

**Análise dos melanócitos viscerais em anuros  
(*Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* e  
*Physalaemus cuvieri*) submetidos a variações de  
fotoperíodo e temperatura**

**Rafaela Maria Moresco**

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia  
Estrutural

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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

RAFAELA MARIA MORESCO

**Análise dos melanócitos viscerais em anuros (*Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* e *Physalaemus cuvieri*) submetidos a variações de fotoperíodo e temperatura**

ORIENTADOR: **PROF. DR. CLASSIUS DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal

Moresco, Rafaela Maria.

Análise dos melanócitos viscerais em anuros (*Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* e *Physalaemus cuvieri*) submetidos a variações de fotoperíodo e temperatura / Rafaela Maria Moresco. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

104 f.; 30 cm.

Orientador: Classius de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Anfíbio. 2. Anuro. 3. Sistema pigmentar. 4. Melanócito. I. Oliveira, Classius. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 597.7

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

**DATA DA DEFESA: 31/03/2009**

**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

**Prof. Dr. Classius de Oliveira**  
**(Orientador)**  
**UNESP/São José do Rio Preto**

---

**Profa. Dra. Marta Verardino de Stéfani**  
**UNESP/Jaboticabal**

---

**Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos**  
**Butantã/São Paulo**

---

**SUPLENTE:**

**Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida**  
**UNESP/São José do Rio Preto**

---

**Prof. Dr. Elias Francisco Lopes de Freitas**  
**UNIRP/São José do Rio Preto**

---

**Dedico esta dissertação a todos os  
alunos e pesquisadores, que façam  
bom uso deste material.**

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Prof. Dr. Classius de Oliveira por todas as oportunidades que me proporcionou no Laboratório de Anatomia. Pela confiança que depositou em mim quando aceitou ser meu orientador. Por todos os auxílios com coletas, leitura e idéias nos trabalhos que escrevi.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento desse projeto via Projeto Universal CNPq (CNPq, Proc. 475248/2007-4). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (FAPESP, Proc. 2005/02919-5). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Aos professores Dr. Eduardo Alves de Almeida e Dra. Maria Tercília de Azeredo Oliveira por participarem da banca de qualificação, fazendo comentários e sugestões pertinentes para o melhoramento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal que em vários momentos ajudaram muito no meu crescimento e amadurecimento profissional. Muito obrigada!

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação do Ibilce e demais funcionários que me auxiliaram inúmeras vezes.

À UNESP por proporcionar a infra-estrutura que precisei para desenvolver meu trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Zieri, Lilian, Thaíse, Lia, Juliane, Juliana e Mariana e os demais colegas de outros laboratórios pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos meus grandes amigos e/ou familiares que mesmo distantes sempre estiveram me apoiando: Tia Ana, Jonatha, Treco, Beto (pelo auxílio em coletas também), Tati, Carla, Clóvis, Jô, Pati, Ka, Daniel e Vital. Muito obrigada por tudo, a amizade de vocês vale ouro!

Aos meus maravilhosos pais Luiz e Lai, por serem para mim exemplos de vida. Por me proporcionarem o maior bem que uma pessoa pode ter: a educação! À minha mãe em particular por ficar horas me ouvindo falar sobre este e outros projetos, aprendendo a apreciar os anfíbios e buscando sempre entender meu trabalho. Ao meu pai em especial por passar tanto conhecimento desde muito cedo, quem sabe por isso eu sempre gostei de biologia! Minha infinita gratidão!

Aos meus queridos e amados irmãozinhos Mariana e Rafael! À Mariana em especial por ser para mim o maior exemplo de vida e perseverança que conheci, sempre me inspirando a passar pelos problemas da vida com muita vontade de vencer! Ao Rafael por me ensinar que “cada um tem seu jeito” desde pequenininho, me fazer rir quando era isso que eu mais precisava sendo sempre uma companhia maravilhosa ou muitas vezes a melhor companhia de todas! Adoro vocês dois!

Ao meu amado namorado Vladimir, por tudo o que fez e faz por mim! Primeiramente por ser o exemplo de profissional que me inspira. Por todas as ajudas no meu trabalho: coletar, montar experimentos, palpitar, corrigir textos, ajudar com traduções, auxiliar no envio do meu primeiro artigo, inúmeras viagens que fizemos em função do meu trabalho... Enfim, impossível listar tudo. E sem falar da pessoa maravilhosa que é. Obrigada querer sempre fazer parte da minha vida, de forma plena! “Não basta ser namorado, tem que participar”! Te amo muito!

## Sumário

|                                                                                                                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Resumo .....</b>                                                                                                                                         | <b>08</b>  |
| <b>Introdução Geral .....</b>                                                                                                                               | <b>10</b>  |
| <b>Referências .....</b>                                                                                                                                    | <b>16</b>  |
| <b>Capítulo 1: A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season .....</b> | <b>20</b>  |
| Abstract .....                                                                                                                                              | 22         |
| Introduction .....                                                                                                                                          | 24         |
| Material and methods .....                                                                                                                                  | 28         |
| Results .....                                                                                                                                               | 30         |
| Discussion .....                                                                                                                                            | 33         |
| Figure captions .....                                                                                                                                       | 35         |
| References .....                                                                                                                                            | 37         |
| <b>Capítulo 2: Relação entre pigmentação visceral e fotoperíodo em anuros neotropicais.....</b>                                                             | <b>42</b>  |
| Resumo .....                                                                                                                                                | 44         |
| Introdução.....                                                                                                                                             | 45         |
| Material e métodos .....                                                                                                                                    | 48         |
| Resultado .....                                                                                                                                             | 50         |
| Discussão.....                                                                                                                                              | 58         |
| Figuras .....                                                                                                                                               | 63         |
| Referências .....                                                                                                                                           | 68         |
| <b>Capítulo 3: A variação térmica influencia o sistema pigmentar extracutâneo de anuros?.....</b>                                                           | <b>73</b>  |
| Resumo .....                                                                                                                                                | 75         |
| Introdução.....                                                                                                                                             | 76         |
| Material e métodos .....                                                                                                                                    | 79         |
| Resultado .....                                                                                                                                             | 81         |
| Discussão.....                                                                                                                                              | 88         |
| Figuras .....                                                                                                                                               | 93         |
| Referências .....                                                                                                                                           | 98         |
| <b>Considerações finais .....</b>                                                                                                                           | <b>104</b> |

## Resumo

O sistema pigmentar extracutâneo é composto por células pigmentares sendo a mais conhecida denominada melanócito, são células grandes e irregulares e no seu conteúdo citoplasmático é que estão os pigmentos (melanina) armazenados em grânulos denominados melanossomos, sendo a própria célula que sintetiza esses pigmentos. Os melanócitos são encontradas em diversos órgãos como rins, baço, testículos, fígado, porções do intestino, encéfalo, ouvido, peritônio e ainda em volta de vasos sanguíneos e nervos. Com esta pesquisa foi descrita a pigmentação visceral padrão de três espécies de anuros: *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus nanus* e *Rhinella schneideri* e observado se existe alguma alteração no sistema pigmentar extracutâneo das espécies submetidas a variações no fotoperíodo (longo-20 horas claro e curto-4 horas claro) e temperatura (alta-35°C e baixa-10°C). Esses parâmetros foram avaliados separadamente utilizando-se para cada um deles 9 animais de cada espécie capturados na região de São José do Rio Preto – SP. Dos 9 animais capturados 3 foram em seguida analisados (grupo controle). Os outros 6 animais foram colocados em uma estufa tipo B.O.D., separados em terrários individuais onde, após 3 dias, 3 deles foram sacrificados e analisados, os outros 3 animais foram sacrificados após 8 dias do início do experimento para suas análises. Nas análises os animais tinham os órgãos expostos para identificar os órgãos que possuíam pigmentação, bem como seu padrão de intensidade que seguiu uma escala de 4 categorias sendo que a categoria número 0 referente à órgãos sem nenhum pigmento e a número 3 órgãos intensamente pigmentados, com 2 estágios intermediários progressivamente mais pigmentados. Os órgãos analisados foram: coração, pericárdio e vasos da base, fígado, baço, peritônio, estômago, intestino e mesentério, reto, testículos, rins e veias renais, pulmões, coluna e plexo nervoso. Muitos órgãos apresentaram padrão de pigmentação nas espécies observadas, principalmente na característica de presença ou ausência de pigmentos em

determinado órgão. O que nos leva acreditar se tratar de uma característica taxonômica, porém, ainda assim, existem variações intra-específicas de intensidade dessa pigmentação. Isso poderia acontecer devido esse sistema estar em constante mudanças, no caso de ter uma função fisiológica ou ser apenas uma característica com variações inter-individuais, porém, que apresente um padrão, de certa forma, regular dentro da espécie. Ao final desse trabalho podemos concluir que o sistema pigmentar extracutâneo não sofre alterações evidentes, em níveis anatômicos, para nas situações em que as variáveis de fotoperíodo e temperatura foram avaliadas.

## Introdução geral

Os anfíbios ocorrem em quase todos os continentes do mundo, não habitando somente regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas. Essa capacidade se deve principalmente ao ciclo de vida que envolve, na maioria das espécies, fase larval aquática e fase adulta terrestre. Além disso, apresentam diversos modos reprodutivos, especialmente os anuros, o que facilitou ao grupo a ocupação de ambientes variados (Duellman & Trueb, 1994). A fauna de anfíbios possui aproximadamente 6.000 espécies, destas 5.362 são anuros, e a América da Sul é a região que mais abriga espécies, compreendidas em 16 famílias (Frost, 2007). Segundo Zug *et al.* (2001), apesar da elevada diversidade de espécies existentes nos ecossistemas brasileiros, os estudos de componentes gerais de comunidades são consideravelmente limitados.

Os anfíbios são altamente suscetíveis às alterações ambientais, em função da permeabilidade de sua pele e por ocuparem uma grande variedade de ambientes, o que lhes confere o status de ótimos indicadores da qualidade ambiental (Napoli & Caramaschi, 2000). Os habitats acabam funcionando como fatores limitantes à reprodução, onde as espécies que apresentam modos reprodutivos dependentes de água reúnem-se em habitats aquáticos adequados à ovipostura e ao desenvolvimento larval, formando-se agregações com alto potencial para interações intra e interespecíficas (Crump, 1974). Diferenças temporais nas estações reprodutivas podem constituir fator importante no isolamento reprodutivo de espécies que utilizam um mesmo habitat (Crump, 1974; Toft, 1985; Bertoluci, 1998).

De acordo com Zug *et al.* (2001), a sistemática do grupo encontra-se da seguinte forma: Classe Amphibia, Subclasse Lissamphibia, compreendendo três ordens:

Caudata ou Urodela (salamandras e tritões), anfíbios com dois a quatro membros e cauda longa (553 espécies); Gymnophiona ou Apoda (cobras-cegas, cecílias), anfíbios sem membros com formato vermiforme e muitos anéis corporais (173 espécies); e Anura ou Salientia (sapos, rãs e pererecas), anfíbios sem cauda e com os membros posteriores modificados para o salto (5.283 espécies).

Três espécies muito abundantes na região de São José do Rio Preto, SP, são *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826 - Leiuperidae), *Dendropsophus nanus* (Boulenger, 1889 - Hylidae) e *Rhinella schneideri* (Werner, 1894 - Bufonidae). A primeira espécie é conhecida popularmente como rã cachorro, devido ao canto que possui. Ocorre no Brasil nas regiões sul, sudeste e nordeste, na Argentina, Paraguai, Bolívia e possivelmente em planícies ao sul da Venezuela. Seu comprimento total é de 24 a 32 mm. A coloração dorsal é variável, usualmente com tonalidades fracas de castanho ou cinza com manchas ou linhas escuras. Habitam áreas abertas, sendo que o acasalamento ocorre em açudes e banhados, ou em corpos d'água temporários, como pequenas poças. Os ovos são depositados em ninhos de espuma (Frost, 2007; Kwet & Di-Bernardo, 1999).

A segunda espécie apresenta larga distribuição pela América do Sul, com grande ocorrência durante o ano todo em algumas regiões, o que facilita o seu estudo. Possui porte pequeno atingindo no máximo 20 mm. Sua coloração dorsal varia do castanho, castanho-alaranjado ou bege, algumas vezes esbranquiçado com pequenos pontos de coloração castanho escuro e ventre claro. É considerada uma espécie de ampla plasticidade na ocupação de microhábitats, reproduzindo-se em corpos d'água sem correnteza. Os machos utilizam como sítios de vocalização, para atraírem fêmeas, ramos de vegetação que emergem dessas poças (Kwet & Di-Bernardo, 1999; Frost, 2007).

A terceira espécie é popularmente conhecida como sapo-cururu. Atualmente pode ser encontrada do Uruguai à Bolívia central, passando pelo Paraguai e Argentina e no Brasil principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Mato Grosso, Goiás e Região Sul. É um animal de porte relativamente grande com comprimento total de 180 a 210 mm. A coloração varia do castanho-claro a escuro ou esverdeado. Possui pele áspera com região dorsal bastante rugosa devido à presença de glândulas cutâneas. Os machos costumam vocalizar nas margens de lagos, lagoas e açudes, em áreas abertas, apenas durante a noite. Possuem comportamento reprodutivo explosivo e para atrair as fêmeas, podem além de vocalizar, procurar ativamente por parceiras sexuais. O amplexo é axilar e a desova é depositada na forma de cordões gelatinosos, em ambientes lênticos, nos quais os girinos se desenvolvem (Frost, 2007; Cardoso, 2003).

Uma característica importante encontrada nos anuros é seu padrão de coloração cutânea o que facilita muitas vezes sua camuflagem, sendo que essas cores podem variar de uma região para outra. Além disso, células pigmentares contendo melanina são encontradas em diversos órgãos internos desses animais, porém, esta característica não é única do grupo dos anuros, estando presente em todos os animais ectotérmicos que possuem essa pigmentação visceral, constituindo o sistema pigmentar extracutâneo, agrupamento que abrange células pigmentares, sendo estas melanogênicas ou não (Christiansen *et al.*, 1996; Sichel *et al.*, 1997; Zuasti *et al.*, 1998; Akulenko, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002, 2003; Oliveira & Zieri, 2005; Zieri *et al.*, 2007).

Os melanócitos são células grandes e irregulares; no seu conteúdo citoplasmático é que estão os pigmentos (melanina) armazenados em grânulos denominados melanossomos. Quando apresenta atividade fagocitária é denominada “célula pigmentada tipo macrófago” (Micale & Perdichizzi, 1990) ou “macrófagos

pigmentados” (Manera *et al.*, 2000) e no fígado recebem o nome de células de Kupffer. A função deste sistema melanogênico não está definida (Rund *et al.*, 1998; Zieri *et al.*, 2007). Órgãos como rins, baço, testículos, fígado, porções do intestino, encéfalo, ouvido, peritônio e ainda em volta de vasos sanguíneos e nervos possuem pigmentos com diferentes ocorrências, quantidades e tipos dependendo da espécie ou quem sabe das variáveis ambientais a que estes animais estão expostos (Prelovsek & Bulog, 2003; Zieri *et al.*, 2007; Santos & Oliveira, 2007).

Segundo Oliveira & Zieri (2005) em seu estudo com *Eupemphix nattereri* foi constatado uma íntima relação dos melanócitos com o sistema vascular de diversos órgãos. Essas células são constituintes do próprio tecido conjuntivo do órgão ou de tecidos associados ao mesmo, como túnicas adventícias ou membranas serosas. Em muitos locais as células pigmentadas apresentam aspecto dendrítico com muitos prolongamentos citoplasmáticos repletos de pigmentos. Quando há deslocamento dos pigmentos para o centro da célula estas se apresentam com aspecto puntiforme e centro mais escuro. Essa característica morfológica é semelhante à apresentada pelos melanócitos da cútis, porém não existem estudos que evidenciem semelhanças funcionais.

Em seus habitats naturais o desempenho animal está condicionado às mudanças do ambiente, sendo que as principais variáveis abióticas que influenciam são: temperatura do ar, umidade relativa, radiação solar, vento, pluviosidade, luminosidade e a altitude. Todas essas variáveis mudam durante as estações do ano, porém, não se alteram da mesma forma em diferentes regiões, assim, os animais reagem de diversas maneiras a distintas condições que lhes são impostas pelo ambiente (Esmay, 1969; Vigoderis, 2002; Macieira & Proni, 2004). Essas respostas podem ser observadas em vários níveis estruturais do organismo como em células, tecidos ou órgãos, isso

dependerá do agente, grau de exposição e susceptibilidade do organismo (Williams & Iatropoulos, 2002).

O sistema pigmentar, embora determinado geneticamente, pode ser alterado em função de uma série de estímulos ambientais ou alterações endógenas. Denominamos mudança de cor morfológica aquela onde a coloração altera-se lentamente resultante principalmente do aumento ou diminuição de células pigmentares ou de pigmentos no seu interior e está normalmente associadas com mudanças ontogenéticas, sexuais, alimentares ou sazonais. A mudança de cor fisiológica ocorre em animais que possuem a capacidade de alterar rapidamente a sua coloração devido à migração bidirecional dos pigmentos dentro das células pigmentares. Os estímulos ambientais que provocam essas mudanças estão associados principalmente a mudanças na intensidade luminosa, na cor do ambiente ou alteração no contexto social (Bagnara & Hadley 1973; Sugimoto, 2002).

Algumas pesquisas mostram mudanças estruturais e funcionais drásticas nessas células ao longo do ciclo de hibernação, período caracterizado por baixa temperatura e pouca oferta de alimento. Em experimento com 3 espécies de anfíbios: *Rana esculenta*, *Triturus a. apuanus* e *Triturus carnifex* foi observado que o conteúdo de pigmento no parênquima do fígado era expressivamente maior no período de hibernação do que no período de atividade (Barni *et al.*, 1999, 2002).

Poucos estudos foram realizados para se ter uma resposta sobre a função ou funções do sistema pigmentar extracutâneo em animais. A maioria dos estudos estão voltados para as células pigmentadas do baço e principalmente do fígado, as células de Kupffer que apresentam atividade fagocitária (Corsaro *et al.*, 2000; Sichel *et al.*, 2002). Essas células possuem enzimas capazes de realizar atividades de peroxidase e lipase (Gallone *et al.*, 2002).

Testes feitos com culturas de células de Kupffer expostas aos efeitos de NDP-

MSH foram feitos para entender melhor os processos que estimulam a produção de melanina por elas, e avaliar o nível de expressão do gene produtor (Guida *et al.*, 2004). Outro fator que está ligado às mudanças sofridas por essas células é o nível de poluição ambiental, pois é no fígado que processos de biotransformações de agentes nocivos ao organismo ocorrem (Fenoglio *et al.*, 2005). Esse estudo nos permite pensar que avaliações do padrão das células de Kupffer de anuros, por exemplo, poderiam servir como bioindicadores de qualidade ambiental.

## Referências

- Akulenko, N. M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). *Vestnik Zoologii*, 32(3): 49-53.
- Bagnara, J.T. & Hadley, M.E. 1973. Chromatophores and color change, the comparative physiology of animal pigmentation. *The Quarterly Review of Biology*, 49(2): 159-160.
- Barni, S.; Bertone, V.; Croce, A.C.; Bottiroli, G.; Bernini, F. & Gerzeli, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195: 19-25.
- Barni, S.; Vaccarone, R.; Bertone, V.; Frascini, A.; Bernini, F. & Fenoglio, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *Jornal of Anatomy*, 200: 185-194.
- Bertoluci, J.A. 1998. Annual patterns of breeding activity in Atlantic Rainforest anurans. *Journal of Herpetology*, 32: 607- 611.
- Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Fan, H.W.; Malaque, C.M.S. & Haddad Jr, V. 2003. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier. 469p.
- Christiansen, J.L.; Grzybowski, J.M. & Kodama, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, 9(4): 185-190.
- Corsaro, C.; Scalia, M.; Leotta, N.; Mondio F. & Sichel, G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*, 196: 249-261.
- Crump, M.L. 1974. Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Miscellaneous Publication Museum of Natural History*, 61: 1- 68.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-Hill, 670p.
- Esmay, M.L. 1969. *Environmental Engineering in Agriculture and Food Series*. The AVI Publishing Company, 325p.
- Fenoglio, C.; Boncompagni, E.; Fasola, M.; Gandini, C.; Comizzoli, S.; Milanese, G. & Barni, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cell of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology*

- and *Environmental Safety*, 60: 259-268.
- Frost, D.R. 2007. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.0 (1 Fevereiro, 2007). Endereço eletrônico de acesso: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. *American Museum of Natural History*.
- 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.
- Guida, G.; Zanna, P.; Gallone, A.; Argenzio, E. & Cicero, R. 2004. Melanogenic Response of the kupffer Cells of *Rana esculenta* L. to Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Research*, 17: 128-134.
- Johnson, J.C.; Schwiesow, T.; Ekwall, A.K. & Christiansen, J.L. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. *Pigment Cell Research*, 12(6): 376-382.
- Kwet, A. & Di-Bernardo, M. 1999. *Anfíbios – Amphibien – Amphibians*. Porto Alegre, EdUPUCRS, 110p.
- Macieira, O.J.D. & Proni, E.A. 2004. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae) durante os períodos de verão e inverno. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21(4): 893-896.
- Manera, M.; Serra, R.; Isani, G. & Capené, E. 2000. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. *Journal of Fish Biology*, 57: 457-465.
- Micale, V. & Perdichizzi. 1990. A quantitative and histochemical study on melanomacrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. *Journal of Fish Biology*, 37(2): 191-197.
- Napoli, M.F. & Caramaschi, U. 2000. Description and variation of a new Brazilian species of the *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). *Alytes*, 17(3-4): 165-184.
- Oliveira, C.; Zanetoni, C. & Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia*, 20(3): 263-268.
- Oliveira, C.; Sant'anna, A.C.; Omena, P.M.; Santos, L.R.S & Zieri, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* e *Scinax fuscovarius*. *Biociências*,

11(1): 39-46.

- Oliveira, C. & Zieri, R. 2005. Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2): 454-460.
- Prelovsek, P.M. & Bulog B. 2003. Biogenesis of Melanosomes in Kupffer Cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *Pigment Cell Research*, 16: 345-350.
- Ribeiro, M.G. & Lima, S.R. 2000. *Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia*. Belo Horizonte, Segrac Editora, 89 p.
- Rund, C.R.; Christiansen, J.L. & Johnson, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Research*, 11(2): 114-119.
- Santos, L.R.S. & Oliveira, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(26): 64-70.
- 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.
- Sichel, G.; Scalia, M. & Corsaro, C. 2002. Amphibia Kupffer cells. *Microscopy Research and Technique*, 57: 477-490.
- Sugimoto, M. 2002. Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology. *Microscopy Research Technique*, 58:496-503.
- Toft, C.A. 1985. Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia*, 1985: 1-21.
- Vigoderis, R.B. 2002. *Desenvolvimento de um protótipo para resfriamento adiabático evaporativo, em instalações climatizadas para animais, usando argila expandida*. Tese de Magister Scientiae. Universidade Federal de Viçosa, 53p.
- Williams, G.M. & Iatropoulos, M.J. 2002. Alterations of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30: 41-53.
- 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.; Jiménez-Cervantes, C.; Garcia-Berrón, J.C. & Ferrer C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology*, 61:

305-316.

Zug, G.R.; Vitt, L.J. & Caldwell, J.P. 2001. *Herpetology. An introductory biology of amphibians and reptiles*. 2<sup>a</sup> ed. San Diego, CA: Academic Press, 630p.

## **CAPÍTULO 1**

**A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran  
amphibian species evaluated during the breeding season**

**A COMPARATIVE STUDY OF THE EXTRACUTANEOUS PIGMENTARY  
SYSTEM IN THREE ANURAN AMPHIBIAN SPECIES EVALUATED DURING THE  
BREEDING SEASON**

Rafaela Maria Moresco and Classius de Oliveira

**Artigo aceito na South American Journal of Herpetology**

Keywords: Visceral Chromatophores; *Dendropsophus nanus*; *Physalaemus cuvieri*; *Rhinella schneideri*.

## Abstract

The present investigation examined the extracutaneous pigmentation pattern of three species of anuran amphibians, *Dendropsophus nanus*, *Physalaemus cuvieri*, and *Rhinella schneideri*, during the course of their breeding seasons. Pigmentation intensity in the different organs was graded on a 4-category scale, in which category 0 refers to organs without pigment and category 3 refers to intensely pigmented organs, with 2 intermediate stages of progressively stronger pigmentation. *Rhinella schneideri* showed testicular pigmentation, with intra-specific variation (categories 0 and 1). In *P. cuvieri* there was variation in the presence of pigmentation in the lungs: all the animals showed pigmentation (category 1) at the beginning of the breeding season, and as the season progressed the absence of pigments became the most common pattern. In the liver of the first animals collected, the pigment intensity was high (category 2) with many iridophores present, but in the last specimens collected no iridophores were found. The variation in *D. nanus* occurred in the kidneys, where animals collected at the beginning of the season did not show pigmentation. Renal veins displayed few melanocytes (category 1); animals collected at the end of the season showed more pigmentation in the kidney (category 2), whereas in the renal veins the intensity remained the same. The changes observed in the extracutaneous pigment system in some organs, during the reproductive period, may be due to physiological alterations or may represent a species-specific characteristic.

## Resumo

Essa pesquisa buscou estabelecer o padrão de pigmentação extracutânea de três espécies de anfíbios anuros, *Dendropsophus nanus*, *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella schneideri*, ao longo do seu período reprodutivo. Para tal foi estabelecido um protocolo de qualificação da intensidade de pigmentação apresentada nos diferentes órgãos seguindo uma escala de 4 categorias sendo a categoria 0 referente à órgãos sem nenhum pigmento e a categoria 3 órgãos intensamente pigmentados, com 2 estágios intermediários progressivamente mais pigmentados. *Rhinella schneideri* apresentou pigmentação testicular com variação intra-específica (categoria 0 e categoria 1). Em *P. cuvieri* houve variação na presença de pigmentação nos pulmões onde todos os animais no início do período reprodutivo apresentaram pigmentação (categoria 1), com o passar do período o padrão mais comum passou a ser ausência de pigmentos. No fígado dos primeiros animais coletados a intensidade de pigmentação observada foi grande (categoria 2) com muitos iridóforos presentes, porém, nos últimos animais coletados não foi registrado esse tipo celular. A variação em *D. nanus* ocorreu nos rins, onde animais coletados no início do período não apresentaram pigmentação e nas veias renais poucos melanócitos (categoria 1), já nos animais coletados no final desse período pôde-se observar maior presença de pigmentação no rim (categoria 2), porém, nas veias renais a intensidade permaneceu a mesma. As mudanças observadas no sistema pigmentar extracutâneo em alguns órgãos, ao longo do período reprodutivo, podem ser decorrentes de alterações fisiológicas ou apenas representarem uma característica espécie-específica.

## Introduction

Chromatophores are cells that contain pigment granules, and occur principally in the dermis and epidermis of animals. These cells can be classified by their pigment content. The melanocyte-like cells produce and store melanin inside spherical or ovoid structures called melanosomes (Agius and Roberts, 2003). These cells are large and irregular in shape, with a great amount of intensely pigmented cytoplasm, and may be seen under stereoscope microscopy (Zieri et al., 2007). When melanocytes show macrophagic activity they may be termed a “pigmented macrophage-type cell” (Micale and Perdichizzi, 1990), “melanomacrophage” or “pigmented macrophage” (Manera et al., 2000). Other cells that contain pigments are iridophores, which contain purines and crystals of pteridine and are iridescent; and xanthophores and erythrophores, which contain pteridines and carotenoids and are yellow or orange (Klaus, 2006).

In ectothermal animals, these pigmented cells are found not only in the dermis and epidermis, but also in different internal organs, constituting the extracutaneous pigment system. The function of this melanogenic system and the factors that alter its occurrence are not defined (Christiansen et al., 1996; Sichel et al., 1997; Akulenko, 1998; Rund et al., 1998; Zuasti et al., 1998; Johnson et al., 1999; Oliveira et al., 2002, 2003; Oliveira and Zieri, 2005; Zieri et al., 2007). Organs such as the kidneys, spleen, testicles, liver, portions of the intestine, brain, ears, peritoneum, and even areas around the blood vessels and nerves possess pigments with different occurrences, quantities, and types, depending on the species (Benedito et al., 1997; Prelovsek and Bulog, 2003; Santos and Oliveira, 2007; Zieri et al., 2007).

Oliveira and Zieri (2005), in their study on *Eupemphix nattereri* (cited as *Physalaemus nattereri*), observed a close relationship between melanocytes and the vascular system of different organs. These cells are constituents of the connective tissue of the organ

itself or of tissues associated with it, such as the tunica adventitia or serous membranes. In many locations, pigmented cells are dendritic, with many cytoplasmic projections filled with pigments. When the pigments granules move to the center of the cell, the cells appear punctate with a darker center (Wang et al., 1997; Rodionov et al., 1998; Rogers and Gelfand, 1998; Oliveira and Zieri, 2005). This morphological characteristic is similar to that shown by the melanocytes of the skin, but there are no studies showing functional similarities between these two types of structure (Meyer zum Gottesberge, 1988).

The synthesis of the melanin occurs from the amino acid tyrosine, catalyzed for the enzyme tyrosinase, by means of a complex chain of oxidative reactions that converts the L-tyrosina into L-dopa and, after that, Melanin. In a previous study with Kupffer cell cultures of *Rana esculenta* L., it was demonstrated transcriptional activity in the tyrosinase gene of these cells (Guida et al., 2004). Moreover, when the time of culture of the cells was increased from 0 to 72 hr, an appreciable increase occurred in the amplification products of the tyrosinase gene, as well as in the level of dopa oxidase activity and in the quantity of melanin in the cells. Kupffer cell cultures exposed to the effects of NDP-MSH were performed to better understand the processes that stimulate their melanin production, and to evaluate the level of producer gene expression (Guida et al., 2004). In melanocytes of the skin, increasing in the  $\alpha$ MHS concentration resulted in the increasing of the intracellular level of cAMP. The production of cAMP was also induced using IBMX or forskolin to activate the expression of the tyrosinase gene. The results of this study showed that while the hormonal treatment always activated the Kupffer cells tyrosinase system, treatment with IBMX or forskolin never did it. These results suggest that tyrosinase induction by hormonal treatment in KCs is not mediated by the cAMP. Another factor linked to changes experienced by these cells is the environmental pollution, since it is the liver the organ that biotransform harmful agents (Fenoglio et al., 2005). This study suggested that the pattern of Kupffer cells in anurans may

serve as bioindicators of environmental quality.

The pigment system, although genetically determined, can be altered as a function of environmental stimuli or endogenous alterations. The main abiotic variables that influence them are air temperature, relative humidity, solar radiation, wind, rainfall, and photoperiod. All these factors change seasonally along the year, and the animals may respond to these changes in different ways (Macieira and Proni, 2004). These responses are observed at various structural levels of the organism, including the cells, tissues, or organs; and depend on the agent, degree of exposure, and susceptibility of the organism (Williams and Iatropoulos, 2002). A change in morphological coloration is defined as a slow color change resulting from the increase or decrease in number of pigment cells or in the amount of pigment within the cells. Such a change is usually associated with ontogenetic, sexual, feeding or seasonal changes. Physiological color change occurs in animals that possess the capacity to rapidly alter their coloration by the bidirectional migration of pigment granules within the pigment cells. Environmental stimuli that evoke these changes are mainly associated with light intensity, background color or social context (Bagnara and Hadley, 1973; Sugimoto, 2002).

Few studies have investigated the functions of the extracutaneous pigment system in animals. The majority of studies have focused on the pigmented cells of the spleen and, particularly, of the liver, which are known as Kupffer cells and show phagocytic activity. They can be classified as "small" and "large" Kupffer cells, according to their melanin content (Corsaro et al., 2000; Sichel et al., 2002). These cells possess peroxidase and lipase enzymes (Gallone et al., 2002). Some studies have described drastic structural and functional alterations in the Kupffer cells during the hibernation cycle, a period characterized by low temperature and reduced food supply. In an experiment on three amphibian species, *Rana esculenta*, *Triturus a. apuanus* and *Triturus carnifex*, the pigment content in the liver parenchyma was much higher in the hibernation period than in the active period (Barni et al.,

1999, 2002).

The present study assessed the changes in the extracutaneous pigment system in anuran amphibians during their reproductive period.

## Material and methods

The study was carried out with three anuran species from the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil (20°45'47.5"S, 49°19'38.8"W): *Rhinella schneideri*, *Physalaemus cuvieri*, and *Dendropsophus nanus*. The species were selected because of their high population densities and because they occupy different ecological niches within the same habitat. Male specimens were collected during the breeding season (in the rainy months).

Four field trips during the reproductive season resulted in the capture of three male specimens of each species (02010.0003336/05-53 – IBAMA). They were anesthetized and killed by submersion in 20% ethanol as soon as they arrived in the laboratory, according to the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals – UNESP (Protocol 001/06 – CEEA). The animals were opened by laparotomy and had their organs exposed for observation with a stereomicroscope (Leica MZ16) coupled to an image-capturing system. The organs that possessed pigmentation were noted, and if pigmentation was present, the pattern of intensity and distribution. This followed a scale of four categories, in which category number 0 referred to organs without any pigment, while category number 3 corresponded to intensely pigmented organs, with two intermediate stages of progressively increasing pigmentation. The methodology for descriptive anatomical analysis was detailed in a study by Franco-Belussi et al. (2009).

Because of species-specific seasonal differences, the specimens were collected in different months, which corresponded to their breeding seasons. These were divided into two periods: post-estivation, when the males were easily found vocalizing or grasping females in amplexus; and pre-estivation, when the few animals found were not vocalizing or mating with females, but were only feeding. The specimens of *Rhinella schneideri* were collected between

12 October and 19 November 2007; *Physalaemus cuvieri* between 6 December 2007 and 31 January 2008; and *Dendropsophus nanus* between 7 January and 5 March 2008.

## Results

Some patterns of the extracutaneous pigment system could be traced in these species, as follows (Figure 1 and Figure 2):

### - *Rhinella schneideri*

In *R. schneideri*, the hearts of all individuals followed the same pigmentation pattern during the entire period, possessing a pericardium with little pigmentation (category 1) and vessels of the cardiac muscle and base without pigmentation (category 0) (Fig. 1A). Likewise, neither the lungs (Fig. 1D), stomach (Fig. 2A), intestine (Fig. 2D), rectum (Fig. 2G), or mesentery showed any pigmentation. In the majority of individuals (90%), the nervous plexus and vertebral column (Fig. 1J) had little pigmentation (category 1). The kidney (Fig. 2J) was also devoid of pigmentation in most individuals, although one specimen had a kidney with many chromatophores containing orange pigment. The testicles varied more with the presence (category 1) or absence of pigmentation (category 0). In those with pigmentation, spots at certain sites were observed, and these spots varied during the reproductive period. At the beginning, the pigments in the gonads were discrete and/or punctuate, whereas at the end of the period larger pigmented areas were seen (Fig. 2M). The pigment was present not only on the external membrane but also in the interior, distributed homogeneously in the stroma throughout the organ. In the liver of this species, pigmentation intensity varied from absence (category 0) (Fig. 1G) to strong presence (category 2). Animals collected soon after the beginning of the reproductive period showed a total absence of pigmentation (33%) or very little pigmentation (66%), whereas animals collected at the end of the period showed more intense pigmentation: category 2 (50%), category 1 (33%) or category 0 (17%). The parietal peritoneum showed the same ratio of pigmentation present in the liver: at the outset of the

reproductive period, 100% of individuals showed little pigmentation (category 1) (Fig. 1M), and at the end of this period, 83% showed a large amount of pigment (category 2) and 17% showed little pigmentation (category 1).

- *Physalaemus cuvieri*

*Physalaemus cuvieri* showed wide variation in pigmentation during the reproductive period. The heart in 60% of individuals had the pericardium with little pigmentation (category 1), highly pigmented basal vessels (category 2), and cardiac muscle without pigmentation (category 0) (Fig. 1C). Iridophore-type cells were present in the pericardium, with an intensity similar to that of the melanocytes. It was not possible to establish a relationship between the pattern shown by the majority of animals and the variables during the reproductive period. Lung pigmentation also varied: all animals from the first collection at the beginning of the reproductive period showed pigmentation (category 1), while in those collected later in the season this pigmentation became rare, and the most common pattern came to be the absence of pigment (category 0), in 66% of all individuals from the last collection (Fig. 1F). The stomach of some individuals (41%) showed pigmentation in small areas (category 1), while the others showed none (category 0) (Fig. 2C). It was impossible to establish a link between the patterns shown and the reproductive period, although the intestine showed patterns of either no pigmentation (category 0) or a discrete presence in the mesentery (Fig. 2F) and rectum (category 1) (Fig. 2I). The majority of animals showed conspicuous pigmentation in the liver (category 2) (Fig. 1I). However, during the breeding season, the presence of iridophores changed. They were abundant in the first animals collected, and as the season continued their occurrence diminished, until this cell type was no longer found in the last group. The nervous plexus (Fig. 1L) and peritoneum (Fig. 1O) were strongly pigmented (category 2). Similar intense pigmentation was present in renal vessels, but in the kidneys

there was less pigmentation (category 1) (Fig. 2L). The testicles were intensely pigmented (category 3) during the entire reproductive period (Fig. 2O).

- *Dendropsophus nanus*

In *D. nanus*, the heart showed a consistent pattern: the pericardium was unpigmented (category 0), and the basal vessels had little pigmentation, as did the heart (category 1) (Fig. 1B). Iridophore-like cells were present in the pericardium and also in the parietal peritoneum (Fig. 1N). The lung and the vertebral column in the majority of specimens (75%) showed little pigmentation (category 1) (Fig. 1E). The nervous plexus (Fig. 1K), stomach (Fig. 2B), intestine and mesentery (Fig. 2E), and rectum (Fig. 2H) of all individuals showed no pigmentation (category 0) during the course of the reproductive period. In the kidneys of specimens collected at the outset of the breeding season, pigments were absent (category 0), and the renal veins showed more intense pigmentation (category 1) (Fig. 2K). Animals collected at the end of the period showed greater pigmentation in the kidney (category 2), while renal-vein pigment intensity remained the same. The testicles showed no pigmentation in any specimens (Fig. 2N).

## Discussion

In the present study, none of the structures that underwent alteration in pigmentation during the reproductive period could be associated with or compared among species, since the occurrence was in a different species. In fishes, as reported in prior studies, the presence of extracutaneous pigment is highly variable, even among phylogenetically related species (Zuasti, 1990). If the pigmentation has some function, it probably may differ in degree for each species. A species-specific pattern of extracutaneous pigmentation has been employed as a taxonomic and phylogenetic characteristic in anurans, and testicular pigmentation is an important phenotypic character of the family Dendrobatidae (Grant et al., 2004, 2006) and in some species of the family Leiuperidae and Leptodactylidae (Franco-Belussi et al., 2009).

Although studies with amphibians have identified the presence of macrophage-type pigmented cells, that resemble melanocytes in possessing melanin granules in their cytoplasm, in the liver (Kupffer cells) and spleen, there are no studies showing a functional relationship between pigment cells existing in these organs versus the other pigmented cells that compose the extracutaneous pigment system (Micale and Perdichizzi, 1990; Manera et al., 2000). Fenoglio et al. (2005) demonstrated an increase in the number and melanin content of Kupffer cells in more polluted environments. Similarly, a study by Loumbourdis and Vogiatzis (2002) established a direct relationship between the increase of melanomacrophages and exposure to cadmium in *Rana ridibunda*. Studies have attributed to melanin the properties of redox potential and the capacity to transfer electrons and accumulate toxic substances and metal ions, among others (Wästerström, 1984; Agius and Roberts, 2003). In mammals, these pigments are also related to the maintenance of homeostasis of both intracellular calcium (melanocyte) and extracellular calcium (epidermis). The low extracellular concentrations of

this cation lead an increasing of pigment in the melanocytes (Meyer zum Gottesberge, 1988; Benedito et al., 1997).

The different pigmentation pattern observed intra-specifically lead us to propose that the extracutaneous pigment system experiences, in some organs, alterations during the course of the reproductive cycle, modeled by biotic or abiotic factors that should be investigated in subsequent studies, in order to determine if this system owns a function. If no function were observed, these variations may represent a characteristic of ectotherms animals.

### **Acknowledgements**

To the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2005/02919-5), to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 475248/2007-4) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for support of this research.

## Figure captions

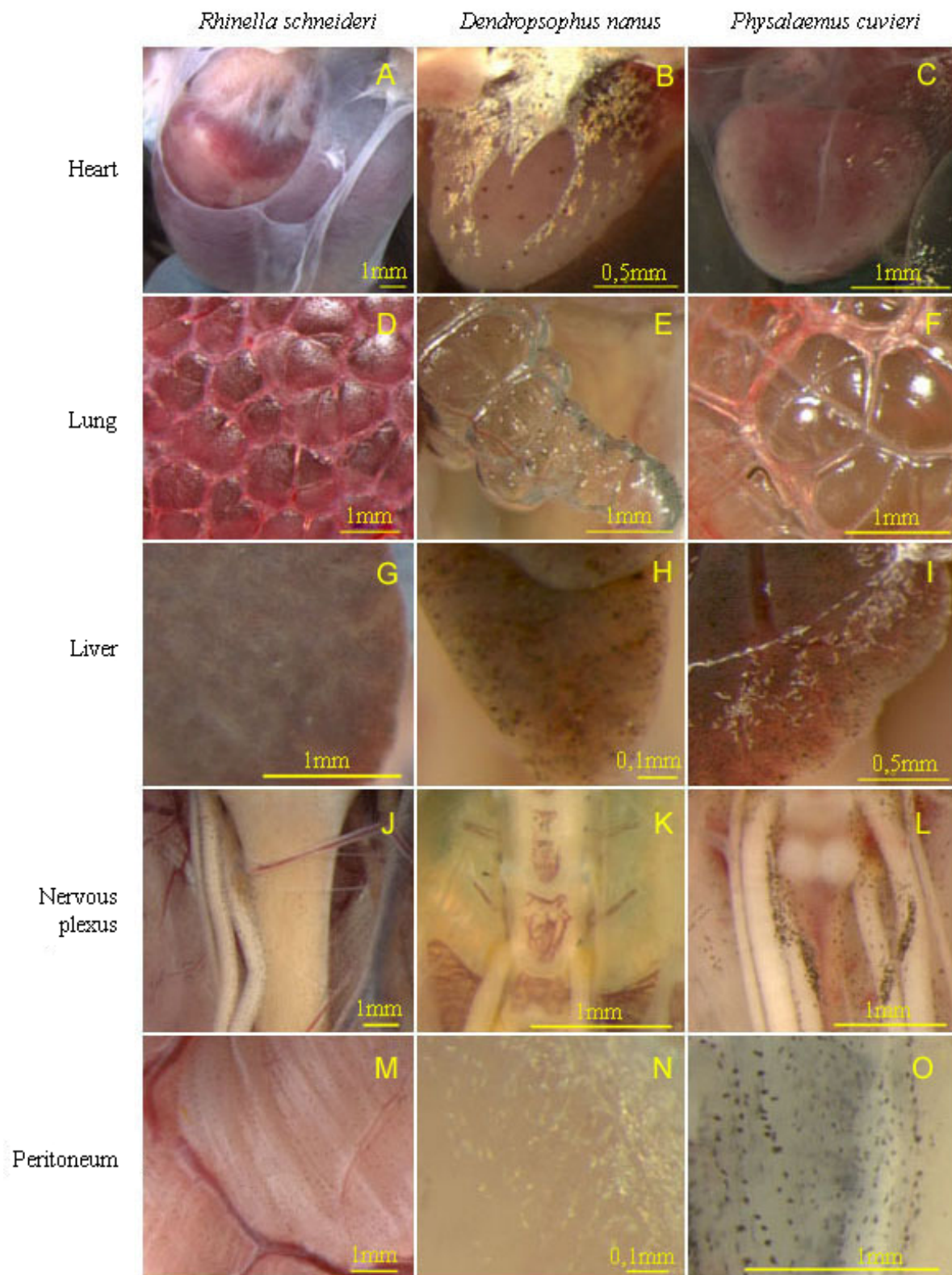


Figure 1 - Occurrence of pigmentation in the heart, lung, liver, nervous plexus and peritoneum of *Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* and *Physalaemus cuvieri*.

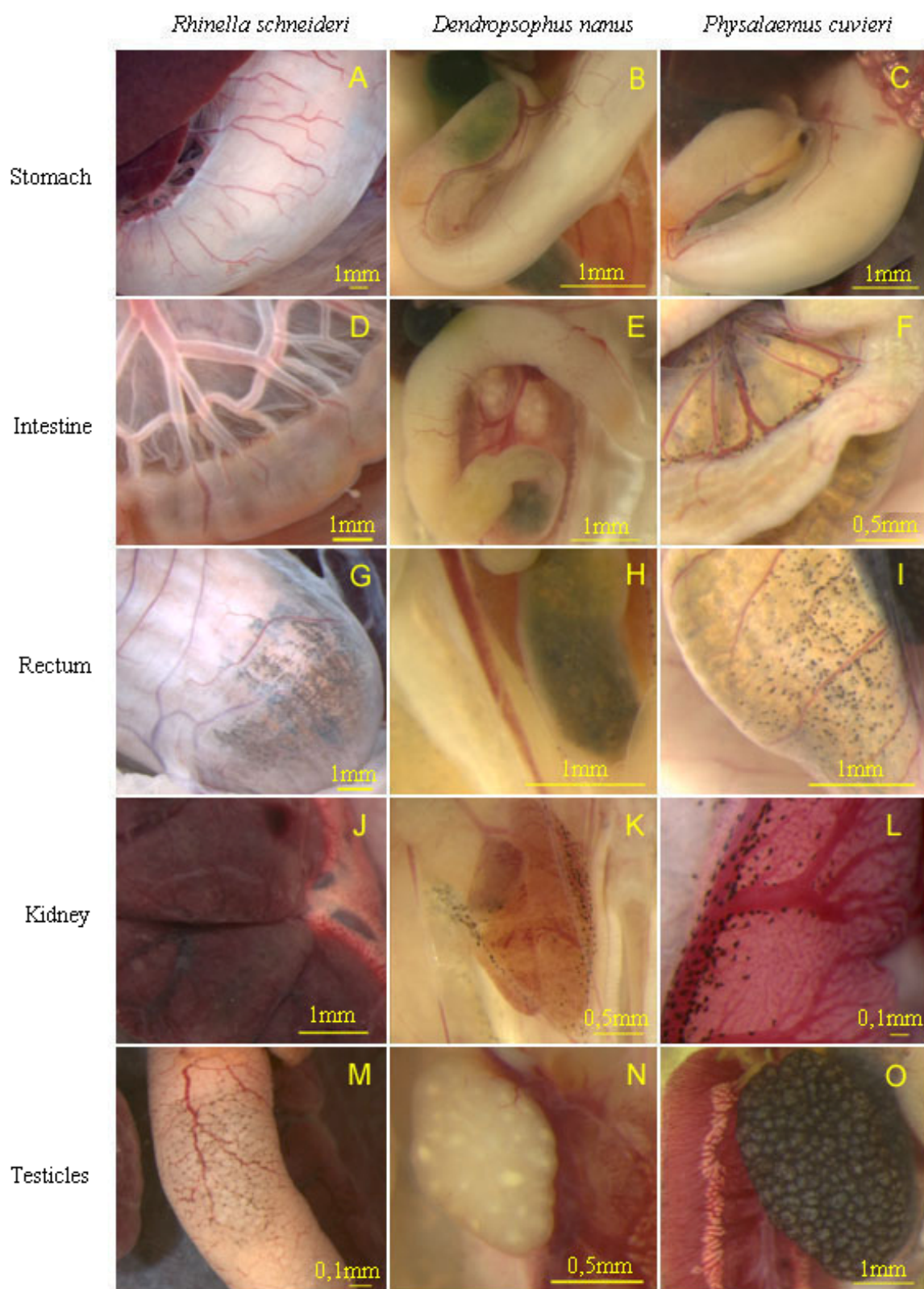


Figure 2 - Occurrence of pigmentation in the stomach, intestine, rectum, kidney and testicles of *Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* and *Physalaemus cuvieri*.

## References

- Agius, C., and R. J. Roberts. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26: 499-509.
- Akulenko, N. M. (1998). Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). *Vestnik Zoologii*, 32(3): 49-53.
- Bagnara, J. T., and M. E. Hadley. (1973). Chromatophores and color change, the comparative physiology of animal pigmentation. *The Quarterly Review of Biology*, 49(2): 159-160.
- Barni, S., V. Bertone, A. C. Croce, G. Bottiroli, F. Bernini, and G. Gerzeli. (1999). Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195: 19-25.
- Barni, S., R. Vaccarone, V. Bertone, A. Frascini, F. Bernini, and C. Fenoglio. (2002). Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *Journal of Anatomy*, 200: 185-194.
- Benedito, E., C. Jiménez-Cervantes, D. Pérez, J. D. Cubillana, F. Solano, J. Jiménez-Cervantes, A. M. Meyer zum Gottesberge, J. A. Lozano, and J.C. Garcia-Borrón. (1997). Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336: 59-72.
- Christiansen, J. L., J. M. Grzybowski, and R. M. Kodama. (1996). Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, 9(4): 185-190.
- Corsaro, C., M. Scalia, N. Leotta, F. Mondio, and G. Sichel. (2000). Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*, 196: 249-261.
- Fenoglio, C., E. Boncompagni, M. Fasola, C. Gandini, S. Comizzoli, G. Milanese, and S. Barni. (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.
- Franco-Belussi, L., R. Zieri, L. R. S. Santos, R. M. Moresco, and C. Oliveira. (2009). Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. *The Anatomical Record*, 292: 178-182.
- Gallone, A., G. Guida, I. Maida, and R. Cicero. (2002). Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? *Pigment Cell Research*, 15: 32-40.
- Grant, T. (2004). On the identities of *Colostethus inguinalis* (Cope, 1868) and *C. panamensis* (Dunn, 1933), with comments on *C. latinasus* (Cope, 1863) (Anura: Dendrobatidae). *American Museum Novitates*, 3444: 1-24.
- Grant, T., D. R. Frost, J. P. Caldwell, R. Gagliard, C. F. B. Haddad, P. J. R. Kok, D. B. Means, B. P. Noonan, W. E. Schargel, and W. C. Wheeler. (2006). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299: 1-261.
- Guida, G., P. Zanna, A. Gallone, E. Argenzio, and R. Cicero. (2004). Melanogenic Response of the Kupffer Cells of *Rana esculenta* L. to Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Research*, 17: 128-134.
- Johnson, J. C., T. Schwiesow, A. K. Ekwall, and J. L. Christiansen. (1999). Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. *Pigment Cell Research*, 12(6): 376-382.
- Klaus, S. N. (2006). A history of the science of pigmentation; pp 5-10. In: Nordlund, J. J., R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King, W. S. Oetting, and J. P. Ortonne (Eds.), *The Pigmentary System*. 2nd Edition. Blackwell Publishing, New York.

- Loumbourdis, N. S., and A. K. Vogiatzis. (2002). Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 52-58.
- Macieira, O. J. D., and E. A. Proni. (2004). Capacity de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae) durante os períodos de verão e inverno. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21(4): 893-896.
- Manera, M., R. Serra, G. Isani, and E. Capené. (2000). Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. *Journal of Fish Biology*, 57: 457-465.
- Meyer zum Gottesberge, A. M. (1988). Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. *Pigment Cell Research*, 1: 238-249.
- Micale, V., and F. Perdichizzi. (1990). A quantitative and histochemical study on melanomacrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. *Journal of Fish Biology*, 37(2): 191-197.
- Oliveira, C., C. Zanetoni, and R. Zieri. (2002). Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia*, 20(3): 263-268.
- Oliveira, C., A. C. Sant'anna, P. M. Omena, L. R. S. Santos, and R. Zieri. (2003). Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. *Biociências*, 11(1): 39-46.
- Oliveira, C., and R. Zieri. (2005). Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2): 454-460.
- Prelovsek, P. M., and B. Bulog. (2003). Biogenesis of Melanosomes in Kupffer Cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *Pigment Cell Research*, 16: 345-350.

- Rodionov, V. I., A. J. Hope, T. M. Svitkina, and G. G. Borisy. (1998). Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Current Biology*, 8(3): 165-168.
- Rogers, S. L., and V. I. Gelfand. (1998). Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Current Biology*, 8(3): 161-164.
- Rund, C. R., J. L. Christiansen, and J. C. Johnson. (1998). In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Research*, 11(2): 114-119.
- Santos, L. R. S., and C. Oliveira. (2007). Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(26): 64-70
- Sichel, G., M. Scalia, F. Mondio, and C. Corsaro. (1997). The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Research*, 10: 271-287.
- Sichel, G., M. Scalia, and C. Corsaro. (2002). Amphibia Kupffer cells. *Microscopy Research and Technique*, 57: 477-490.
- Sugimoto, M. (2002). Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology. *Microscopy Research Technique*, 58: 496-503.
- Wang, S. M., J. S. Chen, T. H. Fong, S. Y. Hsu, and S. S. Lim. (1997). Characterization of novel filament system in goldfish xanthophores. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 36(3): 216-227.
- Wästerström, S. A. (1984). Accumulations of drugs on inner ear melanin. *Scandinavian Audiology Supplementum*, 23: 1-40.

- Williams, G. M., and M. J. Iatropoulos. (2002) Alterations of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30: 41-53.
- Zieri, R., S. R. Taboga, and C. Oliveira. (2007). Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): histological, stereological and ultrastructural aspects. *The Anatomical Record*, 290: 795-800.
- Zuasti, A., C. Ferrer, P. Aroca, and F. Solano. (1990). Distribution of Extracutaneous Melanin Pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus* and *Dicertranchus labrax* (Pisces, Teleostei). *Pigment Cell Research*, 3: 126-131.
- Zuasti, A., C. Jiménez-Cervantes, J. C. Garcia-Berron, and C. Ferrer. (1998). The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology*, 61: 305-316.

## **CAPÍTULO 2**

### **Relação entre pigmentação visceral e fotoperíodo em anuros neotropicais**

# **RELAÇÃO ENTRE PIGMENTAÇÃO VISCERAL E FOTOPERÍODO EM ANUROS NEOTROPICAIS**

Rafaela Maria Moresco e Classius de Oliveira

**Este artigo será submetido à Journal of Anatomy**

Palavras chave: Fotoperiodismo, anfíbios, cromatóforos, sistema pigmentar extracutâneo

## Resumo

O sistema pigmentar extracutâneo está presente em diversos órgãos internos de animais ectotérmicos sendo formado por células pigmentadas, os cromatóforos. Não há respostas para as possíveis funções desse sistema, bem como não são conhecidas as relações com os fatores que alterariam sua ocorrência. Esta pesquisa verificou se o sistema pigmentar extracutâneo de três espécies de anuros neotropicais (*Rhinella schneideri*, *Physalaemus cuvieri* e *Dendropsophus nanus*) manifesta alterações devido a variações de fotoperíodo. As variáveis foram de fotoperíodo curto (4 horas claro, 20 horas escuro) e fotoperíodo longo (20 horas claro, 4 horas escuro). Os animais submetidos ao tratamento foram divididos em dois grupos: o primeiro permaneceu três dias sob o tratamento, o segundo grupo permaneceu durante seis dias. Para fazer a avaliação das possíveis modificações no sistema pigmentar extracutâneo foram comparados os animais do grupo controle com os animais tratados utilizando um protocolo de qualificação em nível anatômico, baseado na intensidade de pigmentação seguindo uma escala de 4 categorias sendo a categoria 0 referente à órgãos sem nenhum pigmento e a categoria 3 órgãos intensamente pigmentados, com 2 estágios intermediários progressivamente mais pigmentados. Após os tratamentos foi possível determinar um padrão de pigmentação espécie-específico para alguns órgãos. Esse padrão se repetiu muitas vezes inclusive nos animais tratados, provando assim, que nos parâmetros avaliados a pigmentação visceral não sofre alterações. Outra característica observada foi a presença de diferentes padrões de pigmentação para determinados órgãos dentro da mesma espécie, variação intra-específica. Essa variação nos levou a questionar se esse sistema pigmentar é uma característica taxonômica que apresenta um padrão dentro das espécies com diferenças inter-individuais ou se ela sofre alterações, por inúmeros fatores, ao longo do ciclo de vida do animal.

## Introdução

Animais ectotérmicos apresentam células pigmentadas, os cromatóforos, não somente na derme e epiderme, mas também em diversos órgãos internos constituindo o sistema pigmentar extracutâneo. Este sistema pode ser encontrado nos rins, baço, testículos, fígado, porções do intestino, encéfalo, ouvido, peritônio e ainda em volta de vasos sanguíneos e nervos (Benedito *et al.*, 1997; Prelovsek e Bulog, 2003; Santos e Oliveira, 2007; Zieri *et al.*, 2007; Franco-Belussi *et al.*, 2009).

O sistema pigmentar extracutâneo foi pouco estudado, assim não há respostas para suas possíveis funções, bem como não são conhecidas as relações com os fatores que alterariam sua ocorrência. Por outro aspecto esse sistema pode ser uma característica taxonômica conservada (Christiansen *et al.*, 1996; Sichel *et al.*, 1997; Akulenko, 1998; Rund *et al.*, 1998; Zuasti *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira e Zieri, 2005; Zieri *et al.*, 2007).

Em anfíbios, assim como nos outros animais, muitos dos eventos que acontecem durante suas vidas, acarretando mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, são controlados por variáveis abióticas (temperatura, fotoperíodo, umidade relativa) e variáveis bióticas (competição intra e inter-específica, predação) as quais podem interagir de maneiras complexas e influenciar, por exemplo, o crescimento e o desenvolvimento do girino (Duellman e Trueb, 1994) e até mesmo sua morfologia e coloração (McCollum e Leimberger, 1997).

Supõe-se que o sistema pigmentar também poderia ser alterado em função de estímulos ambientais ou alterações endógenas. Existem duas mudanças de cor que podem ocorrer nos animais em resposta à estímulos: mudança morfológica é aquela que ocorre de forma gradativa e seu resultado permanece por mais tempo, e a mudança fisiológica é

aquela que altera rapidamente a coloração do animal devido à migração bidirecional dos pigmentos dentro dos cromatóforos. Os estímulos ambientais que provocam essas mudanças estão associados principalmente a mudanças na intensidade luminosa, cor do ambiente ou alteração no contexto social (Bagnara e Hadley 1973; Sugimoto, 2002).

As mudanças de cor morfológica ocorrem devido a processos celulares de apoptose e/ou proliferação, discutidos em trabalhos com peixes expostos a fundo branco ou preto durante um longo período (Odiorne, 1933; Sugimoto, 2002). As células pigmentares na pele animal apresentam funções distintas, tais como regulação do calor, proteção contra raios prejudiciais e excreção de determinados produtos metabólicos. Entretanto, a coloração para proteção e comunicação parece ser a função mais importante dos cromatóforos na pele de teleóteos (Sugimoto *et al.*, 2005).

Já as discussões sobre o sistema pigmentar extracutâneo são escassas uma vez que se restringem a descrições da sua distribuição em alguns órgãos. Em estudos com algumas espécies de anuros foi constatada uma íntima relação dos melanócitos com as gônadas masculinas e sua vascularização (Aoki *et al.*, 1969; Gollmann *et al.*, 1993; Zuasti *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira e Zieri, 2005; Franco-Belussi *et al.*, 2009). Essas células são constituintes do próprio tecido conjuntivo do órgão ou de tecidos associados ao mesmo, como túnicas adventícias ou membranas serosas. Em muitos locais as células pigmentadas apresentam aspecto dendrítico com muitos prolongamentos citoplasmáticos repletos de pigmentos. Quando há deslocamento dos pigmentos para o centro da célula esta apresenta-se com aspecto puntiforme e centro mais escuro (Wang *et al.*, 1997; Rodionov *et al.*, 1998; Rogers e Gelfand, 1998; Oliveira e Zieri, 2005). Essas características morfológicas são semelhantes às apresentadas pelos melanócitos da cútis, porém não existem estudos que evidenciem semelhanças funcionais nem se este sistema está condicionado aos mesmos mecanismos que desencadeiam as mudanças de cor morfológica

da cútis (Meyer zum Gottesberge, 1988).

Os melanomacrófagos também fazem parte do sistema pigmentar extracutâneo e estão localizados no fígado e baço sendo chamados de células de Kupffer. Apresentam característica fagocitária com enzimas capazes de realizar atividades de peroxidase e lipase (Corsaro *et al.*, 2000; Gallone *et al.*, 2002; Sichel *et al.*, 2002). Podem apresentar diferentes quantidades de conteúdo melânico como caracterizado no experimento com os anfíbios: *Rana esculenta*, *Triturus a. apuanus* e *Triturus carnifex* nos quais foi constatado um aumento no conteúdo de pigmentos nos macrófagos do parênquima hepático durante o período de estivação, época caracterizada por baixa atividade metabólica e pouca oferta de alimento (Barni *et al.*, 1999, 2002).

Baseando-se no limitado conhecimento relativo aos aspectos morfofisiológicos da pigmentação é que este trabalho foi desenvolvido com o propósito de verificar se o sistema pigmentar extracutâneo de três espécies de anuros neotropicais manifesta alterações devido a variações de fotoperíodo.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado com três espécies de anuros da região de São José do Rio Preto – SP (20° 47' 07,05" S 49° 21' 42,09" O): *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus nanus* e *Rhinella schneideri*. A escolha das espécies foi baseada em espécies numerosas e que ocupem nichos diferentes dentro do mesmo habitat (18573-1 – Licença permanente do IBAMA/MMA para coleta de material zoológico). Os exemplares foram coletados no período de reprodução (meses chuvosos).

Foram coletados nove exemplares de cada espécie que passavam quatro dias de aclimação em terrários individuais, os quais tinham uma porção com terra e outra com água. Durante todo o período de experimento os animais não foram alimentados buscando evitar uma possível alteração da pigmentação em decorrência da alteração da dieta. Após o período de aclimação, três destes exemplares foram anestesiados e levados a óbito, por submersão em álcool etanol 20%, seguindo o Guia para o Cuidado e o Uso dos Animais de Laboratório – Unesp (Protocolo 001/06 – CEEA). Os animais tiveram expostos os órgãos para a análise em estereomicroscópio (Leica – MZ16) acoplado a um sistema de captura de imagens. Essa observação teve como objetivo identificar os órgãos que possuíam pigmentação, bem como seu padrão de intensidade e distribuição, que seguiu uma escala de 4 categorias sendo que a categoria 0 refere-se a órgãos sem nenhum pigmento e a categoria 3 órgãos intensamente pigmentados, com dois estágios intermediários progressivamente mais pigmentados. A metodologia para análise anatômica descritiva está detalhada no estudo de Franco-Belussi *et al.* (2009). Os órgãos observados foram: coração, vasos da base e pericárdio, pulmão, baço, fígado, estômago, intestino e mesentério, reto, peritônio, testículos, rins e veias renais, coluna e plexo nervoso.

Os outros seis exemplares de cada espécie foram submetidos à variável experimental de fotoperíodo curto em uma estufa B.O.D. Nesse período passaram três dias sob fotoperíodo de 4 horas claro e 20 horas escuro. Após esse período três animais de cada espécie foram sacrificados e analisados em lupa. Decorridos mais três dias os demais animais foram encaminhados à mesma análise.

Para o segundo experimento foram realizados os mesmo procedimentos, porém os animais coletados ficaram na B.O.D. sob fotoperíodo longo de 20 horas claro e 4 horas escuro. Após três dias foram analisados três animais de cada espécie sendo que os demais foram analisados após seis dias de tratamento.

Para termos uma maior amostragem do padrão de pigmentação visceral existente nas espécies os dados encontrados no grupo controle do experimento de fotoperíodo curto foram unidos aos dados do grupo controle de fotoperíodo longo, totalizando seis animais controle de cada espécie nos dois experimentos. Isto não representa um problema uma vez que os espécimes foram coletados no mesmo período e local.

## Resultados

### Fotoperíodo Curto

#### *-Physalaemus cuvieri*

Em *P. cuvieri* 85% dos espécimes do grupo controle não apresentavam pigmentação no coração (categoria 0) o restante apresentou pouca pigmentação (categoria 1); nos vasos da base 85% apresentavam pigmentação moderada (categoria 2) e o restante pouca pigmentação (categoria 1), no pericárdio dessa espécie 50% dos animais apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) e outros 50% apresentaram pigmentação moderada (categoria 2). Após o tratamento de três dias 70% dos indivíduos apresentaram pouca pigmentação no coração (categoria 1) e esse resultado manteve-se após o tratamento de seis dias em 100% dos animais. No pericárdio houve a presença de pigmentação intensa (categoria 2) após três dias de tratamento em 30% dos espécimes. Os outros animais não apresentaram pigmentação (categoria 0), essa ausência de pigmentação foi observada também em 100% dos indivíduos que permaneceram seis dias sob fotoperíodo curto. Nos vasos da base 70% dos espécimes apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) os demais apresentaram pigmentação intensa (categoria 2) esses resultados foram observados tanto no tratamento de três dias como no tratamento de seis dias (Figura 1A). Em 85% dos animais do grupo controle os pulmões não possuíam pigmentação (categoria 0) os outros animais apresentavam pouca pigmentação (categoria 1), já no tratamento de três dias 70% dos indivíduos apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) e essa esteve presente também em 100% dos indivíduos do tratamento de seis dias (Figura 1A). No intestino dos animais do grupo controle o padrão mais expressivo foi a ausência de pigmentação (categoria 0) em 85% dos espécimes, após o tratamento de três dias 70% apresentaram esse padrão que também foi observado em 100% dos espécimes tratados durante seis dias. O

reto de 85% dos indivíduos do grupo controle apresentou pouca pigmentação (categoria 1) e após o tratamento de 3 e seis dias essa mesma intensidade esteve presente em 70% e 100% dos indivíduos respectivamente. O mesentério também apresentou pouca pigmentação (categoria 1) em 65% dos animais do grupo controle e após o tratamento de três dias 100% dos indivíduos apresentou essa intensidade de pigmentação, resultado observado também em 70% dos espécimes tratados durante seis dias. O estômago de 50% dos animais do grupo controle apresentou pouca pigmentação (categoria 1) os outros 50% não apresentavam pigmentação (categoria 0) e 70% dos animais tratados durante três dias apresentaram pigmentação (categoria 1), categoria observada em 100% dos espécimes tratados durante seis dias (Figura 1D). Os testículos de *P. cuvieri* apresentaram-se intensamente pigmentados (categoria 3), e não houve alteração na intensidade de pigmentação durante os tratamentos. Também não ocorreu alteração ao longo do tratamento nos rins classificados na categoria 1, e as veias renais apresentaram intensidade de pigmentação moderada em 100% dos animais controle, 30% dos animais tratados durante três dias e 100% dos animais tratados durante seis dias (Figura 1C). No plexo nervoso de 100% dos indivíduos do grupo controle apresentaram pigmentação moderada (categoria 2) padrão observado em 70% dos espécimes do tratamento de três dias e 100% dos espécimes tratados durante seis dias. Já a coluna apresentou pouca pigmentação (categoria 1) em 85% dos animais do grupo controle e após os tratamentos de três dias 100% dos animais apresentavam pigmentação moderada (categoria 2) presente também em 70% dos animais tratados durante seis dias (Figura 1B). No peritônio 100% dos espécimes apresentaram pigmentação moderada (categoria 2) em todos os grupos observados (Figura 1C). Em 50% dos espécimes controle foi observada pouca pigmentação no fígado (categoria 1), porém 100% dos espécimes expostos ao tratamento de três dias apresentaram pigmentação moderada (categoria 2) que foi representada apenas em 30% dos animais

tratados durante seis dias, já que 70% apresentou pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 1B). No baço 50% dos animais do grupo controle apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) outros 50% apresentaram pigmentação mais intensa (categoria 2) que se manteve em 70% dos animais tratados durante 3 dias e 70% dos animais tratados durante seis dias (Figura 1B).

#### *-Rhinella schneideri*

Em *R. schneideri* durante o tratamento de fotoperíodo curto não houve alterações tanto com três dias de exposição quanto com seis dias no coração, pericárdio e vasos da base quando comparados animais tratados com animais do grupo controle sendo o padrão apresentado de pericárdio com pouca pigmentação (categoria 1), coração e vasos da base sem pigmentação (categoria 0) (Figura 2A). Nos pulmões também não houve alterações e todos os indivíduos, tanto os do grupo controle quanto os tratados não apresentaram pigmentação (categoria 0) (Figura 2A), assim como no. órgãos relacionados com a digestão (estômago, intestino e mesentério) nenhuma mudança na intensidade de pigmentação pode ser observada (Figura 2D). No reto de 85% dos espécimes do grupo controle houve ausência de pigmentação (categoria 0), esse padrão esteve presente em 100% dos indivíduos tratados durante três dias e em 70% dos indivíduos tratados durante seis dias (Figura 2D). Em 65% dos animais do grupo controle os testículos apresentaram-se com pouca pigmentação (categoria 1), nos animais tratados durante três dias apenas 30% apresentaram pigmentação no órgão, porém 100% dos animais tratados durante seis dias apresentaram regiões do testículo com manchas formadas pela aglomeração de pigmentos (categoria 1) (Figura 2C). Nos rins e veias renais não houve alteração na intensidade de pigmentação e a espécie apresentou o mesmo padrão, categoria 0, tanto nos animais do grupo controle como nos animais tratados (Figura 2C). Também não houve alterações na coluna e plexo nervoso (Figura 2B) que apresentaram pouca pigmentação (categoria 1)

assim como no peritônio (Figura 2C). Em 65% dos animais do grupo controle foi observada a presença de pouca pigmentação no fígado (categoria 1), sendo que este padrão esteve presente também em 100% dos animais tratados durante três dias e 70% dos animais tratados durante seis dias (Figura 2B). No baço dessa espécie, 50% dos animais do grupo controle não apresentavam pigmentação (categoria 0) os demais possuíam pouca pigmentação (categoria 1). Após o tratamento de três dias em 100% animais não apresentavam pigmentação no baço, porém, após o tratamento de seis dias 70% apresentava pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 2B).

#### *-Dendropsophus nanus*

Em *D. nanus* o pericárdio não apresentou pigmentação (categoria 0) tanto nos espécimes do grupo controle quanto nos tratados durante 3 e seis dias. Os vasos de base de 65% dos animais controle apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) e após três dias de tratamento 100% dos indivíduos apresentavam essa intensidade de pigmentação porém, após seis dias de tratamento 30% dos espécimes não apresentaram pigmentação os demais continuaram apresentando pouca pigmentação (categoria 1). O coração de 85% dos indivíduos apresentou pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 4a) e essa intensidade esteve presente em 100% dos espécimes nos tratamentos de 3 e seis dias (Figura 3A). Em 85% dos indivíduos do grupo controle houve pouca pigmentação nos pulmões (categoria 1) os outros animais não apresentavam pigmentação (categoria 0), com o tratamento de três dias 70% dos indivíduos tinham pigmentação no pulmão os demais não apresentavam pigmentação (categoria 0) e com o tratamento de seis dias apenas 30% dos espécimes apresentaram pigmentação (categoria 1) o restante não apresentou (categoria 0) (Figura 3A). Dos animais do grupo controle 100% não apresentaram pigmentação no mesentério e, após o tratamento de três dias, 70% dos indivíduos apresentavam ausência total de pigmentação e 30% mostravam pouca pigmentação (categoria 1) porém, com seis dias de

tratamento 70% dos indivíduos já apresentavam pouca pigmentação e 30% ausência (Figura 3D). Os outros órgãos do sistema digestório não apresentaram pigmentação tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais tratados (categoria 0) (Figura 3D e 4f). Nos testículos não houve nenhuma célula pigmentada (categoria 0) (Figura 4b), sendo esse padrão encontrado nos animais do grupo controle e mantendo-se nos animais tratados (Figura 3C). Os rins de 85% dos animais controle não apresentavam pigmentação, assim como 70% dos animais tratados durante três dias e 100% dos animais tratados durante seis dias. Nas veias renais os animais controle apresentaram um padrão de pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 4c) em 100% dos espécimes porém, após três dias de tratamento 30% dos indivíduos apresentavam uma pigmentação mais intensa (categoria 2) representada por 70% dos indivíduos observados no tratamento de seis dias (Figura 3C). No plexo nervoso não ocorreu pigmentação (categoria 0) mas na coluna ela esteve presente com pouca intensidade (categoria 1) (Figura 3B e 4d). Não foi verificada a presença de melanócitos (categoria 0) no peritônio (Figura 3C). No fígado 50% dos animais controle apresentaram pigmentação na categoria 2 e 50% na categoria 3, após três dias de tratamento 100% dos indivíduos apresentou pouca pigmentação (categoria 1), já no tratamento de seis dias 100% dos animais apresentaram pigmentação moderada (categoria 2). No baço a maioria dos indivíduos houve pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 3B e 4e).

### **Fotoperíodo Longo**

#### ***-Physalaemus cuvieri***

Em *P. cuvieri* 50% dos animais controle apresentaram pouca pigmentação no pericárdio (categoria 1) os outros 50% apresentaram uma pigmentação mais intensa (categoria 2), após o tratamento de três dias 70% dos espécimes não apresentavam pigmentação no pericárdio (categoria 0), porém esse padrão foi alterado após o tratamento

de seis dias onde 100% dos espécimes apresentavam pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 5A). Nos vasos da base a maioria dos animais apresentaram pigmentação moderada (categoria 2) representada por 85% dos animais do grupo controle, 100% dos animais tratados durante três dias e 70% dos animais tratados durante seis dias (Figura 5A). Essas mesmas porcentagens foram encontradas para a pigmentação do coração, porém nesse órgão o padrão foi ausência de pigmentos (categoria 0) (Figura 5A). Nos pulmões não foi observado pigmentação na maioria dos espécimes avaliados, representados por 85% dos animais do grupo controle, 70% dos animais tratados durante três dias e 100% dos tratados durante seis dias (Figura 5A). No estômago de 50% dos animais controle foi observada pouca pigmentação (categoria 1) o restante não apresentou pigmentação (categoria 0) assim como 100% dos animais tratados durante três dias, porém, no tratamento durante seis dias 100% dos animais apresentou pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 5D). No intestino da maioria dos animais do grupo controle e dos animais tratados durante três dias não houve presença de pigmentos (categoria 0) porém, após seis dias de tratamento 70% dos indivíduos apresentavam pigmentação moderada nesse órgão (categoria 2) (Figura 5D). No reto da maioria dos animais o padrão de pigmentação presente foi categoria 1 (Figura 6a), assim como no mesentério dos animais do grupo controle e tratados durante três dias porém, os animais tratados durante seis dias apresentaram mesentério mais pigmentado (categoria 2) (Figura 5D). Os testículos de *P. cuvieri* apresentaram-se completamente pigmentados (categoria 3) e, assim como nos animais do experimento de fotoperíodo curto, essa pigmentação não sofreu alterações (Figura 5C e 6c). Nos rins 100% dos animais apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) nas veias renais a pigmentação foi mais intensa (categoria 2) (Figura 5C e 6f). No plexo nervoso e coluna (Figura 5B e 6e) não houve mudanças expressivas quando comparados os animais do grupo controle com os animais tratados durante 3 e seis dias assim como no

peritônio (Figura 5C e 6b) e baço (Figura 5B e 6d). Dos espécimes do grupo controle e tratamento de três dias a maioria apresentaram pouca pigmentação no fígado (categoria 1) porém, nos animais tratados durante seis dias 70% apresentou pigmentação intensa (categoria 3) (Figura 5B).

#### *-Rhinella schneideri*

Nessa espécie não houve alteração da pigmentação do coração, pericárdio e vasos da base, que mostraram-se igual ao experimento com fotoperíodo curto (Figura 7A e 8c). Nos pulmões não foi observada a presença de pigmentos (categoria 0) tanto nos animais controle quanto nos animais tratados (Figura 7A e 8a). Para os órgãos do sistema digestório (Figura 8e,f) não houve mudanças evidentes quando comparados os animais do grupo controle ao grupo tratado durante 3 e seis dias (Figura 7D). O padrão existente nos testículos foi igual ao observado no experimento de fotoperíodo curto, onde a maioria dos espécimes apresentaram intensidade de pigmentação baixa (categoria 1) (Figura 7C). Os rins e veias renais de *R. schneideri* não possuíam pigmentação (categoria 0) (Figura 7C e 8b). No plexo nervoso e coluna (Figura 8d) não houve mudanças expressivas quando comparados os animais do grupo controle com os animais tratados durante 3 e seis dias, já no peritônio os animais do grupos controle e tratamento de três dias apresentaram pouca pigmentação nesse órgão (categoria 1) e os animais tratados durante seis dias apresentaram uma intensidade de pigmentação maior (categoria 2) (Figura 7B). A maioria dos animais não apresentou pigmentação no baço (categoria 0) e pouca pigmentação no fígado (categoria 1) (Figura 7B).

#### *-Dendropsophus nanus*

Nessa espécie foi observado o mesmo padrão de pigmentação do pericárdio e coração que no experimento de fotoperíodo curto, apenas os vasos da base estiveram diferentes, onde 65% dos animais controle apresentavam pouca pigmentação (categoria 1)

e após o tratamento de três dias 70% dos animais apresentavam o padrão de ausência de pigmentação (categoria 0) e no tratamento de seis dias 70% dos animais apresentavam pouca pigmentação (categoria 1) (Figura 9A). Nos pulmões 85% dos animais do grupo controle apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) assim como 70% dos animais tratados durante três dias e seis dias (Figura 9A). Nos órgãos do sistema digestório (estômago, intestino, mesentério e reto) a espécie não apresentou pigmentação alguma, tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais tratados (Figura 9D). Esse mesmo padrão foi observado nos testículos e rins que não apresentaram pigmentação (categoria 0), já as veias renais possuíam pouca pigmentação (categoria 1) não havendo alteração após os experimentos de 3 e seis dias (Figura 9C). No plexo nervoso e coluna não houve mudanças expressivas quando comparados os animais do grupo controle com os animais tratados durante 3 e seis dias assim como no peritônio (Figura 9B). No fígado foi observada pigmentação intensa (categoria 3) em 50% dos espécimes do grupo controle e o restante apresentou pigmentação moderada (categoria 2) e, durante os tratamentos de 3 e seis dias 70% dos indivíduos apresentaram pigmentação intensa e moderada, respectivamente. No baço não houve alterações expressivas na baixa intensidade de pigmentação (categoria 1) (Figura 9B).

## Discussão

A pigmentação visceral é estudada com enfoque em vários ângulos, inclusive buscando caracterização taxonômica. Em estudos com Dendrobatidae Grant (2004) relata a presença de melanócitos nos testículos de *Colostethus panamensis* com diferente pigmentação entre os antímeros. Já em Leiuperidae vários estudos mostram que um grande número de células pigmentadas estão presentes na cápsula e no interstício testicular, conferindo uma tonalidade marrom escura às gônadas, visto em *Physalaemus cuvieri* (Oliveira *et al.*, 2002), *Physalaemus fuscomaculatus* (Aoki, 1969; Zieri, 2004), *Eupemphix nattereri* (Oliveira e Zieri, 2005; Zieri *et al.*, 2007), *Physalaemus olfersii* e *Pseudopaludicola falcipes* (Oliveira, 1996). Em *Physalaemus marmoratus* também há diferente pigmentação entre os antímeros (Franco-Belluci *et al.*, 2009), como relatado por Grant (2004) nos Dendrobatidae da espécie *Colostethus panamensis*.

Nesse estudo determinou-se um padrão de pigmentação extracutânea para os animais que não haviam passado pelos experimentos de fotoperíodo curto ou longo, ou seja, o grupo controle. Mesmo assim, foi possível observar algumas diferenças dentro das mesmas espécies com relação a intensidade de pigmentação, porém, com relação à ausência ou presença o padrão é mais definido. Como visto em estudos com 3 espécies diferentes de peixes teleóteos onde existiu diferenças na distribuição, densidade e morfologia dos acúmulos de células pigmentares nos rins, fígado, cútis e mesentério; mesmo sendo espécies relacionadas filogeneticamente (Zuasti *et al.*, 1990). Assim, o sistema pigmentar, embora determinado geneticamente, pode ser alterado em função de uma série de estímulos ambientais ou alterações endógenas (Bagnara e Hadley, 1973; Sugimoto, 2002).

Os melanócitos do sistema pigmentar extracutâneo apresentam as mesmas características dos melanócitos observados na cútis dos animais, inclusive com a mesma origem embriológica especificamente a partir da crista neural (Klaus, 2006). Em estudos com peixes foi observada uma modificação na coloração de animais expostos a fundo preto ou branco, assim, animais exposto durante um tempo num aquário com o fundo branco passavam a apresentar uma coloração clara, devido a apoptose de células pigmentares. O processo da morte celular incluiu a perda de atividade da célula, a fragmentação da mesma, a fagocitose dos fragmentos, e o afastamento através da epiderme (Sugimoto *et al.*, 2000). Porém, animais expostos a um fundo preto passaram a apresentar coloração escura graças à proliferação de melanócitos, sendo que muitos estudos apontam para a diferenciação de precursores dessas células para que ocorra esse aumento e não divisão das células diferenciadas (Sumner, 1940; Sugimoto, 2002).

Nesse experimento não houve nenhuma modificação comum nas três espécies no mesmo órgão seguindo um padrão dentro dos experimentos. As alterações que aconteceram foram em nível de espécie, e isto pode ser interpretado pelo fato de serem espécies de famílias diferentes que ocupam nichos ecológicos diferentes dentro do mesmo habitat. E principalmente por estes animais não apresentarem o mesmo padrão de pigmentação extracutâneo. Por exemplo, *D. nanus* não possui nenhum melanócito nos testículos, *R. schneideri* apresenta pouca pigmentação e os testículos de *P. cuvieri* são intensamente pigmentados. Com padrões tão distintos deve-se supor que os órgãos, para cada espécie, respondem diferentemente, pelo menos em níveis anatômicos.

É conhecido que mecanismos neuronais e hormonais são responsáveis pelo movimento de cromatóforos nos peixes e em alguma espécie de répteis, embora cromatóforos de outros animais vertebrados ectotérmicos estejam somente sob o controle hormonal (Erickson, 1998). Assim, no experimento com diferentes cores de fundo foi

observado que em um fundo preto, o  $\alpha$ -MSH é secretado pela hipófise e causa a dispersão dos pigmentos nos cromatóforos. Ao contrário, em um fundo branco a hipófise secreta o MCH que tem efeito oposto. E, além do sistema endócrino, o sistema nervoso periférico é responsável pelas respostas rápidas dos cromatóforos em fundo branco (Fujii e Oshima, 1986; Fujii, 2000; Sugimoto, 2002). Uma mudança de cor fisiológica pode, em longo prazo, alterar a densidade de cromatóforos, passando a ser mudança de cor morfológica (Sugimoto *et al.*, 2005).

Como observado nos resultados, não houve padrão nas alterações sofridas nas células de Kupffer do fígado e baço. No experimento de fotoperíodo curto, por exemplo, a pigmentação do fígado de *R. schneideri* aumentou, em *P. cuvieri* diminuiu e em *D. nanus* permaneceu igual, comprovando que nessas condições o fotoperíodo não interferiu da mesma forma a pigmentação desse órgão.

Algumas considerações ainda precisam serem feitas, por exemplo, as células de Kupffer não eram incluídas na classificação de células pigmentares, pois pensava-se que os macrófagos presentes no fígado e baço apenas fagocitavam os melanossomos, e não os sintetizavam (Fitzpatrick *et al.*, 1965). Porém, em análises sobre a função melanogênica das células pigmentares nesses órgãos em *Xenopus laevis* (Sichel *et al.*, 1997), *Rana esculenta* (Sichel *et al.*, 1997; Gallone *et al.*, 2002) e *Proteus anguinus* (Prelovsek e Bulog, 2003) demonstraram que há melanogênese. Mas sabemos que as células de Kupffer são totalmente diferentes dos melanócitos presentes na cutis e nos demais órgãos, apresentando características próprias e outras funções. Então, será que os mesmos mecanismos que regulam as células de Kupffer regulariam os melanócitos presentes nos outros órgãos?

Em culturas de células de Kupffer expostas aos efeitos de NDP-MSH foram observados os processos que estimulam a produção de melanina por elas, e avaliado o nível de expressão do gene produtor (Guida *et al.*, 2004). Essas células, quando localizadas

no fígado, também são influenciadas pelo nível de poluição ambiental, pois é neste órgão que processos de biotransformações de agentes nocivos ao organismo ocorrem (Fenoglio *et al.*, 2005).

As células de Kupffer são responsáveis pelos processos de detoxificação que ocorrem no fígado, isto foi relatado em estudos com *Rana esculenta* coletadas em áreas com diferentes níveis de poluição. Esses animais apresentaram um aumento no número de células de Kupffer e aumento no seu conteúdo melânico em ambientes mais poluídos, causados por dois mecanismos: proliferação e hipertrofia (Fenoglio *et al.*, 2005). Mudanças similares foram observadas no fígado de *Rana ridibunda* após a exposição ao cádmio (Loumbourdis e Vogiatzis, 2002). Estes aspectos foram igualmente observados em outro estudo com as espécies *Triturus a. apuanus*, *Triturus carnifex* e *Rana esculenta* durante a fase de pré-hibernação (Barni *et al.*, 2002).

À melanina são atribuídas as propriedades de potencial redox e capacidade de transferência de elétrons, acumulação de substâncias tóxicas e íons de metal entre outros (Wästerström, 1984; Agius e Roberts, 2003). Isso justifica as diferenças encontradas em células de Kupffer que, em alguns estudos, já foram denominadas de pequenas e grandes células de Kupffer devido às diferenças nos seus índices de melanina (Corsaro *et al.*, 2000; Sichel *et al.*, 2002). O que nada mais são estágios diferentes de um processo no qual a célula passa por transformações que inclui o aumento no seu conteúdo de melanina. E como visto nos estudos anteriores a densidade de células de Kupffer e suas características em anfíbios é um elemento muito plástico cujo índice e a distribuição está sob influências de mudanças sazonais (Barni *et al.*, 1999), abastecimento de oxigênio (Frangioni *et al.*, 2000) e exposição a xenobióticos (Loumbourdis e Vogiatzis, 2002).

Com este trabalho foi possível verificar que o sistema pigmentar extracutâneo não apresenta respostas em níveis anatômicos para as mudanças de fotoperíodo pelas quais as

espécies de anuros foram expostas. Determinando padrões de intensidade de pigmentação para alguns órgãos podemos, quem sabe, utilizar essa característica como ferramenta filogenética, uma vez que esse padrão possivelmente é determinado geneticamente, pois ficou claro que em alguns órgãos as variações na intensidade de pigmentação são maiores do que em outros órgãos. Mas para tal utilização filogenética seriam necessários vários estudos que poderiam dar certeza se estas células exercem alguma função no organismo ou não e assim ver se ao longo da vida do animal esse sistema sofre alterações de forma natural ou se responde a alguma variável biótica ou abiótica para assim podermos afirmar que se trata de uma característica filogenética conservada dentro dos grupos.

## Figuras

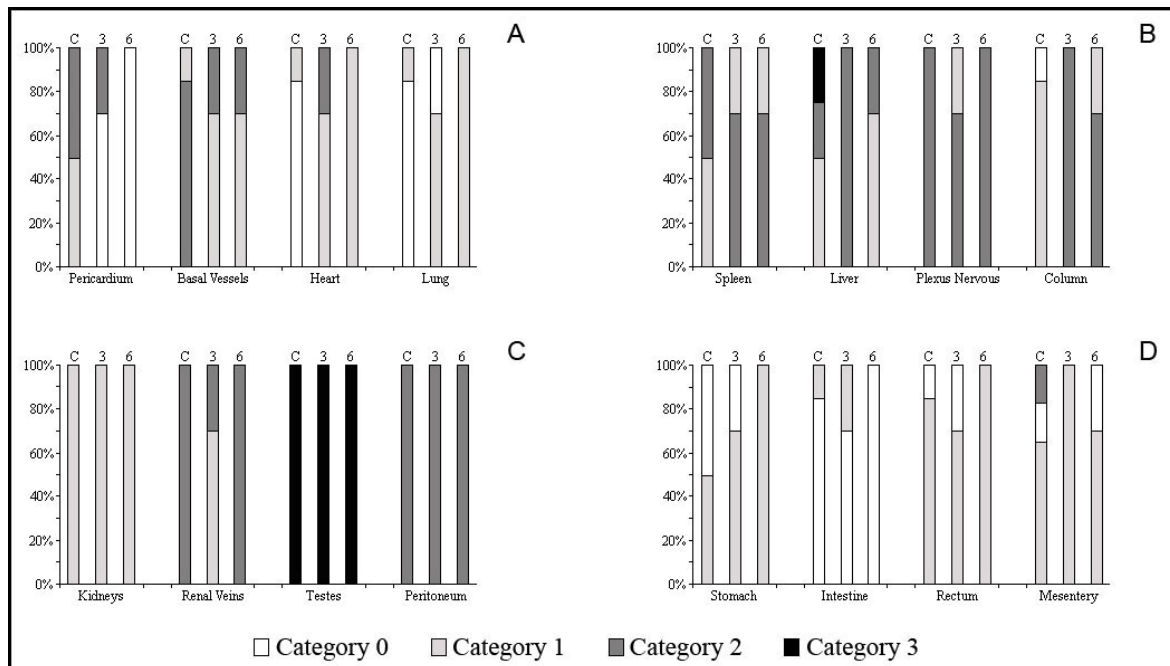


Figura 1 – Experimento de Fotoperíodo curto. Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Physalaemus cuvieri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmão; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

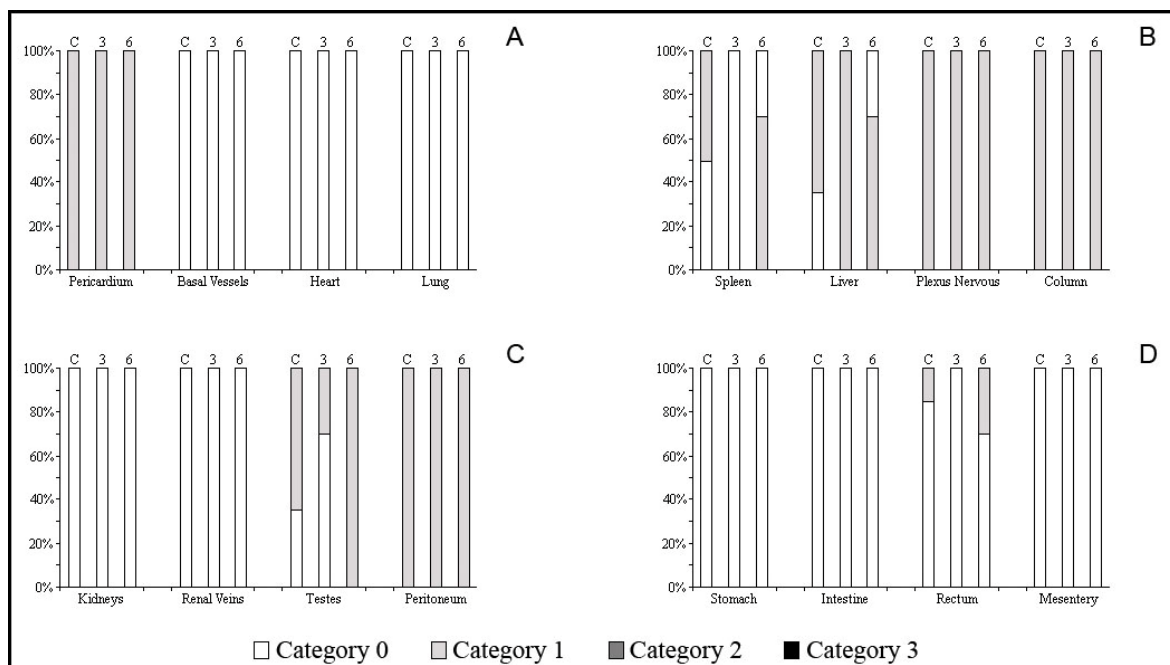


Figura 2 – Experimento de Fotoperíodo curto. Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Rhinella schneideri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmão; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

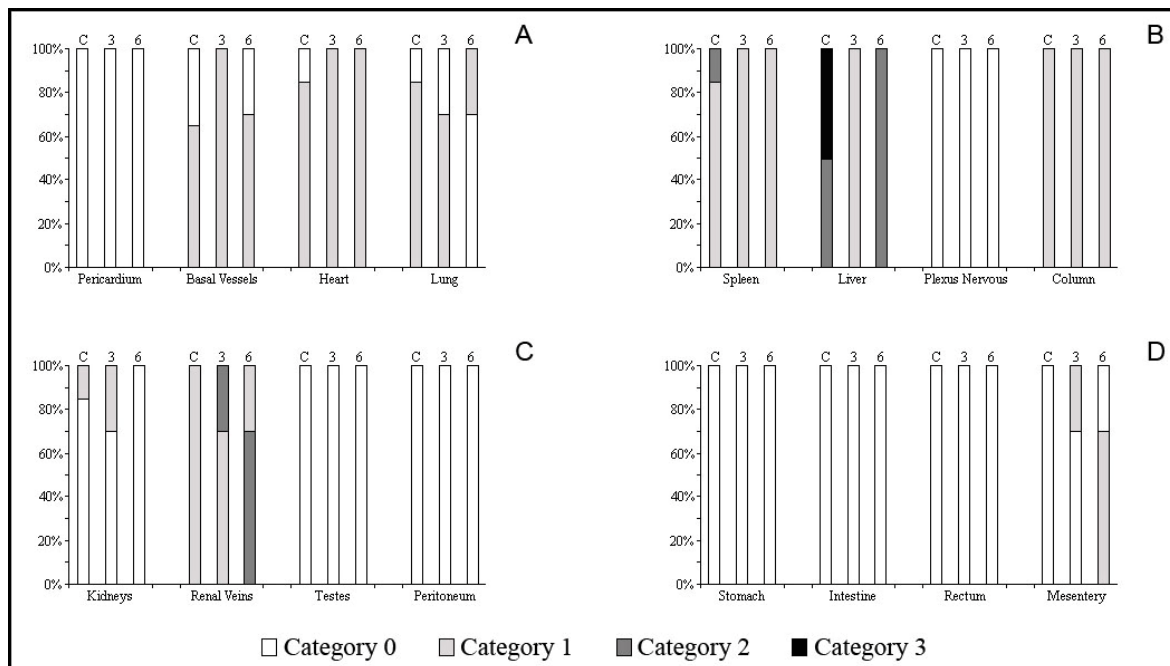


Figura 3 – Experimento de Fotoperíodo curto. Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Dendropsophus nanus* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmão; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

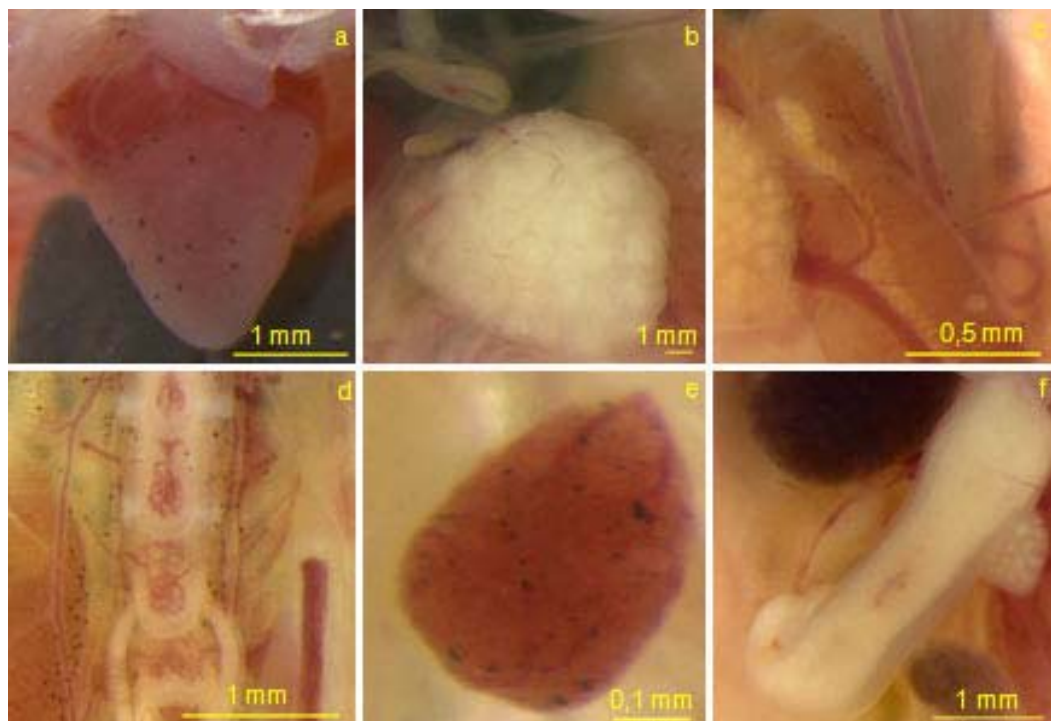


Figura 4 – Padrão de intensidade da pigmentação em órgãos de *Dendropsophus nanus*: (a) coração; (b) testículo direito; (c) rim direito; (d) coluna e plexo nervoso; (e) baço; (f) estômago.

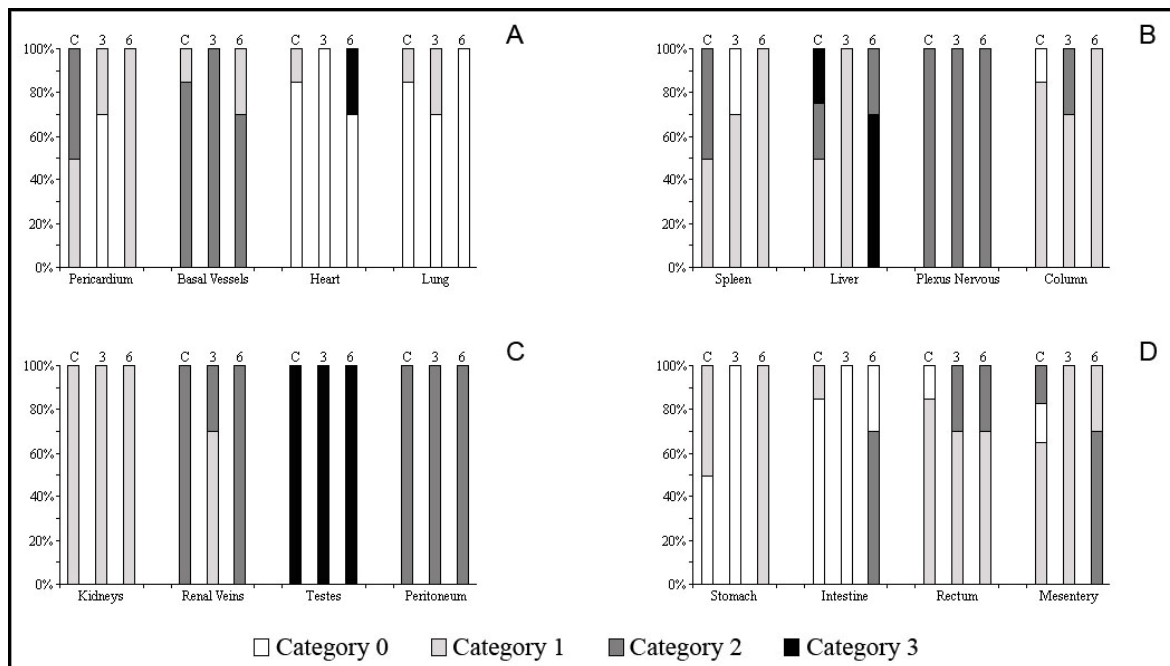


Figura 5 – Experimento de Fotoperíodo longo. Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Physalaemus cuvieri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmão; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

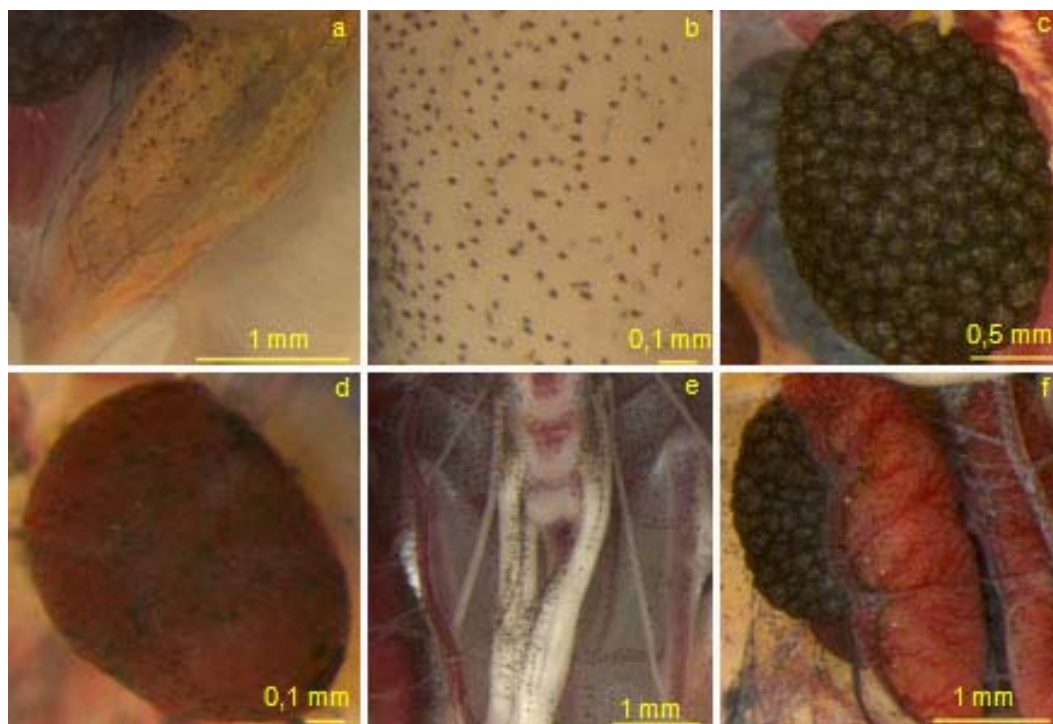


Figura 6 – Padrão de intensidade da pigmentação em órgãos de *Physalaemus cuvieri*: (a) reto; (b) peritônio; (c) testículos direito; (d) baço; (e) coluna e plexo nervoso; (f) rim direito.

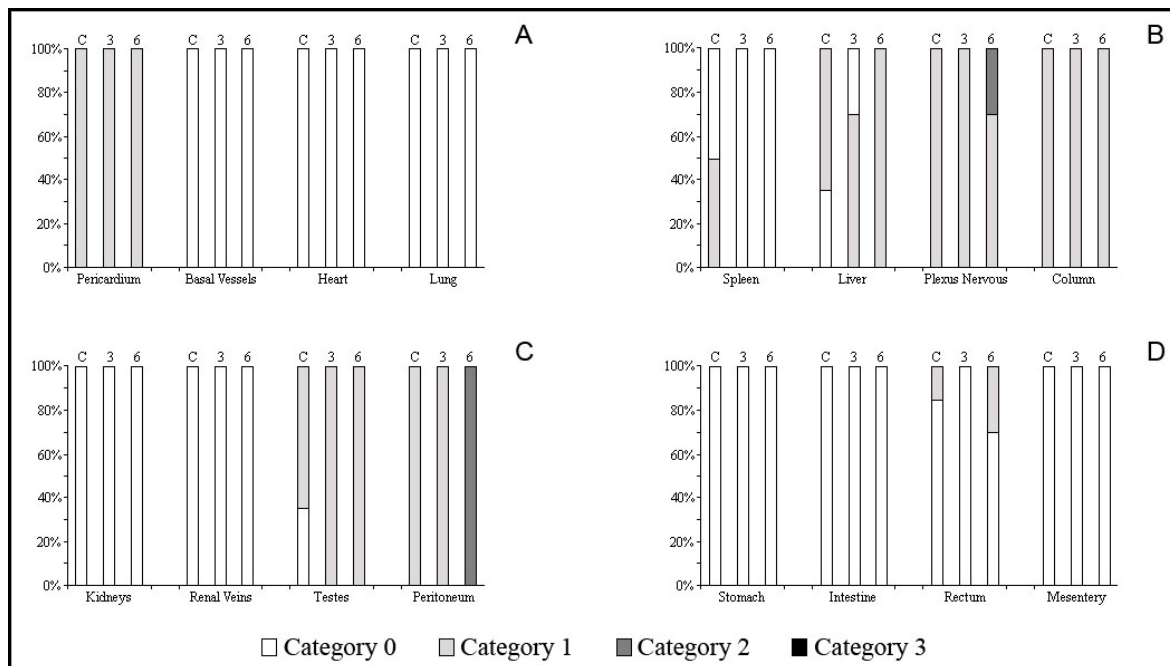


Figura 7 – Experimento de Fotoperíodo longo. Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Rhinella schneideri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmão; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

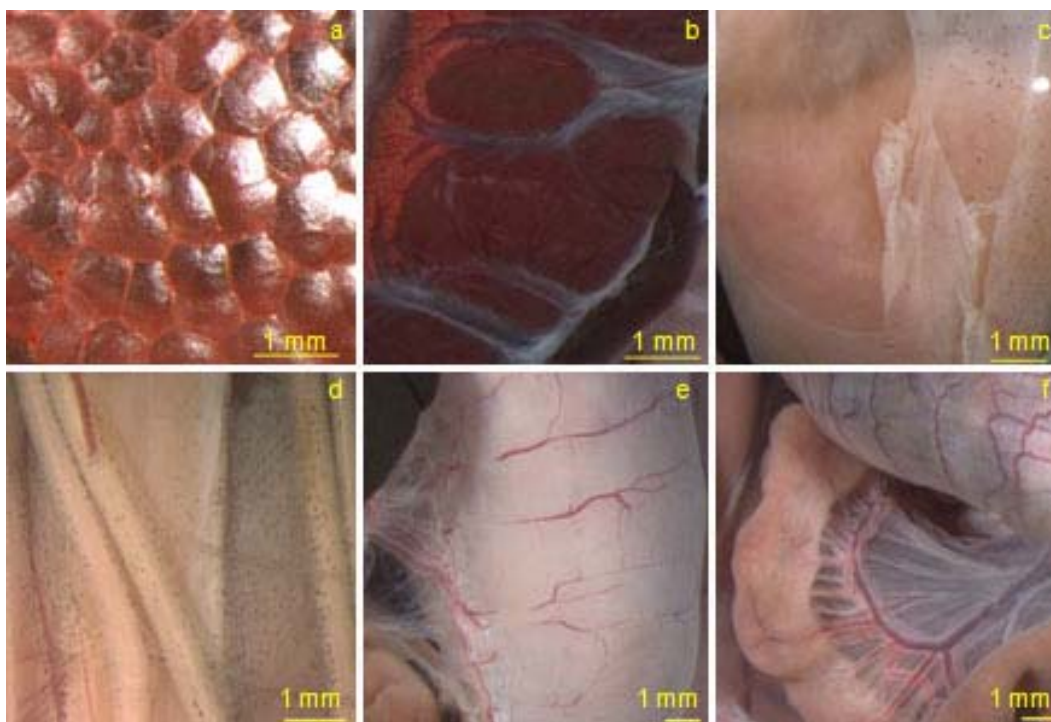


Figura 8 – Padrão de intensidade da pigmentação em órgãos de *Rhinella schneideri*: (a) pulmão; (b) rim esquerdo; (c) pericárdio; (d) coluna e plexo nervoso; (e) estômago; (f) intestino e mesentério.

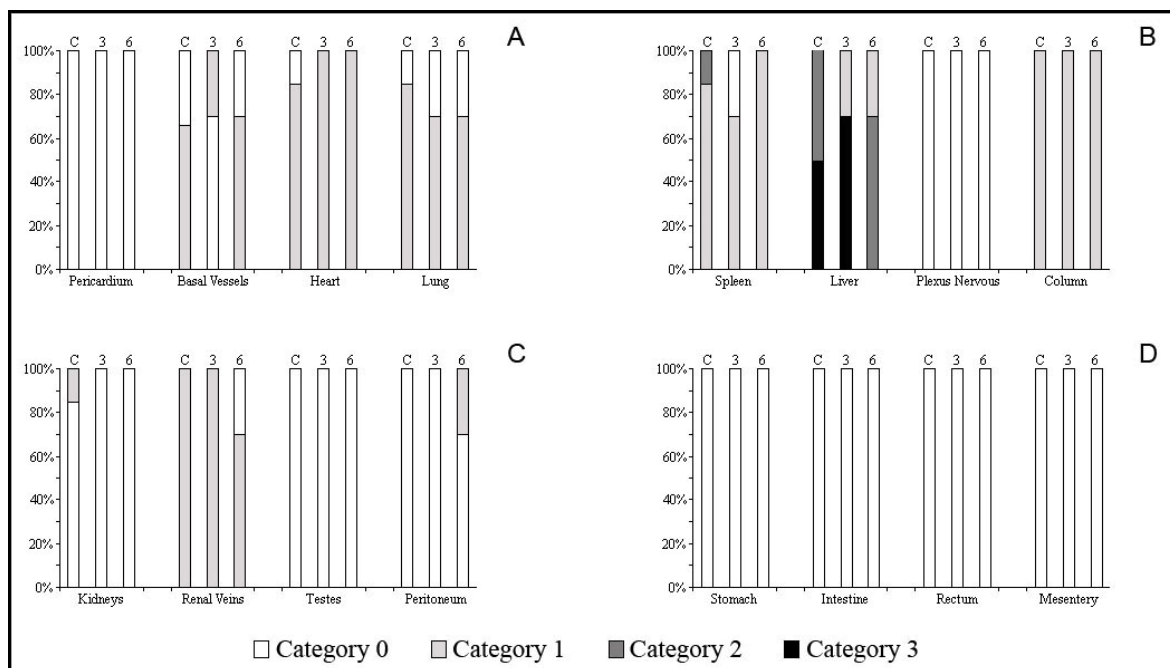


Figura 9 – Experimento de Fotoperíodo longo. Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Dendropsophus nanus* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmão; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

## Referências

- Agius, C. e Roberts, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26: 499-509.
- Akulenko, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). *Vestnik Zoologii*, 32(3): 49-53.
- Aoki, A.; Vitale-Calpe, R. e Pisano, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 98(1): 9-16.
- Bagnara, J.T. e Hadley, M.E. 1973. Chromatophores and color change, the comparative physiology of animal pigmentation. *The Quarterly Review of Biology*, 49(2): 159-160.
- Barni, S., Bertone, V., Croce, A.C., Bottiroli, G., Bernini, F. e Gerzeli, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195: 19-25.
- Barni, S., Vaccarone, R., Bertone, V., Frascini, A., Bernini, F. e Fenoglio, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta*. *Journal of Anatomy*, 200: 185-194.
- Benedito, E.; Jiménez-Cervantes, C.; Pérez, D.; Cubillana, J.D.; Solano, F.; Jiménez-Cervantes, J.; Meyer zum Gottesberge, A.M.; Lozano, J.A. e García-Borrón, J.C. 1997. Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336:59-72.
- Christiansen, J.L., Grzybowski, J.M. e Kodama, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, 9(4): 185-190.

- Corsaro, C., Scalia, M., Leotta, N., Mondio F. e Sichel, G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*, 196: 249-261.
- Duellman, W.E. e Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-Hill, 670p.
- Erickson C. A. 1998. From the Crest to the Periphery: Control of Pigment Cell Migration and Lineage Segregation. *Pigment Cell Research*, 6: 336-347.
- Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G. e Barni, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cell of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 259-268.
- Fitzpatrick, T.B.; Quevedo, W.C.Jr.; Levene, A.L.; McGorven, V.J.; Mishima, Y.; Oettle, A.G. 1965. Terminology of vertebrate melanin-containing cell. *Science*, 152: 88-89.
- 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.
- Franco-Belussi L., Zieri R., Santos, L.R.S., Moresco, R. M. e Oliveira, C. 2009. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. *The Anatomical Record*, 292: 178-182.
- Fujii R., Oshima N. 1986. Control of chromatophore movements in teleost fishes. *Zoological Science*, 3: 13-47.
- Fujii R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Research*, 13: 300-319.
- Gallone, A., Guida, G., Maida, I. e Cicero, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? *Pigment Cell Research*, 15: 32-40.

- Gollmann G., Borkin L.J., Roth P. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). *Zoologische Jahrbücher: Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*, 120: 129–136.
- Grant, T. 2004. On the identities of *Colostethus inguinalis* (Cope, 1868) and *C. panamensis* (Dunn, 1933), with comments on *C. latinasus* (Cope, 1863) (Anura: Dendrobatidae). *American Museum Novitates*, 3444: 1-24.
- Guida, G., Zanna, P., Gallone, A., Argenzio, E. e Cicero, R. 2004. Melanogenic Response of the kupffer Cells of *Rana esculenta* L. to Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Research*, 17: 128-134.
- Johnson, J.C., Schwiesow, T., Ekwall, A.K. e Christiansen, J.L. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. *Pigment Cell Research*, 12(6): 376-382.
- Klaus, S.N. 2006. *A history of the science of pigmentation*, in Nordlund, J.J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R.A.; Oetting, W.S. e Ortonne, J.P. 2006. *The Pigmentary System*. Blanckwell Publishing, 1229.
- Loumbourdis, N.S. e Vogiatzis, A.K. 2002. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 53:52-58.
- McCollum S.A e Leimberger J.D. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia*, 109: 615-621.
- Meyer zum Gottesberge, A.M. 1988. Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. *Pigment Cell Research*, 1:238-249.
- Odiorne J.M. 1933. Degeneration of melanophores in *Fundulus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 19: 329–332.

- Oliveira, C. 1996. Estudo morfológico do testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 131p.
- Oliveira, C., Zanetoni, C. e Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia*, 20(3): 263-268.
- Oliveira, C. e Zieri, R. 2005. Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2): 454-460.
- Prelovsek, P.M. e Bulog B. 2003. Biogenesis of Melanosomes in Kupffer Cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *Pigment Cell Research*, 16: 345-350.
- Rodionov, V.I.; Hope, A.J.; Svitkina, T.M. e Borisy, G.G. 1998. Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Current Biology*, 8(3): 165-168.
- Rogers, S.L. e Gelfand, V.I. 1998. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Current Biology*, 8(3): 161-164
- Rund, C.R., Christiansen, J.L. e Johnson, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Research*, 11(2): 114-119.
- Santos, L.R.S. e Oliveira, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(26): 64-70.
- Sichel, G., Scalia M., Mondio F. e Corsaro C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Research*, 10: 271-287.

- Sichel, G., Scalia, M. e Corsaro, C. 2002. Amphibia Kupffer cells. *Microscopy Research and Technique*, 57: 477-490.
- Sugimoto M., Uchida N. e Hatayama M. 2000. Apoptosis in skin pigment cells of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei), during long-term chromatic adaptation: the role of sympathetic innervation. *Cell and Tissue Research*, 301: 205–216.
- Sugimoto, M. 2002. Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology. *Microscopy Research Technique*, 58:496-503.
- Sugimoto, M., Yuki M., Miyakoshi T. e Maruko K. 2005. The influence of long-term chromatic adaptation on pigment cells and striped pigment patterns in the skin of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Zoology*, 303(A): 430–440.
- Sumner F.B. 1940. Quantitative changes in pigmentation, resulting from visual stimuli in fishes and amphibia. *Biological Reviews*, 15: 351–378.
- Wang, S.M.; Chen, J.S.; Fong, T.H.; Hsu, S.Y. e Lim, S.S. 1997. Characterization of novel filament system in goldfish xanthophores. *Cell Motil Cytoskeleton* 36(3): 216-227
- Wästerström, S.A.; 1984. Accumulations of drugs on inner ear melanin. *Scandinavian Audiology. Supplementum*, 23:1-40.
- 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., Jiménez-Cervantes, C., Garcia-Berrón, J.C. e Ferrer C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology*, 61: 305-316.
- Zuasti, A.; Ferrer, C.; Aroca, P. e Solano, F. 1990. Distribution of Extracutaneous Melanin Pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus*, and *Dicertranchus labrax* (Pisces, Teleostei). *Pigment Cell Research*, 3:126-131.

### **CAPÍTULO 3**

**A variação térmica influencia o sistema pigmentar extracutâneo de anuros?**

# **A VARIAÇÃO TÉRMICA INFLUENCIA O SISTEMA PIGMENTAR EXTRACUTÂNEO DE ANUROS?**

Rafaela Maria Moresco e Classius de Oliveira

**Este artigo será submetido à The Journal of Experimental Biology**

Palavras chave: Temperatura, anfíbios neotropicais, cromatóforos, mudança de cor morfológica

## Resumo

Este estudo objetivou caracterizar o sistema pigmentar extracutâneo de três espécies de anuros (*Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus nanus* e *Rhinella schneideri*) submetidos a variações de temperatura. O sistema pigmentar pode sofrer alterações devido a estímulos bióticos e abióticos resultando nas mudanças de cor fisiológica ou morfológica. Para avaliarmos se há influência da temperatura no sistema pigmentar extracutâneo foram feitos dois experimentos: temperatura alta (35°C) e temperatura baixa (10°C). O período de tratamento foi de três e seis dias utilizando-se para cada experimento nove animais de cada espécie, capturados na região de São José do Rio Preto – SP. Destes nove animais três faziam parte do grupo controle, três passavam pelo tratamento durante três dias e os outros três animais passavam pelo tratamento durante seis dias. Para avaliarmos as mudanças no sistema pigmentar foi comparado o padrão existente dentro da espécie com os animais tratados. Para tal utilizou-se um protocolo de qualificação baseado na intensidade de pigmentação seguindo uma escala de quatro categorias sendo a categoria 0 referente à órgãos sem nenhum pigmento e a categoria 3 órgãos intensamente pigmentados, com dois estágios intermediários progressivamente mais pigmentados. Após as comparações ficou evidente que a temperatura não induz mudanças no sistema pigmentar em aspecto anatômico, pelo menos nos parâmetros que analisamos, uma vez que não houve um padrão de mudanças no mesmo órgão nas três espécies. Observamos ainda que mesmo nos animais controle existiam pequenas variações na intensidade de pigmentação de alguns órgãos. Porém, ficou evidente que as espécies apresentavam um padrão de pigmentação espécie-específico para a maioria dos órgãos, o que nos leva acreditar se tratar de uma característica filogenética.

## Introdução

Os cromatóforos são células contendo grânulos de pigmentos que estão presentes principalmente na derme e epiderme dos animais. Essas células podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo pigmentar, sendo a mais conhecida denominada melanócito, que são células grandes e irregulares e no seu conteúdo citoplasmático é onde estão os pigmentos (melanina) armazenados em grânulos denominados melanossomos, sendo a própria célula que sintetiza esses pigmentos (Zieri *et al.*, 2007). Existem ainda células pigmentadas que apresentam atividades macrofágicas que podem ser denominadas “células pigmentadas tipo macrófago” (Micale e Perdichizzi, 1990), “melanomacrófagos” ou “macrófagos pigmentados” (Manera *et al.*, 2000). Outras células contendo pigmentos são os iridóforos, que contém purinas e cristais de pteridina e apresentam cor iridescente; xantóforo, células que contém pteridinas e carotenóides e apresentam cores do amarelo ao laranja; eritróforos, células que contém pteridinas e carotenóides e apresentam cores do laranja ao vermelho (Klaus, 2006).

Animais ectotérmicos apresentam células pigmentadas, os cromatóforos, não somente na derme e epiderme, mas também em diversos órgãos internos constituindo o sistema pigmentar extracutâneo. Este sistema pode ser encontrado nos rins, testículos, porções do intestino, encéfalo, ouvido, peritônio e ainda em volta de vasos sanguíneos e nervos (Benedito *et al.*, 1997; Prelovsek e Bulog, 2003; Santos e Oliveira, 2007; Zieri *et al.*, 2007).

Os melanomacrófagos também fazem parte do sistema pigmentar extracutâneo e estão localizados no baço e fígado onde recebem o nome de células de Kupffer. Apresentam característica fagocitária com enzimas capazes de realizar atividades de peroxidase e lipase (Corsaro *et al.*, 2000; Gallone *et al.*, 2002; Sichel *et al.*, 2002).

As células pigmentares na pele animal apresentam funções distintas, tais como regulação do calor, proteção contra raios prejudiciais e excreção de determinados produtos metabólicos finais. Entretanto, a coloração para proteção e comunicação parece ser a função mais importante dos cromatóforos na pele de teleósteos e, sabe-se que estas células podem sofrer alterações em resposta a estímulos externos ou internos (Sugimoto *et al.*, 2005).

Devido à presença de diferentes padrões de intensidade de pigmentação nos órgãos de anuros, faz-se uma hipótese de que o sistema pigmentar também poderia ser alterado em função de uma série de estímulos ambientais ou alterações endógenas. E, apesar de muitas vezes a espécie apresentar indivíduos com padrões de pigmentação semelhantes, pelo menos no que diz respeito à presença ou ausência de pigmentação, esse fato poderia ser respondido pelo fato de as espécies sempre serem coletadas em uma única época do ano, isto é, durante o período reprodutivo.

Há anos que alguns pesquisadores têm observado que o sistema pigmentar pode sofrer alterações devido a estímulos associados principalmente a mudanças na intensidade luminosa, cor do ambiente ou alteração no contexto social, isto é, presença de um predador ou alterações na taxa de machos e fêmeas da população. A mudança de cor morfológica é aquela que ocorre de forma gradativa e seu resultado permanece por mais tempo, e a mudança de cor fisiológica é aquela que altera rapidamente a coloração do animal devido à migração dos pigmentos dentro dos cromatóforos (Bagnara e Hadley 1973; Sugimoto, 2002).

Essas respostas podem ser observadas em vários níveis estruturais do organismo como em células, tecidos ou órgãos, isso dependerá do agente, grau de exposição e susceptibilidade do organismo (Williams e Iatropoulos, 2002). Em resposta aos estímulos externos foi visto que as células da epiderme de peixes expostos a fundo branco e preto,

durante um longo período, podem passar por dois processos celulares bem conhecidos, apoptose e/ou proliferação, que resultam na mudança de cor morfológica desses animais (Odiorne, 1933; Sugimoto, 2002).

Nesse sentido, buscamos com nosso trabalho observar se há mudanças da intensidade de cor dos órgãos internos de três espécies de anuros neotropicais submetidos a variação térmica, baseando-se no padrão de pigmentação já observado em trabalho anterior (Moresco e Oliveira, 2009).

## Materiais e métodos

O experimento foi realizado com três espécies de anuros da região de São José do Rio Preto – SP (20° 47' 07,05" S 49° 21' 42,09" O): *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus nanus* e *Rhinella schneideri*. Estas espécies são numerosas e ocupam nichos diferentes dentro do mesmo habitat, assim pode-se avaliar se a resposta é a mesma em espécies de taxa diferentes sob as mesmas condições sazonais, sendo que os espécimes foram coletados no período de reprodução (18573-1 – Licença permanente do IBAMA/MMA para coleta de material zoológico).

Os nove exemplares coletados de cada espécie passavam quatro dias de aclimação em terrários individuais, os quais tinham uma porção com terra e outra com água. Durante todo o período de experimento os animais não foram alimentados buscando evitar uma possível alteração da pigmentação em decorrência da alteração da dieta. Depois desse período, três destes exemplares foram anestesiados e levados a óbito (grupo controle), por submersão em etanol 20% e abertos por laparotomia seguindo o Guia para o Cuidado e o Uso dos Animais de Laboratório – Unesp (Protocolo 001/06 – CEEA). Os animais tiveram expostos os órgãos para a análise em estereomicroscópio (Leica – MZ16) acoplado a um sistema de captura de imagens. Identificou-se os órgãos que possuíam pigmentação, bem como seu padrão de intensidade e distribuição, que seguiu uma escala de 4 categorias sendo que a categoria 0 refere-se a órgãos sem nenhum pigmento e a categoria 3 órgãos intensamente pigmentados, com dois estágios intermediários progressivamente mais pigmentados. A metodologia para análise anatômica descritiva está detalhada no estudo de Franco-Belussi *et al.* (2009). Os órgãos observados foram: coração, vasos da base e pericárdio, pulmões, baço, fígado, estômago, intestino e mesentério, reto, peritônio, testículos, rins e veias renais, coluna e plexo nervoso.

Os demais animais foram submetidos à variável experimental de temperatura baixa em uma estufa B.O.D. Nesse período eles foram submetidos à temperatura de 10°C durante três dias. Após esse período três animais de cada espécie foram sacrificados e analisados em lupa. Passados mais três dias os demais animais foram encaminhados para a mesma análise.

Para o segundo experimento foram realizados os mesmo procedimentos, porém os animais coletados ficaram na B.O.D. sob temperatura de 35°C. Após três dias foram analisados três animais de cada espécie sendo que os demais foram analisados após seis dias de tratamento.

Para termos uma maior amostragem do padrão de pigmentação visceral existente nas espécies os dados encontrados no grupo controle do experimento de temperatura baixa foram unidos aos dados do grupo controle de temperatura alta, totalizando 6 animais controle de cada espécie nos dois experimentos. Isto não representa um problema uma vez que os espécimes foram coletados no mesmo período e local.

## Resultados

Em muitos locais as células pigmentadas apresentam aspecto dendrítico com muitos prolongamentos citoplasmáticos repletos de pigmentos (Figura 1). Estas células também foram observadas com aspecto puntiforme, o que ocorre com o deslocamento centrípeto dos pigmentos. Essa característica morfofisiológica é semelhante à apresentada pelos melanóforos da cútis.

Cada uma das espécies apresentou um padrão de pigmentação espécie-específico na maioria dos órgãos observados com pequenas variações em alguns órgãos, como já relatado em estudo anterior (Moresco e Oliveira, 2009).

### Temperatura alta (35°C)

#### - *Rhinella schneideri*

Em *R. schneideri* não foi observado nos pulmões a presença de pigmentação (categoria 0). O coração e vasos da base dos animais do grupo controle também não apresentavam pigmentação, característica presente em 100% e 70% respectivamente dos animais tratados durante três dias, porém, nos animais tratados durante seis dias 70% apresentaram pouca pigmentação nos vasos da base e 100% não possuíam pigmentação no coração. Já o pericárdio apresentou pouca pigmentação (categoria 1) em todos os indivíduos analisados (Figura 2A). O baço dos indivíduos do grupo controle não apresentou pigmentação (categoria 0), porém, 100% dos indivíduos tratados durante seis dias passaram a apresentar pouca pigmentação (categoria 1). A coluna e o plexo nervoso apresentaram intensidade de pigmentação baixa (categoria 1) em 85% dos indivíduos controle e 70% dos indivíduos tratados durante três dias, já os animais tratados durante seis dias apresentaram uma pigmentação moderada (categoria 2) no plexo nervoso de 70% dos

indivíduos e pouca pigmentação (categoria 1) em 100% do plexo nervoso dos indivíduos. A metade dos indivíduos observados apresentou pigmentação moderada no fígado (categoria 2) os demais não possuíam pigmentação neste órgão (categoria 0) porém, após os tratamentos de três e seis dias 70% dos indivíduos apresentaram pouca pigmentação no fígado (Figura 2B). Os testículos de 85% dos animais do grupo controle não apresentaram pigmentação, que esteve presente em 100% dos animais tratados durante três dias, essa pigmentação estava localizada em regiões delimitadas na superfície dos órgãos que apresentavam uma coloração escura (Figura 3A) e, após feito um corte no órgão pode-se observar a presença de pigmentos envolvendo os lóculos seminíferos na região escura, porém, após o tratamento de seis dias apenas 30% dos indivíduos apresentaram pigmentação testicular (categoria 1) (Figura 3B). Os rins e as veias renais não apresentaram melanócitos, porém, em alguns indivíduos foi observada uma coloração alaranjada (Figura 4). O peritônio apresentou uma grande intensidade de pigmentação (categoria 2) em 85% dos espécimes do grupo controle, padrão presente em 70% dos animais tratados durante três e seis dias (Figura 2C). No sistema digestório: estômago, intestino e mesentério não apresentaram pigmentação tanto nos animais controle quanto nos animais tratados, porém, foi possível observar pigmentação no reto de 1 indivíduo que passou por três dias de tratamento e em outro que passou por seis dias de tratamento (Figura 2D).

- *Dendropsophus nanus*

Neste tratamento os espécimes de *D. nanus* apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) nos vasos da base de 65% dos animais do grupo controle, 100% dos animais tratados durante três dias e 70% dos animais tratados durante seis dias. O coração e pulmões dos animais do grupo controle apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) em 85% e 65% dos indivíduos respectivamente, padrão presente em 100% dos indivíduos

tratados durante três e seis dias. O pericárdio não apresentou pigmentação (categoria 0) (Figura 5A). No baço houve uma pequena variação, pois 100% dos animais controle apresentavam baixa intensidade de pigmentação (categoria 1) e durante o tratamento de três dias apenas 30% dos animais apresentaram esse padrão, após o tratamento de seis dias 70% dos animais apresentaram pouca pigmentação (Figura 5B). No fígado não houve variação expressiva, já que a maioria dos animais apresentou intensidade moderada de pigmentação tanto no controle quanto nos animais tratados (categoria 2). Na coluna de 35% dos indivíduos do grupo controle houve presença de pouca pigmentação e esse padrão esteve presente em 100% dos animais tratados durante três e seis dias, já no pleno nervoso a maioria dos animais não apresentou pigmentação, representados por 65% dos animais do grupo controle, 100% dos animais tratados durante três dias e 70% dos animais tratados durante seis dias (Figura 5B). Nos testículos e peritônio (Figura 5C) assim como nos órgãos relacionados com a digestão (Figura 5D) não foi observada pigmentação alguma. Nos rins houve diminuição da pigmentação após os tratamentos de três e seis dias já que 65% dos animais do grupo controle apresentaram pigmentação moderada e após os tratamentos de três e seis dias 70% e 100% apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) respectivamente. Nas veias renais o padrão de ausência de pigmentação nos animais controle não sofreu alterações expressivas nos animais tratados (Figura 5C).

- *Physalaemus cuvieri*

Em 65% dos indivíduos de *P. cuvieri* houve baixa presença de pigmentos (categoria 1) no pericárdio de 65% dos animais do grupo controle, padrão presente em 100% dos espécimes tratados durante três e seis dias. Nos vasos da base de 100% dos indivíduos houve padrão de pigmentação moderada (categoria 2). No coração e pulmões de 65% dos espécimes do grupo controle houve presença de pouca pigmentação (categoria 1), padrão que esteve presente também em 70% dos animais tratados durante três e seis dias

(Figura 6A). No baço de 65% dos animais do grupo controle houve presença de pigmentação moderada (categoria 2) e este padrão esteve presente em 100% e 70% dos indivíduos tratados durante três e seis dias respectivamente. No fígado de 50% dos animais do grupo controle houve presença de pigmentação moderada (categoria 2) e 50% de pouca pigmentação (categoria 1), este último padrão se repetiu em 100% dos animais tratados durante três dias e 30% dos animais tratados durante seis dias (Figura 6B). No sistema digestório não foi possível determinar um padrão de pigmentação, assim, mesmo nos animais do grupo controle, houve variação de intensidade de pigmentação, resultado visto também nos animais que passaram pelos tratamentos de três e seis dias (Figura 6D). Os testículos apresentaram pigmentação intensa (categoria 3) que não sofreu alteração mesmo depois dos tratamentos. No peritônio de 100% dos animais do grupo controle houve presença moderada de pigmentação (categoria 2) e este padrão esteve presente em 70% dos animais tratados durante três e seis dias. Nas veias renais e rins de 85% dos espécimes do grupo controle houve presença moderada e baixa de pigmentos, respectivamente, este padrão se repetiu em 100% dos animais tratados durante três dias e em 70% dos animais tratados durante seis dias. No plexo nervoso e coluna os padrões de pigmentação foram classificados na categoria 2 e 1 respectivamente (Figura 6B).

### **Temperatura baixa (10°C)**

#### **- *Rhinella schneideri***

Em *R. schneideri* o pericárdio, vasos da base e pulmões apresentaram a mesma intensidade de pigmentação que no tratamento de temperatura alta, sem nenhuma variação. Já no coração 30% dos indivíduos apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) nos tratamentos de três e seis dias, diferentemente do grupo controle, onde os animais não apresentaram pigmentação (categoria 0) (Figura 7A). Na coluna e plexo nervoso todos os

indivíduos tratados apresentaram pouca pigmentação (categoria 1). No baço apenas 30% dos indivíduos tratados durante seis dias apresentaram pigmentação (categoria 1) e no fígado a maioria dos indivíduos tratados apresentaram pouca pigmentação (categoria 1), porém nos animais do grupo controle houve presença de pigmentação moderada em 50% dos indivíduos e ausência de pigmentação em 50% dos demais (Figura 7B). Os testículos de 85% dos animais do grupo controle não apresentaram pigmentação, porém, após o tratamento de três e seis dias 100% dos indivíduos apresentaram pouca pigmentação (categoria 1). Nos rins e veias renais permaneceu a ausência de pigmentação em todos os espécimes analisados. No peritônio houve diminuição na intensidade de pigmentação, pois todos os indivíduos tratados durante três e seis dias apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) diferentemente dos animais do grupo controle onde 85% apresentavam pigmentação moderada (Figura 7C). Todos os órgãos observados do sistema digestório são desprovidos de pigmentação (categoria 0) (Figura 7D).

- *Dendropsophus nanus*

Em *D. nanus* o pericárdio não apresentou pigmentação (categoria 0) em todos os espécimes analisados. Nos vasos da base e pulmões 65% dos espécimes do grupo controle apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) que esteve presente em 70% dos animais tratados durante três dias e nos animais tratados durante 6 dias esse padrão esteve presente em 70% e 30% respectivamente. (Figura 8A). No baço e fígado não houve diferenças presentes nos animais do grupo controle, onde os órgãos apresentaram intensidade de pigmentação 1 e 2 respectivamente, durante os tratamentos de três e seis dias não houve alteração no baço, porém no fígado 30% dos animais tratados apresentaram pigmentação menor (categoria 1) (Figura 8B). No plexo nervoso e coluna de 65% dos animais controle não foi observada pigmentação (categoria 0) e após o tratamento de três dias 70% dos animais permaneceram apresentando categoria 0 no plexo nervoso porém na coluna o

padrão foi de pouca pigmentação (categoria 1) que apareceu apenas em 30% dos animais tratados durante seis dias, já no plexo nervoso 100% dos animais não apresentaram pigmentação (categoria 0) (Figura 8B). Na maioria dos órgãos do sistema digestório não foi observado pigmentação tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais tratados durante três e seis dias (Figura 8D), assim como os testículos e peritônio (Figura 8C). Já nas veias renais apenas 30% dos animais tratados durante seis dias apresentaram pigmentação moderada (categoria 2), os demais não apresentaram pigmentação (categoria 0) e nos rins 70% dos animais do grupo controle apresentaram pigmentação moderada (categoria 2), 70% dos animais tratados durante três dias apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) e 100% dos animais tratados durante seis dias não apresentaram pigmentação (categoria 0) (Figura 8C).

- *Physalaemus cuvieri*

Neste tratamento, os espécimes de *P. cuvieri* apresentaram o mesmo padrão (com variações não relevantes) antes e após o tratamento no pericárdio, vasos da base, coração e pulmões (Figura 9A). No baço houve diminuição na intensidade de pigmentação nos animais tratados durante três e seis dias, pois 100% destes apresentaram pouca pigmentação (categoria 1), diferentemente dos animais do grupo controle onde 65% apresentaram pigmentação moderada (categoria 2) (Figura 9B). Já no fígado não houve variação notória e os padrões presentes foram pouca pigmentação (categoria 1) e pigmentação moderada (categoria 2) (Figura 9B). No estômago e intestino da maioria dos animais o padrão de pigmentação presente foi da categoria 0, no mesentério houve presença de pouca pigmentação (categoria 1) e no reto dos animais do grupo controle 50% apresentaram pouca pigmentação (categoria 1) os demais apresentaram pigmentação moderada (categoria 2) que esteve presente em 70% dos animais tratados durante três dias e nos animais tratados durante seis dias 100% apresentaram pouca pigmentação (categoria

1) (Figura 9D). Nos testículos o padrão apresentado foi de pigmentação intensa (categoria 3) e no peritônio a pigmentação foi moderada (categoria 2) (Figura 9C), assim como no plexo nervoso, mas na coluna a pigmentação foi menos intensa na maioria dos animais (categoria 1) (Figura 9B). Nos rins e veias renais a pigmentação não sofreu alterações evidentes após os tratamentos de três e seis dias, permanecendo os padrões de categoria 1 e 2 respectivamente (Figura 9C).

## Discussão

Ainda não há hipóteses conclusivas quanto à presença de pigmentos nos órgãos internos dos animais, nem se essa pigmentação sofre alterações ao longo do ano ou se é uma característica filogenética (Rund *et al.*, 1998; Zieri *et al.*, 2007). Como foi observado no trabalho de Franco-Belussi *et al.* (2009), a intensidade de pigmentação nos testículos de algumas espécies parece manter um padrão, mesmo em indivíduos da mesma espécie coletados em regiões diferentes do Brasil. Outras pesquisas mostraram a presença de pigmentação nas gônadas de anfíbios, porém, em nenhum destes ficou comprovado se existe ou não uma função para a presença dessas células nos órgãos (Aoki *et al.*, 1969; Gollmann *et al.*, 1993; Zuasti *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2002; Oliveira e Zieri, 2005). Grant (2004) relata a presença de melanócitos nos testículos de *Colostethus panamensis* com diferente pigmentação entre os antímeros.

Em outro estudo foi observada a presença de pigmentação no intestino e testículos de alguns anuros da família Dendrobatidae e proposto uma forma de classificação dessa característica em três estados de um caráter, sendo o estado 0 ausência de pigmentação, o estado 1 presença da pigmentação em apenas uma pequena porção do órgão e o estado 2 distribuição da pigmentação em todo o órgão. Nesse caso ignorou-se a intensidade da pigmentação e adotaram-se os padrões baseando-se na distribuição das células pigmentadas dos órgãos (Grant *et al.*, 2006).

Com base nos resultados pode-se concluir que nos experimentos com temperatura de 10°C e 35°C o sistema pigmentar extracutâneo dos anfíbios não sofre nenhuma alteração detectável no aspecto anatômico, tanto após três dias de tratamento como após seis dias, pois as alterações apresentaram-se muito mais próximas da expressão fenotípica da

pigmentação de cada animal e ainda, não houve padrão de modificações nos órgãos quando comparadas as espécies diferentes.

Em estudos com três espécies de peixes teleósteos, Zuasti *et al.* (1990) observaram a presença de pigmentos no fígado, baço, rim e mesentério. Porém, não houve um padrão de número, distribuição e morfologia dos centros contendo pigmentos. Mesmo em espécies filogeneticamente muito próximas às vezes é difícil traçar um padrão de pigmentação, essa característica se aplica também a répteis e anfíbios (Cicero *et al.*, 1982; Sichel, 1997).

Sabe-se que as células presentes no baço e fígado, ou seja, órgãos hematopoiéticos apresentam atividades macrofágicas e são conhecidas como melanomacrófagos (Agius, 1980; Agius e Agbede, 1984). Estas células apresentam diferentes tipos de grânulos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como melanina, hemosiderina e lipofuscina, derivados da degradação de material celular fagocitado (Agius e Agbede, 1984). Os melanomacrófagos residentes no fígado de anfíbios também são conhecidos como células de Kupffer (Sichel *et al.*, 1997; Zuasti *et al.*, 1998; Prelovisek e Bulog, 2003).

A incidência de melanina extracutânea pode ter origem graças a uma grande capacidade migratória de melanoblastos e outras células pigmentadas derivadas da crista neural (Zuasti *et al.*, 1990) e também de células tronco hematopoiéticas (Sichel *et al.*, 1997). A melanina nas células de Kupffer caracteriza-se como um polímero complexo capaz de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (Zuasti *et al.*, 1989). Sendo importante contra componentes bacterianos, devido à ação da hidrogeno-peroxidase e suas quinonas precursoras, as quais agem como agentes bactericidas auxiliando as atividades enzimáticas nos ectotérmicos, onde estas atividades podem ser restritas em baixas

temperaturas (Christiansen *et al.*, 1996), assim, foi demonstrado que outro fator relacionado às mudanças sofridas nestas células é o nível de poluição ambiental. Por isso, a melanina também é capaz de atuar em baixas temperaturas agindo na defesa contra agentes patológicos (Fenoglio, 2005).

Mudanças estruturais e funcionais drásticas nas células de Kupffer foram observadas ao longo do ciclo de hibernação, período caracterizado por baixa temperatura e pouca oferta de alimento. Em experimento com três espécies de anfíbios: *Rana esculenta*, *Triturus a. apuanus* e *Triturus carnifex* foi observado que o conteúdo de pigmento no parênquima do fígado era expressivamente maior no período de hibernação do que no período de atividade (Barni *et al.*, 1999, 2002). Nos anuros neotropicais parece não haver alterações nas células de Kupffer em resposta a mudança de temperatura, pelo menos em níveis anatômicos, como observado nos animais de clima temperado.

Outras células contendo melanina foram observadas nos testículos, coração e tecidos relacionados, rins, coluna e plexo nervoso, peritônio, intestino e mesentério, reto e pulmões. Essas células recebem o nome de melanócitos e apresentam sua morfologia semelhante à apresentada pelos melanócitos da cútis de diversos animais, porém não existem estudos que evidenciem semelhanças funcionais (Fujii e Oshima, 1986; Klaus, 2006).

Em estudo com *Eupemphix nattereri* (Zieri *et al.*, 2007) foi constatado uma íntima relação dos melanócitos com o sistema vascular de diversos órgãos. Esta sintopia entre células pigmentares e vasos sanguíneos foi constatada em todas as espécies, em nosso estudo principalmente nas veias renais (Figura 10D). Segundo Oliveira e Zieri (2005) essas células são constituintes do próprio tecido conjuntivo do órgão ou de tecidos associados ao mesmo, como túnicas adventícias ou membranas serosas. Em muitos locais as células pigmentadas apresentam aspecto dendrítico com muitos prolongamentos citoplasmáticos

repletos de pigmentos. Quando há deslocamento dos pigmentos para o centro da célula estas se apresentam com aspecto puntiforme e centro mais escuro.

Outra célula pigmentada, observada em nosso estudo apenas em *P. cuvieri*, também mostra íntima relação com o sistema vascular, são os iridóforos que caracteristicamente apresentam coloração iridescente e contém purinas e cristais de pteridina (Klaus 2006). Muitas vezes fica evidente que todo o órgão passa a ter essas células através do sistema vascular hepático uma vez que em alguns indivíduos foi vista a intensa pigmentação iridescente apenas nos grandes vasos e em outros animais essa coloração já estava presente em toda a superfície do órgão (Figura 10A-C).

Os precursores de melanócitos, melanoblastos, têm origem na crista neural e migram até os órgãos de destino, onde podem passar por alterações reguladas por diversos fatores (Klaus, 2006). Essas alterações foram observadas em melanócitos da cútis de peixes, onde a diminuição induzida das células pigmentadas resultou do processo de fagocitose e o aumento dessas células aconteceu através da proliferação de melanócitos, sendo que muitos estudos apontam para a diferenciação de precursores dessas células para que ocorra esse aumento e não divisão das células diferenciadas (Sumner, 1940; Sugimoto *et al.*, 2000; Sugimoto, 2002).

O hormônio que regula a produção de melanina nos melanócitos é o MSH (hormônio estimulante de melanócito), este peptídeo é produzido na hipófise e transportado até os cromatóforos através da circulação (Castrucci *et al.*, 1984; Hadley, *et al.*, 1985; Filadelfi e Castrucci, 1994). Este hormônio dispersa os grânulos de pigmento, promovendo alteração da cor do tegumento em vertebrados ectotérmicos (Bagnara e Matsumoto, 2006). Estudos com outros vertebrados demonstram que os hormônios esteróides também influenciam na pigmentação, e seus efeitos nos anfíbios foi observado

em *Hyperolius argus*, demonstrando alteração na expressão dos cromatóforos quando empregado hormônios sexuais (Richards, 1982; Hayes e Menendez, 1999).

Pelo fato de não ter havido um padrão de mudança na intensidade de pigmentação dos órgãos observados neste estudo, podemos concluir que o sistema pigmentar extracutâneo não é modulado pela temperatura, pelo menos nas variáveis em que as espécies foram submetidas. Também foi visto que mesmo nos animais controle existe uma variação intra-específica na intensidade de pigmentação dos órgãos e em outros casos observamos um padrão que se manteve mesmo após o tratamento. Com base nestas observações, possivelmente a pigmentação oriunda de melanócitos está mais associada a uma característica filogenética e fenotípica do que um aspecto fisiológico. Uma vez que inúmeras são as variáveis que poderiam influenciar essa pigmentação, outros estudos se fazem necessários para comprovar a expressão dessa característica anatômica.

## Figuras

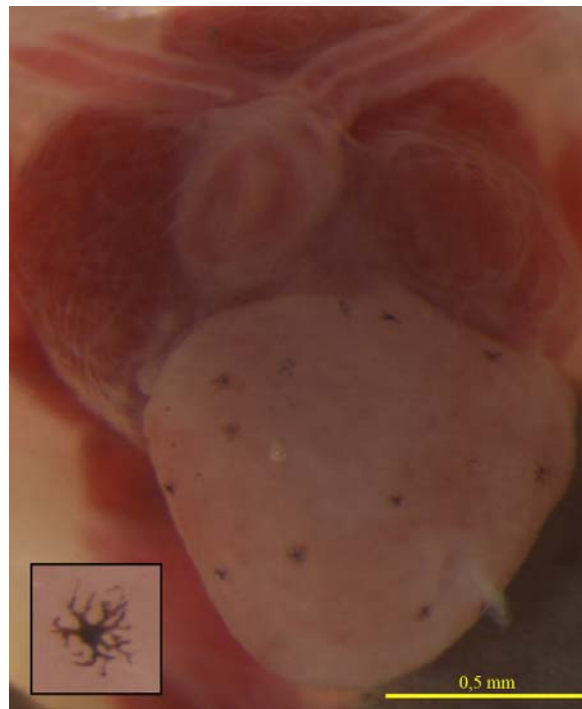


Figura 1 – Coração de *Dendropsophus nanus* com presença de melanócitos. No detalhe um melanócito evidenciando seu aspecto dendrítico resultado da migração centrífuga dos pigmentos nos prolongamentos da célula.

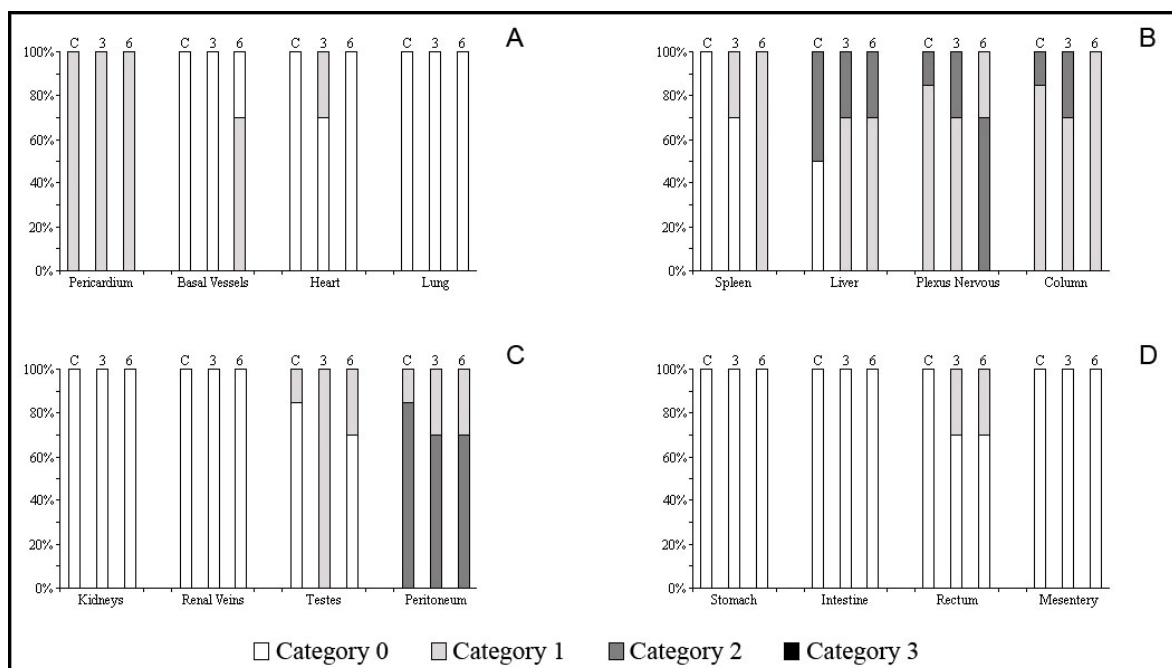


Figura 2 – Experimento de Temperatura Alta (35°C). Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Rhinella schneideri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmões; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

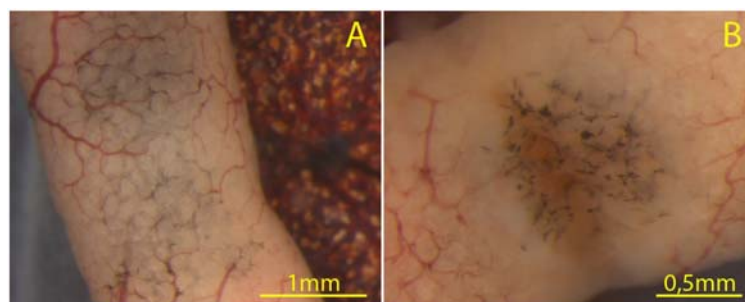


Figura 3 – Pigmentação no testículo de *Rhinella schneideri* com região mais escura resultante da presença de melanócitos (A) que estão presentes inclusive no interior do órgão (B).



Figura 4 – Presença de pigmentos alaranjados nos rins de alguns indivíduos de *Rhinella schneideri*.

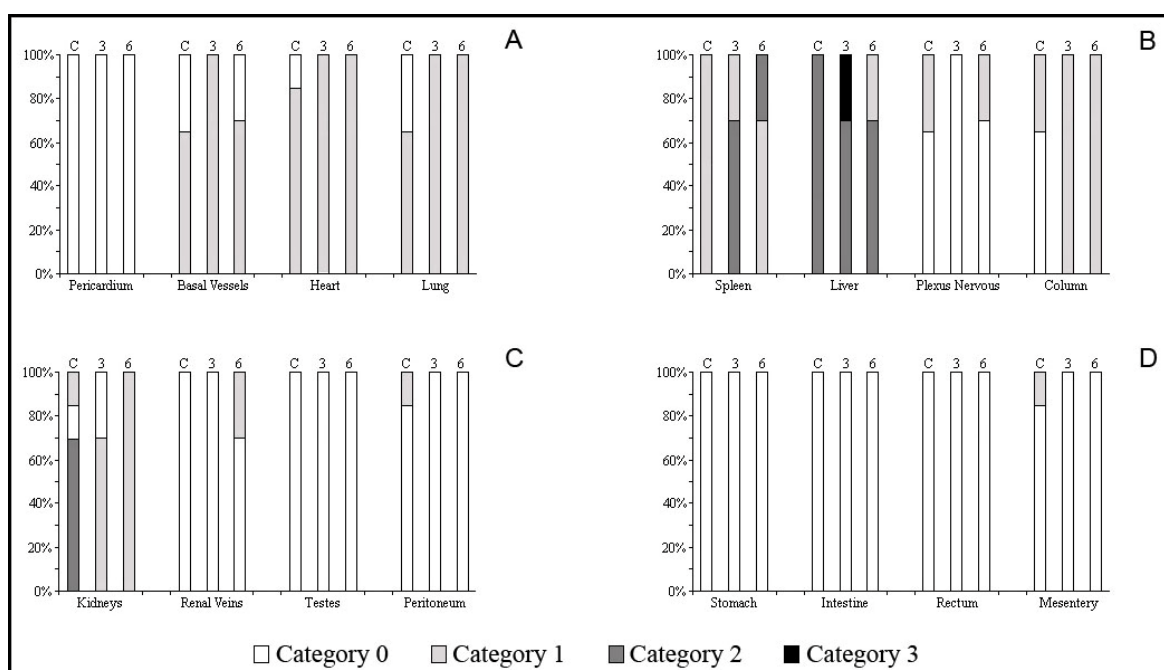


Figura 5 – Experimento de Temperatura Alta (35°C). Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Dendropsophus nanus* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmões; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

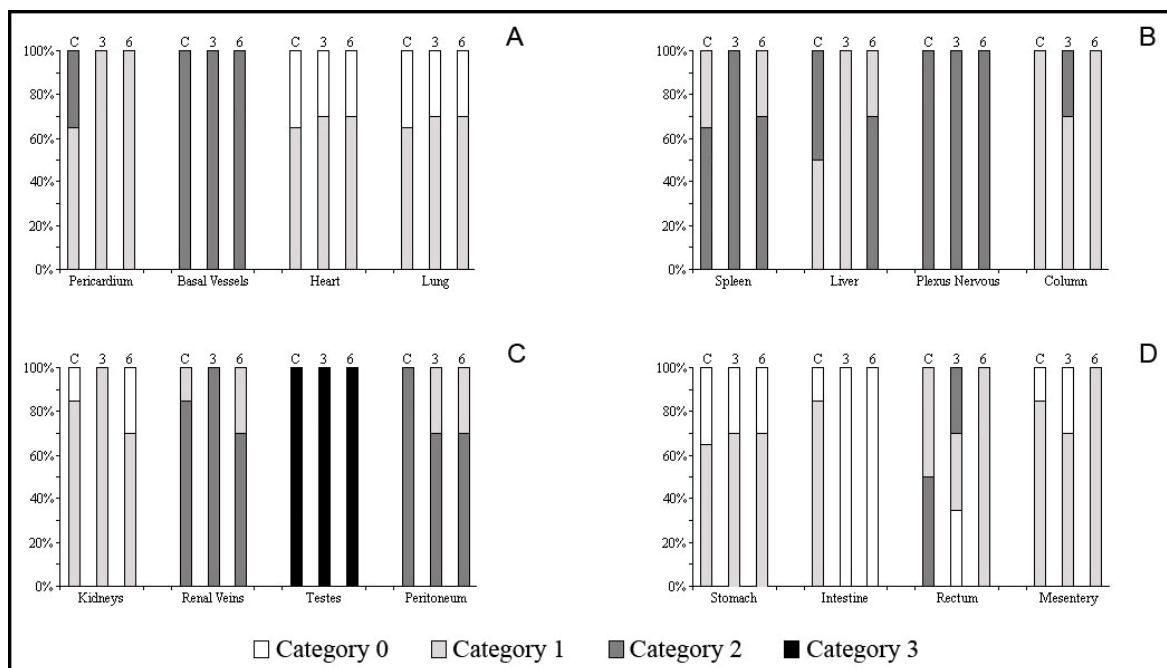


Figura 6 – Experimento de Temperatura Alta (35°C). Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Physalaemus cuvieri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmões; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

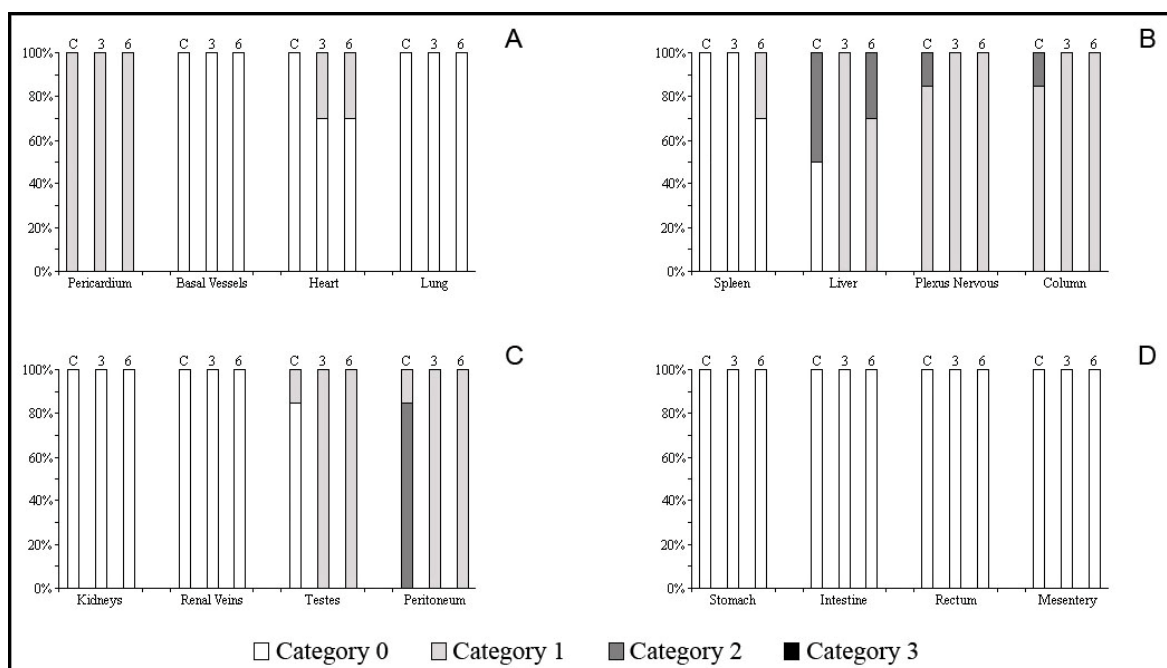


Figura 7 – Experimento de Temperatura Baixa (10°C). Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Rhinella schneideri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmões; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

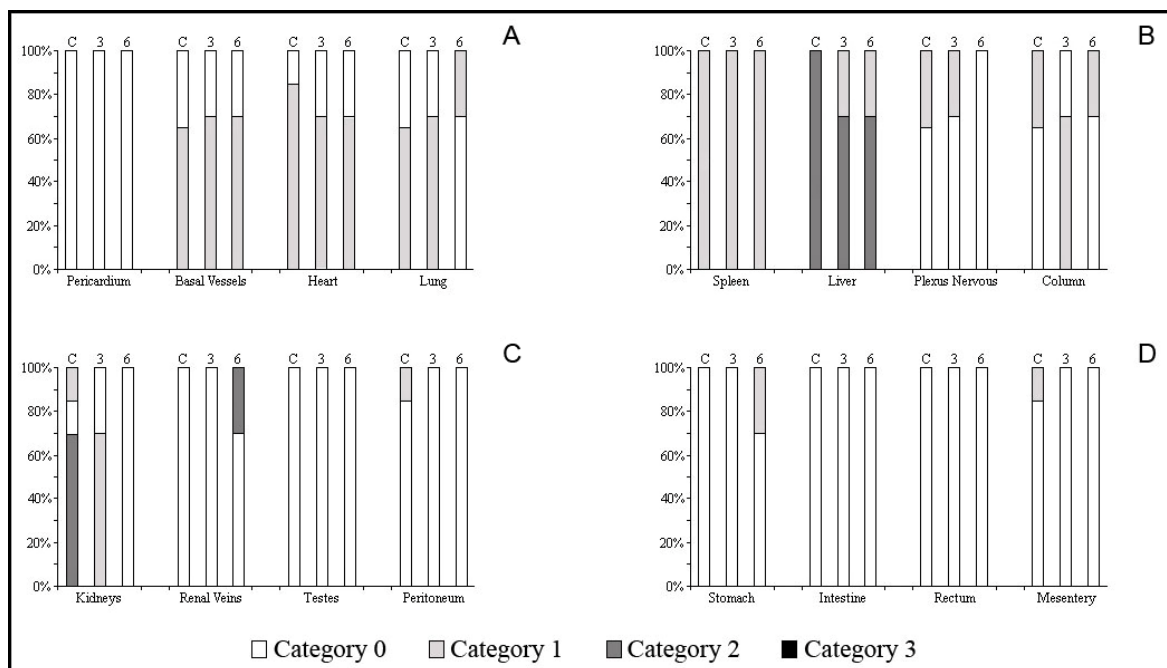


Figura 8 – Experimento de Temperatura Baixa (10°C). Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Dendropsophus nanus* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmões; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

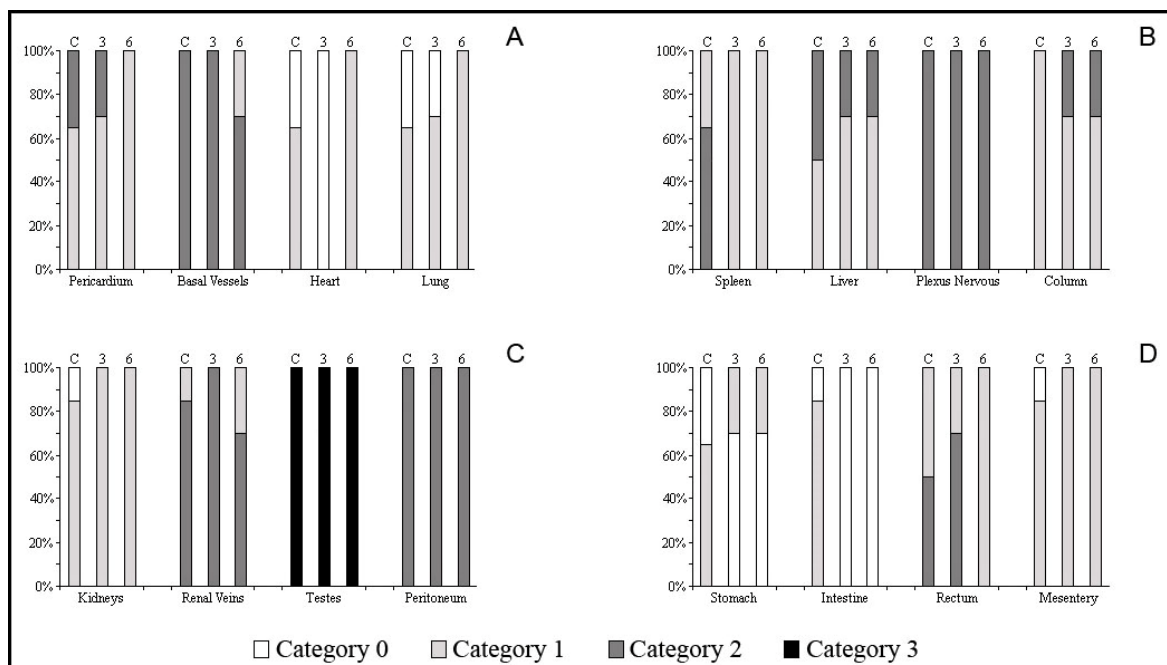


Figura 9 – Experimento de Temperatura Baixa (10°C). Gráficos representando os padrões de intensidade de pigmentação existentes em *Physalaemus cuvieri* (porcentagem): em (A) pericárdio, vasos da base, coração e pulmões; (B) baço, fígado, plexo nervoso e coluna; (C) rins, veias renais, testículos e peritônio e (D) estômago, intestino, reto e mesentério. Indivíduos do grupo controle (c), tratamento de três dias (3) e tratamento de seis dias (6).

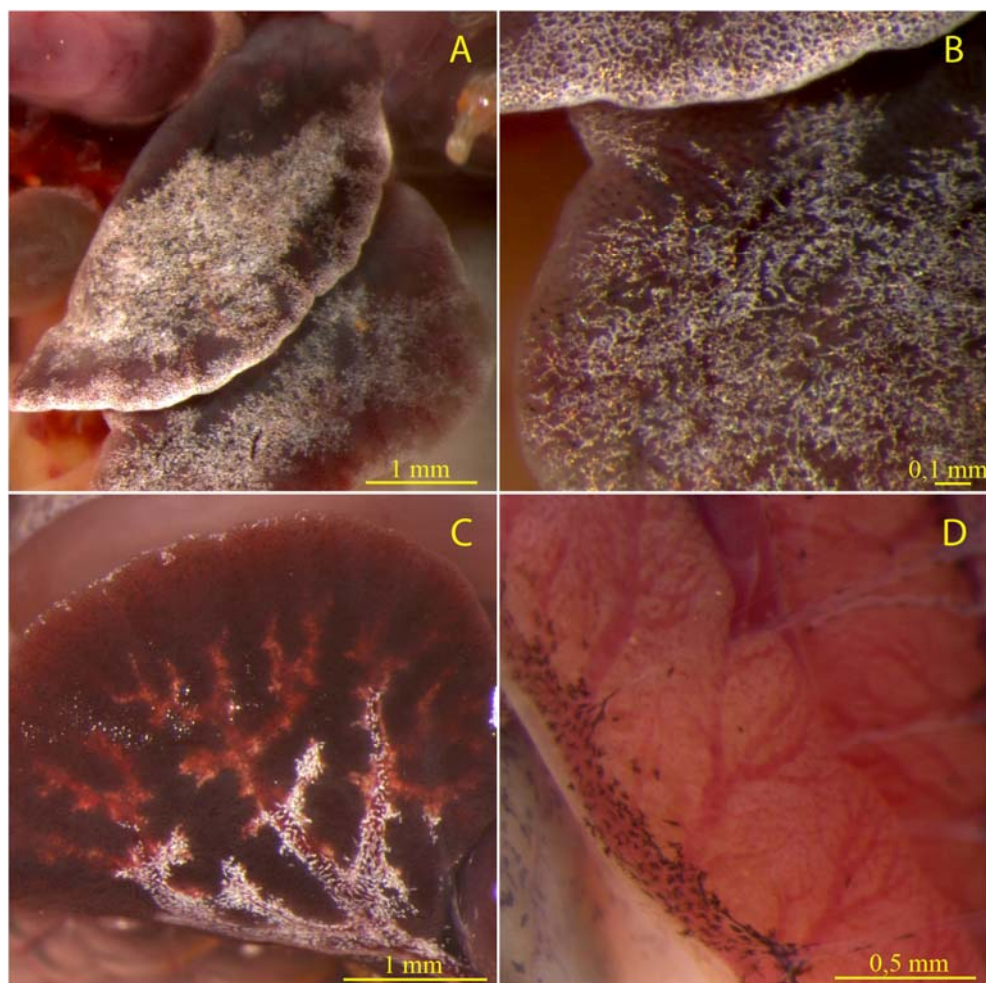


Figura 10 – Distribuição de pigmentos tipo iridóforos no fígado de *Physalaemus cuvieri*: (A) face anterior de dois lobos hepáticos cobertos superficialmente pelos iridóforos; (B) detalhe da distribuição dos iridóforos; (C) vasos hepáticos envolvidos por iridóforos. Melanócitos envolvendo os vasos renais de *Physalaemus cuvieri* (D).

## Referências

- Agius, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. *Journal of Zoology*, 191: 11-31.
- Agius, C. e Agbede, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology*, 24 (4): 471-488.
- Aoki, A.; Vitale-Calpe, R. e Pisano, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 98(1): 9-16.
- Bagnara, J.T. e Hadley, M.E. 1973. Chromatophores and color change, the comparative physiology of animal pigmentation. *The Quarterly Review of Biology*, 49(2): 159-160.
- Bagnara, J.T. e Matsumoto, J. 2006. *Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues*, in Nordlund, J.J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R.A.; Oetting, W.S. e Ortonne, J.P. 2006. *The Pigmentary System*. Blanckwell Publishing, 1229.
- Barni, S.; Bertone, V.; Croce, A.C.; Bottirolì, G.; Bernini, F. e Gerzeli, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195: 19-25.
- Barni, S.; Vaccarone, R.; Bertone, V.; Frascini, A.; Bernini, F. e Fenoglio, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta*. *Jornal of Anatomy*, 200: 185-194.
- Benedito, E.; Jiménez-Cervantes, C.; Pérez, D.; Cubillana, J.D.; Solano, F.; Jiménez-Cervantes, J.; Meyer zum Gottesberge, A.M.; Lozano, J.A. e García-Borrón, J.C. 1997. Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase

- kinetically and structurally different from tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336: 59-72.
- Castrucci, A.M.L.; Haddley, M.E. e Hruby, V.J. 1984. Melanotropin Bioassays: In vitro and in vivo comparisons. *General and Comparative Endocrinology*, 55: 104-111.
- Christiansen, J.L.; Grzybowski, J.M. e Kodama, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, 9(4): 185-190.
- Cicero, R.; Sciuto, S.; Chillemi, R. e Sichel, G. 1982. Melanosynthesis in the Kupffer cells of amphibian. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73(A): 477-479.
- Corsaro, C.; Scalia, M.; Leotta, N.; Mondio F. e Sichel, G. 2000. Characterization of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*, 196: 249-261.
- Fenoglio, C.; Boncompagni, E.; Fasola, M.; Gandini, C.; Comizzoli, S.; Milanese, G. e Barni, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cell of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 259-268.
- Filadelfi, A.M.C. e Castrucci, A.M.D. 1994. Melatonin desensitizing effects on the in-vitro responses to MCH, Alpha-MSH, Isoproterenol and melatonin in pigment-cells of a fish (*S. marmoratus*), a toad (*B. ictericus*), a frog (*R. pipiens*), and a lizard (*A. carolinensis*), exposed to varying photoperiodic regimens. *Comparative biochemistry and Physiology A-Physiology*, 109 (4): 1027-1037.
- Franco-Belussi, L.; Zieri, R.; Santos, L.R.S.; Moresco, R.M. e Oliveira, C. 2008. Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. *The Anatomical Record*, 292: 178-182.
- Fujii R. e Oshima N. 1986. Control of chromatophore movements in teleost fishes. *Zoological Science*, 3: 13-47.

- Gallone, A.; Guida, G.; Maida, I. e Cicero, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? *Pigment Cell Research*, 15: 32-40.
- Gollmann G.; Borkin L.J. e Roth P. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). *Zoologische Jahrbücher: Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*, 120: 129–136.
- Grant, T. 2004. On the identities of *Colostethus inguinalis* (Cope, 1868) and *C. panamensis* (Dunn, 1933), with comments on *C. latinasus* (Cope, 1863) (Anura: Dendrobatidae). *American Museum Novitates*, 3444: 1-24.
- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliard, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E. e Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299:1-261.
- Hadley M.E.; Mieyr J.H.; Martin B.E. e Castrucci A.M.L. 1985. [Nle<sup>4</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]-alpha-MSH: a superpotent melanotropin with prolonged action on vertebrate chromatophores. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, 81 (1): 1-6.
- Hayes, T.B. e Menendez, K.P. 1999. The Effect of Sex Steroids on Primary and Secondary Sex Differentiation in the Sexually Dichromatic Reedfrog (*Hyperolius argus*: Hyperolidae) from the Arabuko Sokoke Forest of Kenya. *General and Comparative Endocrinology*, 115: 188-199.
- Klaus, S.N. 2006. *A history of the science of pigmentation*, in Nordlund, J.J.; Boissy, R.E.; Hearing, V.J.; King, R.A.; Oetting, W.S. e Ortonne, J.P. 2006. *The Pigmentary System*. Blanckwell Publishing, 1229.
- Manera, M.; Serra, R.; Isani, G. e Capené, E. 2000. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. *Journal of Fish Biology*, 57: 457-465.

- Micale, V. e Perdichizzi, F. 1990. A quantitative and histochemical study on melanomacrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. *Journal of Fish Biology*, 37(2): 191-197.
- Moresco, R.M. e 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*, in press.
- Odiome J.M. 1933. Degeneration of melanophores in *Fundulus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 19: 329–332.
- Oliveira, C.; Zanetoni, C. e Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia*, 20(3): 263-268.
- Oliveira, C. e Zieri, R. 2005. Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2): 454-460.
- Prelovsek, P.M. e Bulog B. 2003. Biogenesis of Melanosomes in Kupffer Cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *Pigment Cell Research*, 16: 345-350.
- Richards, C.M. 1982. The alteration of chromatophore expression by sex hormones in the Kenyan reed frog, *Hyperolius viridiflavus*. *General Comparative Endocrinology*, 46: 58-67.
- Rund, C.R.; Christiansen, J.L. e Johnson, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Research*, 11(2): 114-119.
- Santos, L.R.S. e Oliveira, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(26): 64-70.

- Sichel, G.; Scalia M.; Mondio F. e Corsaro C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Research*, 10: 271-287.
- Sichel, G.; Scalia, M. e Corsaro, C. 2002. Amphibia Kupffer cells. *Microscopy Research and Technique*, 57: 477-490.
- Sugimoto M.; Uchida N. e Hatayama M. 2000. Apoptosis in skin pigment cells of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei), during long-term chromatic adaptation: the role of sympathetic innervation. *Cell and Tissue Research*, 301: 205–216.
- Sugimoto, M. 2002. Morphological color changes in fish: regulation of pigment cell density and morphology. *Microscopy Research Technique*, 58:496-503.
- Sugimoto, M.; Yuki M.; Miyakoshi T. e Maruko K. 2005. The influence of long-term chromatic adaptation on pigment cells and striped pigment patterns in the skin of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Experimental Zoology*, 303(A): 430–440.
- Sumner, F.B. 1940. Quantitative changes in pigmentation, resulting from visual stimuli in fishes and amphibia. *Biological Reviews*, 15: 351–378.
- Williams, G.M. e Iatropoulos, M.J. 2002. Alterations of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30: 41-53.
- Zieri, R.; Taboga, S.R. e 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.; Jara, J.R.; Ferrer, C. e Solano, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research*, 2: 93-100.

- Zuasti, A.; Ferrer, C.; Aroca, P. e Solano, F. 1990. Distribution of Extracutaneous Melanin Pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus*, and *Dicertranchus labrax* (Pisces, Teleostei). *Pigment Cell Research*, 3:126-131.
- Zuasti, A.; Jiménez-Cervantes, C.; Garcia-Berrón, J.C. e Ferrer C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology*, 61: 305-316.

## Considerações finais

- Foram encontrados pelo menos 3 tipos diferentes de células pigmentadas nas espécies analisadas: os melanomacrófagos são as células pigmentadas encontradas no fígado e baço e possuem função macrofágica. Os iridóforos foram encontrados no fígado e vasos hepáticos de *Physalaemus cuvieri*, peritônio e pericárdio de *Dendropsophus nanus* e caracterizam-se pela coloração iridescente. Os melanócitos foram encontrados nos demais órgãos analisados.

- Não houve nenhuma alteração no sistema pigmentar em níveis anatômicos decorrentes das variações de fotoperíodo e temperatura. Com base nos resultados obtidos podemos constatar que não houve padrões de modificação da pigmentação em um determinado órgão comparando as três espécies após os experimentos.

- Foi possível descrever um padrão de pigmentação visceral espécie-específico para três espécies observadas, porém, mesmo nos animais que não passaram pelos tratamentos de fotoperíodo ou temperatura, houve uma pequena variação intra-específica da intensidade de pigmentação, sendo que em todos os casos a presença ou ausência de pigmentos foi a característica que menos sofreu diferenças nas espécies. Isso nos leva acreditar em duas hipóteses:

1- O sistema pigmentar extracutâneo é uma característica taxonômica, podendo existir variações inter-individuais dentro de uma mesma espécie;

2- O sistema pigmentar extracutâneo sofre alterações ao longo do ciclo de vida do animal, e para comprovarmos tal hipótese poderíamos acompanhar uma população ao longo de um ano. Isso não foi possível no nosso estudo já que os animais eram coletados somente no período reprodutivo. E, a pigmentação encontrada pode ser apenas o reflexo do momento em que os animais estavam.