, L.J., Caldwell, J.P., Wilbur, H.M., Smith, D.C. 1990. Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience*. 40:418.

Wake, M. H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. the gonads and the fat bodies. *Journal of Morphology*. 126: 291-331.

Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25:666-693.

Weygoldt, P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? *Studies on neotropical Fauna and Environment*. 243:249-155.

Wikelski, M., Cooke, S. J.. 2006. Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution*. 21: 38–46.

Wolke, R.E., George, C.J., Blazer, V.S. 1985. Pigmented macrophages accumulations (MMC;PMB): Possible monitors of fish health. In: *Parasitology and pathology of marine organisms of the world ocean*. WG Hargis Jr(ed). 93-97.

Zuasti A., Jará J.R., Ferrer C., Solano F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research*. 2:93-99.

Conclusão geral:

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