



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE SAZONAL DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO DE *DENDROPSOPHUS*  
*MINUTUS* (ANURA: HYLIDAE)**

Luciana Trevizan de Moraes

Campo Grande, MS

Março, 2023



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE SAZONAL DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO DE *DENDROPSOPHUS*  
*MINUTUS* (ANURA: HYLIDAE)**

Luciana Trevizan de Moraes

Dissertação apresentada à  
Fundação Universidade Federal de  
Mato Grosso do Sul, como requisito  
à obtenção do título de Mestre em  
Biologia Animal.

Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

Campo Grande, MS

Março, 2023

**DEDICO**

*A todos, que  
juntos formam  
uma única,  
magnífica e  
amada  
**FAMÍLIA!***

*"É necessário olhar para  
frente da colheita, não  
importa o quão distante  
isso seja, quando uma  
fruta for colhida, algo  
bom aconteceu."*

**Charles Darwin**

## AGRADECIMENTOS

Para iniciar meus agradecimentos neste momento especial gostaria de citar uma frase de Raul Seixas:

*“Sonho que se sonha só  
é só um sonho que se sonha só  
Mas sonho que se sonha junto é realidade”*

E é exatamente por isso que quero deixar aqui minha gratidão a todos que estiveram ao meu lado por todo esse tempo, e fizeram com que esse sonho não fosse apenas um sonho e sim uma realidade. Realidade que de fato foi de extrema importância para meu crescimento pessoal e profissional. Farei os agradecimentos por ordem cronológica, pois todos que fizeram parte da minha vida durante este tempo têm a mesma importância, todos me ajudaram em minhas conquistas e também ser uma pessoa melhor.

1981.....: Aos meus extraordinários pais, Aurora Alonso Trevizan e Osvaldo Trevizan que me ensinaram a amar e ser amada. Concederam-me a vida e os ensinamentos para vivê-la de forma digna o que foi extremamente importante para engrandecer o meu ser.

1988 – 2000: A todos os meus educadores que com muita paciência me ensinaram que estudar não é um dever, e sim um direito, e também que estudar é muito mais prazeroso do que muitos imaginam.

2001 – 2011: A todos meus amigos e familiares que estiveram comigo nas horas boas e ruins, que me ajudaram a vencer todos os males me proporcionando alegrias e sempre me deixando feliz!

2012.....: A minha irmã Renata Cristina Trevizan Capela e meu cunhado Renan Fernandes Capela, que foram o alicerce da minha jornada acadêmica. Sem eles eu não teria conquistado além da graduação muitas outras coisas além da graduação, sempre me apoiaram em minhas decisões, me ajudando a conquistar meus sonhos.

2012.....: Ao Profº Drº Rodrigo Zieri que sempre muito paciente, não sei como me suportou. Acredito que se existisse uma porta nos fundos na sala dos professores ele entraria por lá, pois eu sempre estive o esperando na porta para pedir uma iniciação científica, a qual me rendeu, uma experiência no Laboratório de Anatomia Comparada da UNESP/IBILCE.

2013 – 2023: Ao Profº. Drº. Classius de Oliveira, que além de me aceitar em seu laboratório para estágio básico e iniciação científica, me ofereceu uma bolsa

FAPESP de Treinamento Técnico (TT3), me proporcionou muitas risadas nas numerosas coletas semanais, me puxou a orelha e me aconselhou. Não tenho palavras para agradecer este “pequeno” grande homem!

2013 – 2023: Aos colegas do Laboratório de Anatomia Comparada: Ariane Natalia Queiroz, Bruno Serra de Lacerda Valverde, Erick Augusto Bassi, Gabriel da Cunha Canevari, Lara Zacari Fanali, Lara Salgueiro de Gregório, Maysa Succi Domingues, Rhayane Alves de Assis e Wadson Rodrigues Rezende. Se tornaram minha segunda família, extremamente unida e feliz, repleta de companheirismo, afeto e parceria.

2013 – 2023: Dr<sup>a</sup> Lilian Franco Belussi, que me apoiou desde o estágio básico, me auxiliou nos procedimentos, me proporcionou muito conhecimento e também puxou minha orelha quando foi necessário. Foi peça chave para a realização deste trabalho. Muita gratidão.

2015 – 2017: A FAPESP, que financiou o meu projeto e me financiou com a bolsa TT3.

2017....: Ao meu excelentíssimo esposo Renato Vicente de Moraes, que veio para ficar comigo “pro que der e vier”, como ele havia me proposto com a música “Dia branco” de Geraldo Azevedo.

2019 – 2023: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Carlos Eurico Fernandes que mesmo sem me conhecer me aceitou e me orientou com excelência e extrema paciência. Afinal orientar uma gestante não deve ser fácil!

2019 – 2020: Ao meu sobrinho Luan Renato Trevizan Capela, que pra mim ainda é um menino, maravilhoso, inteligente e lindo. Deixou de “curtir” suas férias do curso de Medicina da FAMERP para me ajudar com os procedimentos laboratoriais. Ele foi fundamental neste trabalho.

2022.... – Ao Caique Trevizan de Moraes, um menino esperto, agitado e como todos dizem, simpático e lindo....! Meu bebê, que a cada olhar, a cada cafuné, a cada sorriso... me dá força pra eu lutar por este título.

## Sumário

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE TABELAS .....                                       | 8  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                       | 9  |
| 1 - Resumo .....                                             | 12 |
| 2 – Introdução .....                                         | 13 |
| 3 - Material e Métodos.....                                  | 15 |
| 3.1 – Espécie de estudo.....                                 | 15 |
| 3.2 - Coleta de espécimes .....                              | 16 |
| 3.3 - Análise biométrica.....                                | 17 |
| 3.4 - Processamento histológico .....                        | 17 |
| 3.5 - Densidade volumétrica estrutural.....                  | 18 |
| 3.6 - Morfometria hepática .....                             | 18 |
| 3.7. Quantificação de glicogênio e pigmentos hepáticos ..... | 19 |
| 3.8 – Estatísticas.....                                      | 20 |
| 4 – Resultados .....                                         | 21 |
| 4.1. Dados biométricos .....                                 | 21 |
| 4.2. Densidade Estrutural Hepática.....                      | 25 |
| 4.3. Morfometria hepática .....                              | 28 |
| 4.4. Histoquímica hepática.....                              | 30 |
| 5 – Discussão.....                                           | 32 |
| 6 – Conclusão .....                                          | 34 |
| 7 – Resultados Suplementares .....                           | 34 |
| 8 – Tabelas e figura complementares .....                    | 36 |
| 9 – Referências .....                                        | 39 |

---

Texto elaborado consoante às normas do Periódico Anatomical Record  
(ISSN 1932-8494).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01:** Divisão dos dados em conjuntos e subconjuntos para as análises estatísticas.

**Tabela 02:** Média e respectivos erro padrão da média ( $\pm$ ) para os dados biométricos da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

**Tabela 03:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) para o índice de massa escalonada (IMC) e índice hepatossomático (IHS) da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

**Tabela 04:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) da densidade volumétrica estrutural hepática da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

**Tabela 5:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) da morfometria hepática da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

**Tabela 6:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) das análises de pigmentos hepáticos (hemossiderina, lipofuscina e melanina) e glicogênio da espécie *Dendropsophus minutus*. Os resultados estão apresentados em média (%)  $\pm$  erro padrão da média.

**Tabela 07:** Resultados das análises estatísticas dos dados biométricos. Os resultados incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor  $z$  e valor  $p$ .

**Tabela 08:** Resultados das análises estatísticas dos dados de densidade volumétrica estrutural. Os resultados incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor  $z$  e valor  $p$ .

**Tabela 09:** Resultados das análises estatísticas dos dados de morfometria hepática. Os resultados incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor  $z$  e valor  $p$ .

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Fotomicrografia do tecido hepático de *D. minutus* evidenciando os hepatócitos (1) e seus núcleos (2), melanomacrófagos (3), sinusóides (4), ducto biliar (5) e vaso sanguíneo (6). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Escala: 10  $\mu$ m.

**Figura 02.** *Dendropsophus minutus*.

**Figura 03.** Cortes histológicos do fígado de *D. minutus* demonstrando (setas), o glicogênio (A), melanomacrófagos/melanina (B), lipofuscina (C) e hemosiderina (D). Coloração: (A) PAS, (B) HE, (C) solução de Schmorl e (D) solução ácida de ferrocianeto. Escala: (A) 10  $\mu$ m, (B, C e D) 25  $\mu$ m.

**Figura 04.** Distribuição mensal do percentual relativo de variáveis biométricas da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) – Comprimento rostro-cloacal (cm), (B) – Massa corpórea (g), (C) – Índice de massa escalonada e (D) – Índice hepatossomático.

**Figura 05.** (A) Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrado a distribuição estacional do conjunto de dados biométricos de espécies *Dendropsophus minutus* (B): Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

**Figura 06.** Distribuição mensal do percentual relativo da densidade estrutural hepática da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) - (Melanomacrófagos, (B) - Hepatócitos, (C) - Sinusoides, (D) - Vasos sanguíneos e (E) - Ductos biliares, (E).

**Figura 07.** (A): Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrado a distribuição estacional do conjunto de dados de densidade estrutural hepática de espécies *Dendropsophus minutus*. (B): Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo,

demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

**Figura 08.** Distribuição mensal do percentual relativo da Morfometria Celular da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) - Área do Hepatócito,  $\mu\text{m}^2$ , (B) -, Área do núcleo,  $\mu\text{m}^2$ , (C) - Volume do hepatócito,  $\mu\text{m}^3$ , (D) - Volume do núcleo,  $\mu\text{m}^3$  e (E) - Relação núcleo citoplasma (RNC).

**Figura 09.** (A): Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrando a distribuição estacional do conjunto de dados da morfometria hepática de espécies *Dendropsophus minutus*. (B): Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

**Figura 10.** Distribuição mensal do percentual relativo ( $\mu\text{m}^2$ ) das Análises Histoquímicas da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) - Melanina, (B) - Lipofusцина, (C) - Hemossiderina e (D) – Glicogênio.

**Figura 11.** (A): Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrando a distribuição estacional do conjunto de dados de histoquímica de espécies *Dendropsophus minutus*. Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

**Figura 12.** Resultado do modelo de mínimos quadrados parciais (two-block Partial Least Squares, PLS) mostrando a associação entre Dados Biométricos e a Densidade Volumétrica Estrutural.

**Figura 13.** Resultado do modelo de mínimos quadrados parciais (two-block Partial Least Squares, PLS) mostrando a associação entre Densidade Volumétrica Estrutura e Morfometria Celular.

**Figura complementar 01.** Representação gráfica de Temperatura (eixo primário em C°), Índice de Radiação IUV (eixo primário em intensidade de radiação) e Umidade (eixo secundário em %) coletadas no período de outubro de 2015 a outubro de 2016.

## 1 - Resumo

O fígado dos vertebrados é uma glândula responsável pelo processamento e armazenamento de nutrientes, e está envolvido no catabolismo e anabolismo de substâncias, bem como em processos relacionados à detoxificação de poluentes e outros agentes tóxicos. Em anuros, a morfologia dos componentes hepáticos mostra-se diferentes entre algumas espécies. Os anuros possuem em seu tecido hepático células pigmentadas denominadas melanomacrófagos que acumulam quantidades variáveis de melanina, lipofuscina e hemossiderina, além de glicogênio, um polissacarídeo energético acumulado no citoplasma. O objetivo deste estudo foi analisar a estrutura hepática, bem como os pigmentos e o conteúdo de glicogênio em *Dendropsophus minutus*, pertencente à família Hylidae, coletados ao longo de um ano. Foram analisados dados biométricos (massa corporal, comprimento rostro-cloacal, índice de massa escalonada e índice hepatossomático), estereométricos (densidade volumétrica estrutural hepática) e histométricos (área e volume celulares e nucleares dos hepatócitos), além dos conteúdos de glicogênio e pigmentos do MMC. Os resultados mostraram diferenças significativas nas análises biométricas (massa e comprimento rostro-cloacal), enquanto heterogeneidade foi observada para a massa escalonada e índices hepatossomáticos. A densidade dos hepatócitos foi menor nos meses mais quentes e úmidos (entre novembro e março), em contraste com a densidade sinusoidal, que foi maior nos meses de verão, juntamente com a densidade de ductos biliares. A morfometria hepatocelular apresentou maior área e volume celular e nuclear nos meses de maio e abril (frio e seco). As análises histoquímicas não mostraram diferença anual significativa. Portanto, podemos concluir que os componentes hepáticos de *Dendropsophus minutus* aqui estudados são influenciados pela variação sazonal ao longo de um ano.

**Palavras-chave:** Anfíbios, Biometria, Melanomacrófagos, Pigmentação, Glicogênio, Sazonalidade.

## 2 – Introdução

O fígado é o principal órgão de metabolismo do corpo (Saleh, 1982; Braunbeck et al., 1990), sendo fundamental na síntese e processamento de substâncias a serem utilizadas por outros órgãos, além de atuar como reserva de nutrientes e no processo de detoxificação de poluentes e outros agentes tóxicos (Bucke et al., 1984; Romer e Pearson, 1985; Junqueira e Carneiro, 1999; Hildebrand e Goslow, 2006; Akiyoshi e Inoue, 2012).

Em anuros, o fígado é dividido em 2-3 lobos hepáticos, de formato alongado, revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo (Duellman e Trueb, 1999; Franco-Belussi et al., 2012). Morfologicamente, as características quanto ao arranjo e disposição dos lobos são diferentes entre as espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Romer e Pearson, 1985). Em geral, o parênquima do órgão é composto por células poliédricas, os hepatócitos, que estão dispostos em placas simples ou estratificadas (Elias, 1955; Romer e Pearson, 1985; Ross e Romrell, 1993; Akiyoshi e Inoue, 2012).

Os hepatócitos são circundados por sinusóides, que estão em contato com ductos biliares e vasos sanguíneos (Figura 1), formando – ou não – arranjo em tríades (Akiyoshi e Inoue, 2012; Franco-Belussi et al., 2012). Os anuros ainda possuem células pigmentares denominadas melanomacrófagos (MMCs), que atuam na fagocitose, detoxificação e destruição de materiais endógenos e exógenos (Agius e Roberts, 2003; Akiyoshi e Inoue, 2012). Os MMCs acumulam quantidades variáveis de pigmentos, sendo eles: melanina, lipofuscina e hemosiderina (Agius e Agbede, 1984; Herráez e Zapata, 1986, 1991).

A melanina é um polímero complexo (Césarini, 1996), que tem a capacidade de neutralizar radicais livres, cátions e outros compostos tóxicos (Zuasti et al., 1989; Agius e Roberts, 2003). Para animais ectotérmicos, a melanina também possui função bactericida, devido à atuação do peróxido de hidrogênio em conjunto com enzimas (Christiansen et al., 1996). Estudos demonstram que o aumento da quantidade de melanina está associado com a hemocaterese e com alterações metabólicas e estruturais das células hepáticas (Kalashnikova, 1992; Barni et al., 1999).

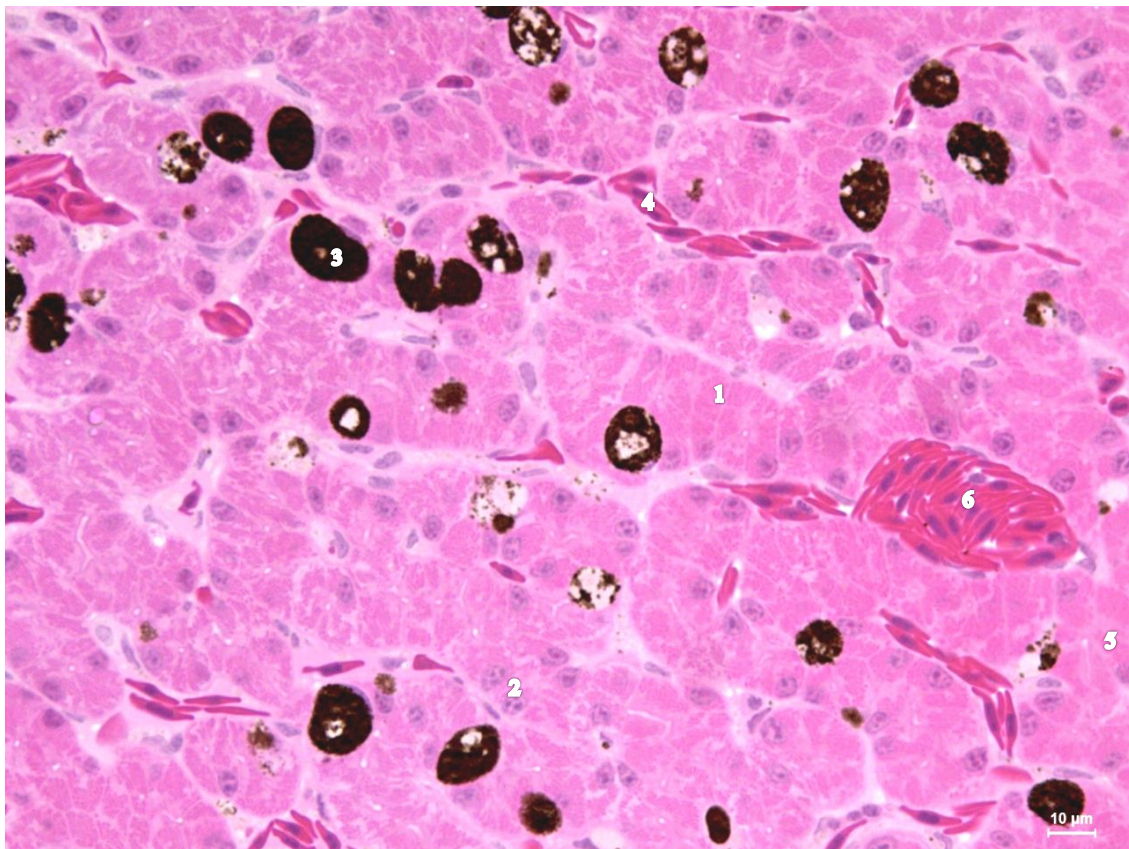
A lipofuscina é um derivado da polimerização oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, que se acumula ao longo do tempo, não sendo oxidada ou alterada com a ação de enzimas lisossomais (Pickford, 1953; Terman e Brunk, 2004). A degradação natural das mitocôndrias e proteínas contendo ferro, pelos lisossomos, reage com o peróxido de hidrogênio, resultando em radicais de hidroxila que podem estabelecer relações com materiais lisossômicos, formando a lipofuscina ou degradando a membrana lisossomal – o que leva a apoptose (Terman e Brunk, 2004; Kurz, 2008). Níveis elevados de lipofuscina podem indicar um acúmulo de estruturas celulares danificadas e uma maior sensibilidade celular ao estresse oxidativo, devido à afinidade dessa molécula com metais pesados (e.g. cobre e ferro) (Terman e Brunk, 2004; De Oliveira et al., 2017).

A hemossiderina é caracterizada como um complexo férrico agregado no citoplasma, sendo um produto da degradação da hemoglobina (Oliveira e Franco-Belussi, 2012; Ross e Romrell, 1993). A hemossiderina é gerada a partir da saturação de íons de ferro que se ligam às proteínas e se acumulam nas células na forma de grânulos (Granick, 1949). Fatores ambientais podem alterar a quantidade desse pigmento no fígado, indicando um distúrbio na reconstituição das hemácias (Pérez-Iglesias et al., 2016; De Oliveira et al., 2017; Franco-Belussi et al., 2020).

O fígado atua na quebra de nutrientes absorvidos pelo sistema digestório, podendo acumular glicogênio (reserva energética), proveniente de açúcares simples, para ser liberado na corrente sanguínea conforme a necessidade (Romer e Pearson, 1985). A utilização do glicogênio como fonte de energia é controlada pela homeostase entre sua síntese, glicogênese, e sua degradação, glicogenólise (Carlos et al., 2014). A ciclagem de energia pode ser reduzida em muitos animais, dependendo de condições ambientais adversas (mudanças sazonais), o que está relacionado a mudanças no perfil metabólico (Fenoglio et al., 1992; Guppy, 2004).

De acordo com Kiss et al. (2009), as espécies de anuros que permanecem ativas durante as estações do ano podem adaptar suas fisiologias, com destaque para as adaptações relacionadas a temperatura, precipitação e disponibilidade de alimentos (Chang e Hou, 2005). Essas

adaptações podem provocar alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas no parênquima hepático (Farrar e Frye, 1977), o que pode levar a uma alteração nos pigmentos presentes nos MMCs ou na quantidade de glicogênio armazenado. Dessa forma, o objetivo deste estudo é utilizar ferramentas morfométricas, histométricas e histoquímicas para avaliar o tecido hepático de *Dendropsophus minutus* em busca de alterações sazonais, durante um período anual de coletas.



**Figura 1** – Fotomicrografia do tecido hepático de *D. minutus* evidenciando os hepatócitos (1) e seus núcleos (2), melanomacrófagos (3), sinusóides (4), ducto biliar (5) e vaso sanguíneo (6). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Escala: 10 µm.

### 3 - Material e Métodos

#### 3.1 – Espécie de estudo.

*Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae) (Peters, 1872) (Figura 2) é caracterizada por um focinho arredondado, dorso de tonalidade marrom a amarelo-brilhante (noite) ou marrom-avermelhado (dia), podendo apresentar um par de listras dorso-laterais, e ventre de cor branca na fêmea e amarela no

macho. A espécie tem distribuição ao longo da Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela. *D. minutus* também se estende por vários biomas brasileiros, incluindo Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica (AmphibiaWeb, 2023; Frost, 2023).



**Figura 2 – *Dendropsophus minutus*.**

### **3.2 - Coleta de espécimes**

Sessenta e oito espécimes (machos adultos) foram coletados semanalmente, por busca ativa durante o período noturno, na região rural de São José do Rio Preto – SP, Brasil (20°53'57.3"S, 49°21'00.8"W) durante o período de 04/2016 a 03/2017. Dados de precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e radiação ultravioleta (Figura complementar 1) foram coletados junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (<http://www.inmet.gov.br/portal/>) e ao Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (<https://www.cptec.inpe.br/cidades/previsao.do>).

A permissão de coleta foi emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (IBAMA, nº18573-2). O manejo dos animais seguiu as diretrizes da “American Veterinary Medical Association” (AVMA) e os procedimentos experimentais estão de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 34/2017).

### 3.3 - Análise biométrica

Após as coletas, os espécimes foram encaminhados para o Laboratório de Anatomia Comparada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), sendo imediatamente eutanasiados em solução de benzocaína e dissecados para a retirada do fígado. Dados biométricos de cada animal, como: comprimento rostro-cloacal (cm), massa corpórea (g) e massa do fígado (g) foram mensurados em paquímetro digital (cm) e em balança analítica de precisão (g), sendo utilizados para calcular o índice de massa escalonada (Eq. 1) – utilizado para estimar a condição corporal dos espécimes (Peig e Green, 2009) – e o índice hepatossomático (Eq. 2).

$$SMI = M_i \left[ \frac{L_0}{L_i} \right]^{b_{SMA}} \quad (1)$$

$$IHS = \left( \frac{M_f}{M_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde  $M_i$  representa a massa corporal,  $M_f$  a massa do fígado,  $L_i$  o comprimento rostro-cloacal,  $L_0$  a média do comprimento dos espécimes e  $b$  a inclinação da regressão do eixo principal padronizada, que foi calculada utilizando o pacote *lmodel2* (Legendre, 2018) no software R.

### 3.4 - Processamento histológico

Para as análises histológicas foram utilizados fragmentos transversais da região central do parênquima hepático imediatamente após a eutanásia. Os fragmentos foram fixados em solução de Karnovsky (tampão fosfato 0,1 mol l<sup>-1</sup> pH 7,2, contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2,5%) a 4° C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada por uma hora para iniciar a desidratação em série alcoólica crescente, com inclusão em historesina (Leica Historesin Embedding Kit) segundo Franco Belussi, *et al.* (2016). Foram utilizadas 20 secções de 2µm de espessura feitas em micrótomo rotativo (Leica RM 2265) para as análises da densidade volumétrica estrutural, morfometria hepatocelular, quantificação de glicogênio e pigmentos hepáticos (melanina, lipofuscina e hemossiderina).

### 3.5 - Densidade volumétrica estrutural

Para essa análise, as secções histológicas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) e fotografadas em microscópio de luz (Leica DM 4000B) com um sistema de captura de imagens (Leica DFC 280). Em 5 campos aleatórios (400x) por espécime foi empregada uma gradícula digital com 252 intersecções, que foram utilizadas para estimar os percentuais de hepatócitos, sinusóides, melanomacrófagos, vasos sanguíneos e ductos biliares. A seguinte equação (Eq. 3) foi utilizada para estimar o percentual ocupado por cada estrutura:

$$DVT = \left[ \frac{It}{Tit} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde *It* representa o número de intersecções onde a estrutura esta localizada e *Tit* o número total de intersecções. Essa análise foi realizada no software ImageJ 1.48, segundo Leão et al. (2020).

### 3.6 - Morfometria hepática

Para essa análise, foram utilizados 10 campos histológicos (1000x), corados em HE, obtidos no mesmo equipamento descrito anteriormente (ver item 3.5.). Em cada imagem foram mensurados 5 hepatócitos ao acaso, obtendo assim as medidas de: área ( $\mu\text{m}^2$ ), perímetro ( $\mu\text{m}$ ) e diâmetro maior e menor ( $\mu\text{m}$ ) do citoplasma e do núcleo – 8 medidas ao todo. A partir dessas medidas foi calculada a relação núcleo/citoplasma (Eq. 4), o volume nuclear (Eq. 5), o volume do hepatócito (Eq. 6) e a circularidade nuclear (Eq. 7)

$$Ranc = \left[ \frac{An}{Ac} \right] \times 100 \quad (4)$$

$$Vn = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (5)$$

$$Vh = \frac{(Ah \times Vn)}{An} \quad (6)$$

$$C = 4\pi \left( \frac{An}{P^2} \right) \quad (7)$$

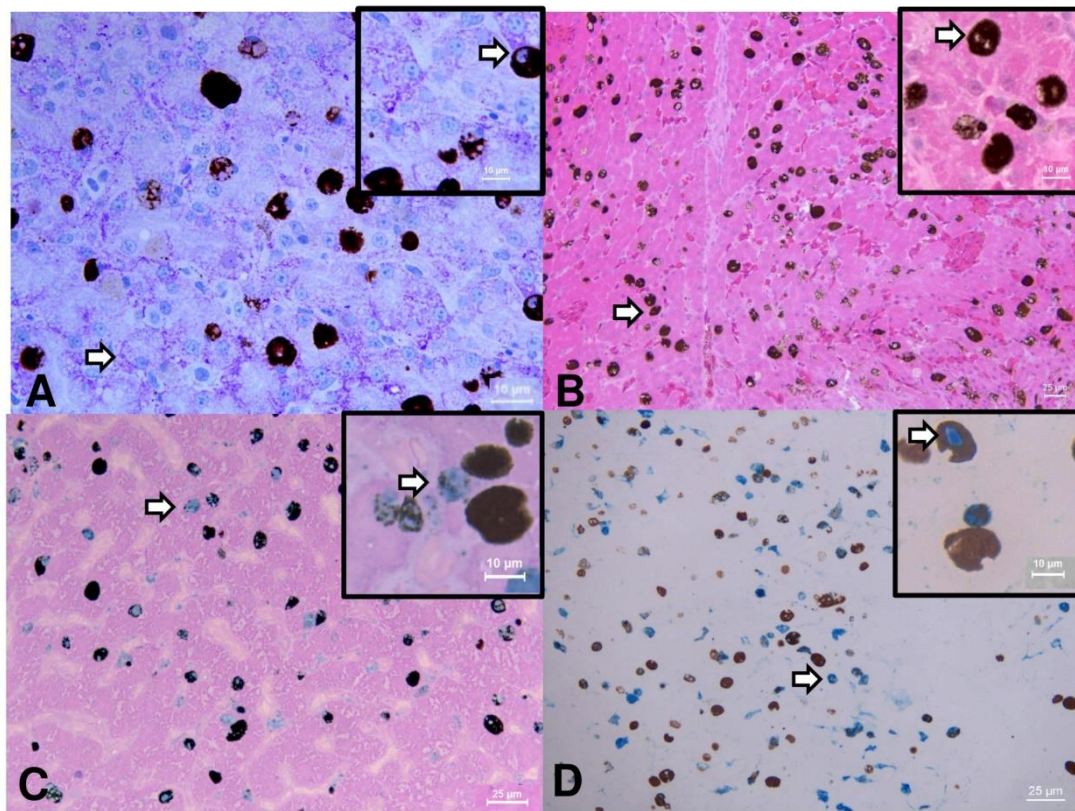
Onde  $An$  representa a área do núcleo,  $Ac$  a área do citoplasma,  $r$  o raio do núcleo,  $Ah$  a área do hepatócito e  $P$  o perímetro do núcleo. Essas mensurações foram conduzidas no software Motic 2.0, segundo Leão et al. (2020).

### 3.7. Quantificação de glicogênio e pigmentos hepáticos

Para quantificar o glicogênio (Figura 3A), foi utilizada a coloração histoquímica PAS (Ácido Periódico de Schiff). As secções histológicas foram incubadas em ácido periódico (0.5%) por 40 minutos a 60°C, coradas com o reativo de Schiff por 90 minutos a 60°C e contracoradas em hematoxilina por 3 minutos. As lâminas foram fotografadas em microscopia de luz, sendo analisados 5 campos aleatórios (400x) por espécime.

Para a análise do conteúdo de melanina (Figura 3B), lipofuscina (Figura 3C) e hemosiderina (Figura 3D), secções histológicas foram coradas, respectivamente, em HE, solução de Schmorl e solução ácida de ferrocianeto, segundo Franco-Belussi et al. (2013). Na análise de lipofuscina, as lâminas foram encubadas em solução de Schmorl (75 mL de cloreto férrico a 1%, 10 mL de ferricianeto de potássio e 15 mL de água destilada) por 25 minutos e contracoradas em vermelho neutro 1% e em solução aquosa de eosina 1%. Para a detecção de hemossiderina, as secções foram encubadas em solução ácida de ferrocianeto (2 g de ferrocianeto de potássio em 100 mL de ácido clorídrico 0.75 mol.L<sup>-1</sup>) e contracoradas em vermelho neutro 1% e em solução aquosa de eosina 1%. Para quantificar os pigmentos hepáticos, 25 campos histológicos (200x) por espécime foram fotografados em microscopia de luz.

Todas as análises foram realizadas no software Image-Pro Plus 6.0, a partir da diferença na intensidade de coloração, sendo fornecida a área ( $\mu\text{m}^2$ ) ocupada pelo glicogênio e pelos pigmentos.



**Figura 03:** Cortes histológicos do fígado de *D. minutus* demonstrando (setas), o glicogênio (A), melanomacrófagos/melanina (B), lipofuscina (C) e hemosiderina (D). Coloração: (A) PAS, (B) HE, (C) solução de Schmorl e (D) solução ácida de ferrocianeto. Escala: (A) 10 µm, (B, C e D) 25 µm.

### 3.8 – Estatísticas

Para as análises estatísticas, as variáveis foram divididas em quatro conjuntos (Tabela 1). Para cada conjunto de dados, foi realizada uma série de análises exploratórias. Primeiramente, foi plotado a distribuição de densidade de cada variável ao longo dos meses, utilizando o pacote *ggridges* (Wilke, 2021) e *ggplot2* (Wickham e Springer-Verlag, 2016). Com isso foi possível visualizar como a distribuição dos dados variam ao longo do tempo (i.e. meses de coleta). Em seguida, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando uma matriz de correlação, a fim de ordenar e reduzir a dimensionalidade dos dados. Essa análise foi realizada utilizando o pacote *stats* e visualizada com o *factoMiner*.

A partir das análises exploratórias, foi testado o efeito do mês sobre cada conjunto de dados (descritos pelos eixos da PCA), utilizando o *One-Way*

MANOVA no pacote *RRPP* (Collyer e Adams, 2018). Essa análise utiliza um procedimento de aleatorização de resíduos para ajustar modelos lineares a dados multivariados. Para visualizar os resultados foi utilizado um diagrama de ordenação de PCA em que os centróides dos meses foram plotados, sendo ligados por setas indicando a mudança do fenótipo ao longo do tempo. Também testamos a associação entre blocos de variáveis utilizando um modelo de mínimos quadrados parciais de dois blocos (*PLS – two-block Partial Least Squares*), sendo testada a associação entre: (1) Densidade estrutural hepática e Análises biométricas, (2) Densidade estrutural hepática e Morfometria celular, (3) Morfometria celular e Análises biométricas. Por fim, os modelos de *PLS* foram comparados para testar se o tamanho do efeito entre eles diferia significativamente, utilizando o pacote *geomorph* (Adams et al., 2021).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team 2021).

**Tabela 1** – Divisão dos dados em conjuntos e subconjuntos para as análises estatísticas.

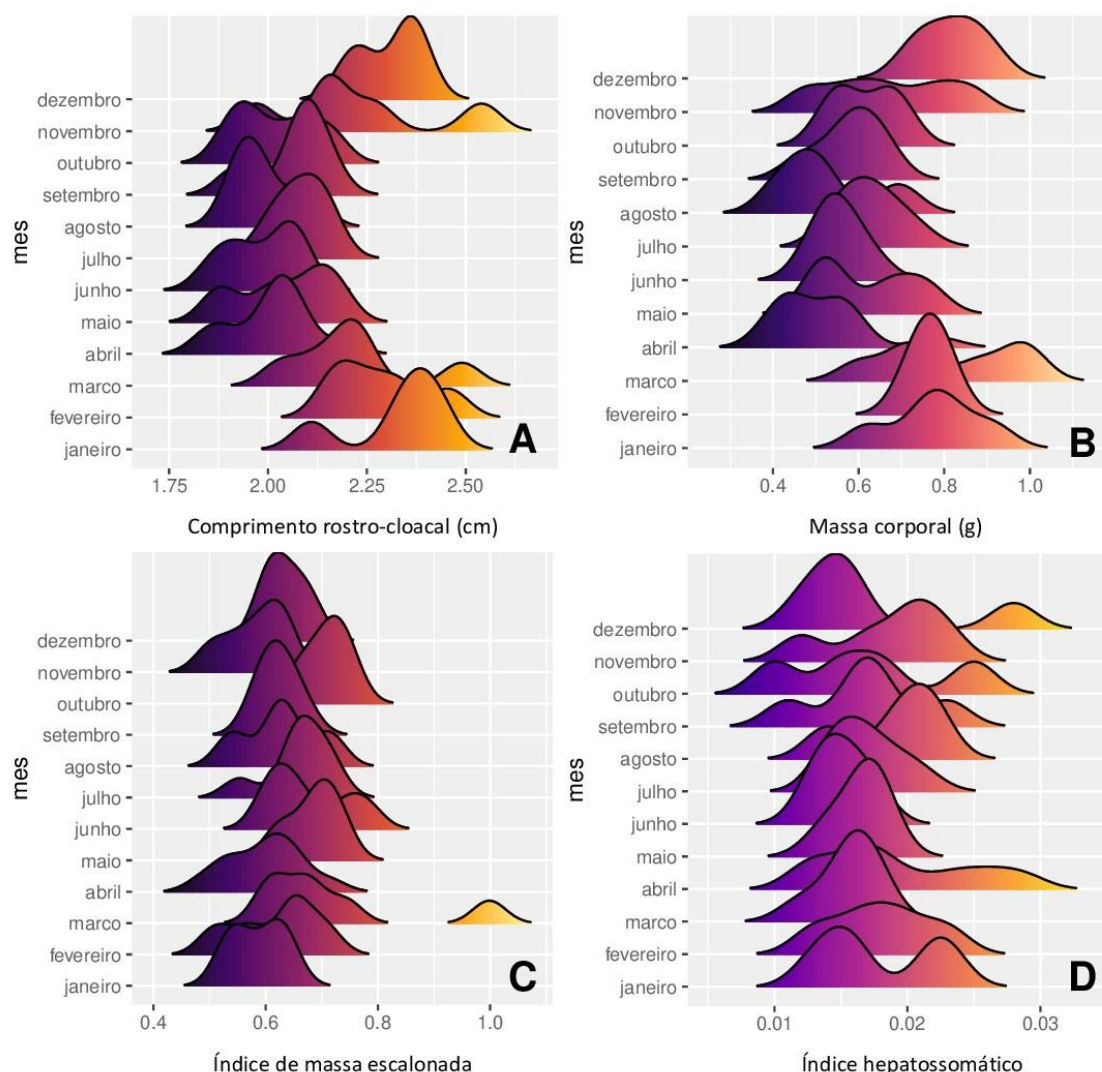
| Conjunto                      | Subconjunto                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Dados biométricos             | Massa, comprimento rostro-cloacal, SMI e IHS                                  |
| Densidade estrutural hepática | Hepatócitos, sinusóides, melanomacrófagos, vasos sanguíneos e ductos biliares |
| Morfometria hepática          | Razão núcleo/citoplasma e área/volume celular e nuclear                       |
| Histoquímica                  | Glicogênio, melanina, lipofuscina e hemosiderina.                             |

## 4 – Resultados

### 4.1. Dados biométricos

As análises biométricas mostraram diferenças significativas ao se tratar do comprimento rostro-cloacal e massa corporal (Figura 04 – A e B, respectivamente). Já para os Índices de Massa Escalonada (SMI) e Índice

Hepatossomático (IHS) foi observado uma heterogeneidade nos resultados (Figura 04 - C e D respectivamente).



**Figura 04:** Distribuição mensal do percentual relativo de variáveis biométricas da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) – Comprimento rostro-cloacal (cm), (B) – Massa corpórea (g), (C) – Índice de massa escalonada e (D) – Índice hepatossomático.

Foi observada diferença significativa nos dados biométricos de comprimento rostro-cloacal e massa corporal quando comparados nos meses mais quentes aos meses mais frios (Figura complementar 1).

No mês de agosto, por exemplo, um dos meses de inverno (seco e frio, Figura complementar 1), os animais apresentaram um tamanho corporal aproximado de  $1,99 \text{ cm} \pm 0,059$ , enquanto em meses de verão como janeiro (chuvoso e quente, Figura complementar 1), o tamanho aproximado foi de  $2,33$

cm  $\pm$  0,048 (Tabela 2). Ou seja, os animais, em média, são 17% menores na estação seca e fria.

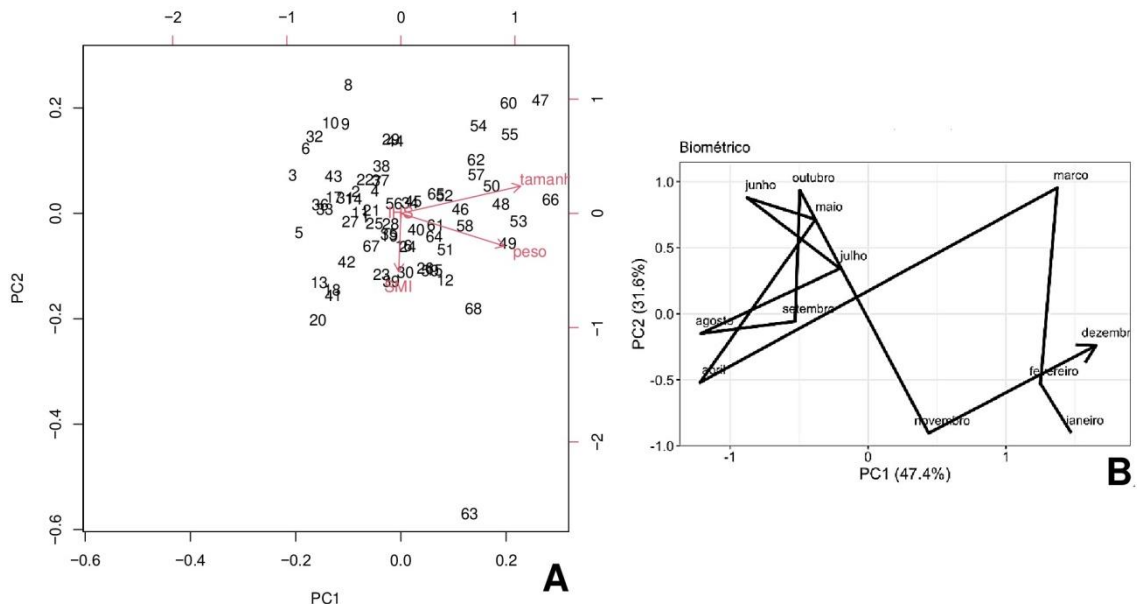
Em relação ao comprimento rostro-cloacal, assim como para a massa corporal, houve diferença significativa entre os meses mais quentes e úmidos em relação aos meses frios e secos. Em abril, a massa corporal foi de aproximadamente 0.51 g  $\pm$  0,031. Já os animais coletados em dezembro apresentam maior massa corporal, atingindo aproximadamente 0.81 g  $\pm$  0,032 em média, ou seja, apresentaram um aumento de 58,8% na massa corporal (Tabela 2).

**Tabela 02:** Média e respectivos erro padrão da média ( $\pm$ ) para os dados biométricos da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

| MÊS       | MASSA (g)         | COMPRIMENTO(cm)   |
|-----------|-------------------|-------------------|
| Abril     | 0,516 $\pm$ 0,031 | 2,009 $\pm$ 0,031 |
| Maio      | 0,618 $\pm$ 0,058 | 2,043 $\pm$ 0,058 |
| Junho     | 0,554 $\pm$ 0,020 | 1,985 $\pm$ 0,020 |
| Julho     | 0,627 $\pm$ 0,025 | 2,083 $\pm$ 0,025 |
| Agosto    | 0,527 $\pm$ 0,059 | 1,990 $\pm$ 0,059 |
| Setembro  | 0,580 $\pm$ 0,032 | 2,068 $\pm$ 0,032 |
| Outubro   | 0,616 $\pm$ 0,036 | 2,020 $\pm$ 0,036 |
| Novembro  | 0,670 $\pm$ 0,068 | 2,218 $\pm$ 0,068 |
| Dezembro  | 0,817 $\pm$ 0,032 | 2,308 $\pm$ 0,032 |
| Janeiro   | 0,777 $\pm$ 0,048 | 2,330 $\pm$ 0,048 |
| Fevereiro | 0,766 $\pm$ 0,013 | 2,286 $\pm$ 0,013 |
| Março     | 0,814 $\pm$ 0,065 | 2,215 $\pm$ 0,065 |

De forma geral, as variáveis que mais contribuíram para o diagrama de ordenação foram o comprimento rostro-cloacal e a massa corporal que se apresentaram positivamente correlacionadas com PC1 e IMC negativamente correlacionado com PC2 (Figura 5 - A). Esse padrão pode ser visualizado na Figura 05 – B onde observamos a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Os resultados das análises biométricas que

incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor z e valor *p* podem ser observados na Tabela complementar 07.



**Figura 05.** (A) Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrando a distribuição estacional do conjunto de dados biométricos de espécies *Dendropsophus minutus* (B): Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

Já o IHS, não foram encontradas diferenças significativas para a espécie ao longo do ano. O IHS mantém uma constância no ritmo circanual, registrando um mínimo de 0,016 g em maio e máximo de 0,019 em alguns meses como em novembro, por exemplo, (Tabela 3).

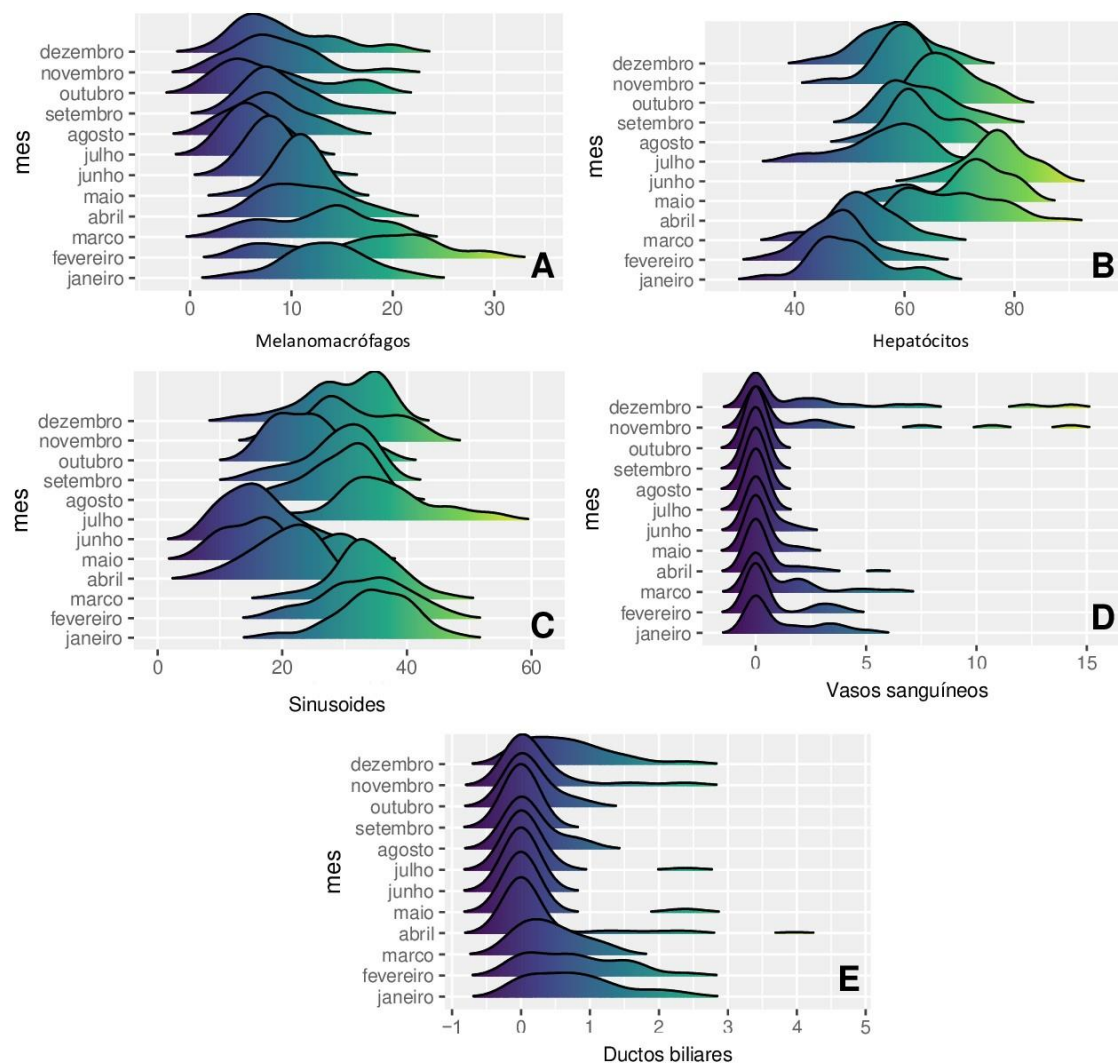
**Tabela 03:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) para o índice de massa escalonada (IMC) e índice hepatossomático (IHS) da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

| MÊS   | IMC               | IHS               |
|-------|-------------------|-------------------|
| Abril | 0,127 $\pm$ 0,005 | 0,019 $\pm$ 0,002 |
| Maio  | 0,147 $\pm$ 0,006 | 0,016 $\pm$ 0,001 |
| Junho | 0,141 $\pm$ 0,004 | 0,015 $\pm$ 0,001 |

|           |               |               |
|-----------|---------------|---------------|
| Julho     | 0,144 ± 0,004 | 0,017 ± 0,001 |
| Agosto    | 0,132 ± 0,010 | 0,019 ± 0,002 |
| Setembro  | 0,135 ± 0,004 | 0,017 ± 0,002 |
| Outubro   | 0,150 ± 0,002 | 0,017 ± 0,003 |
| Novembro  | 0,135 ± 0,005 | 0,019 ± 0,002 |
| Dezembro  | 0,153 ± 0,003 | 0,017 ± 0,003 |
| Janeiro   | 0,143 ± 0,004 | 0,018 ± 0,002 |
| Fevereiro | 0,147 ± 0,005 | 0,018 ± 0,002 |
| Março     | 0,166 ± 0,012 | 0,016 ± 0,001 |

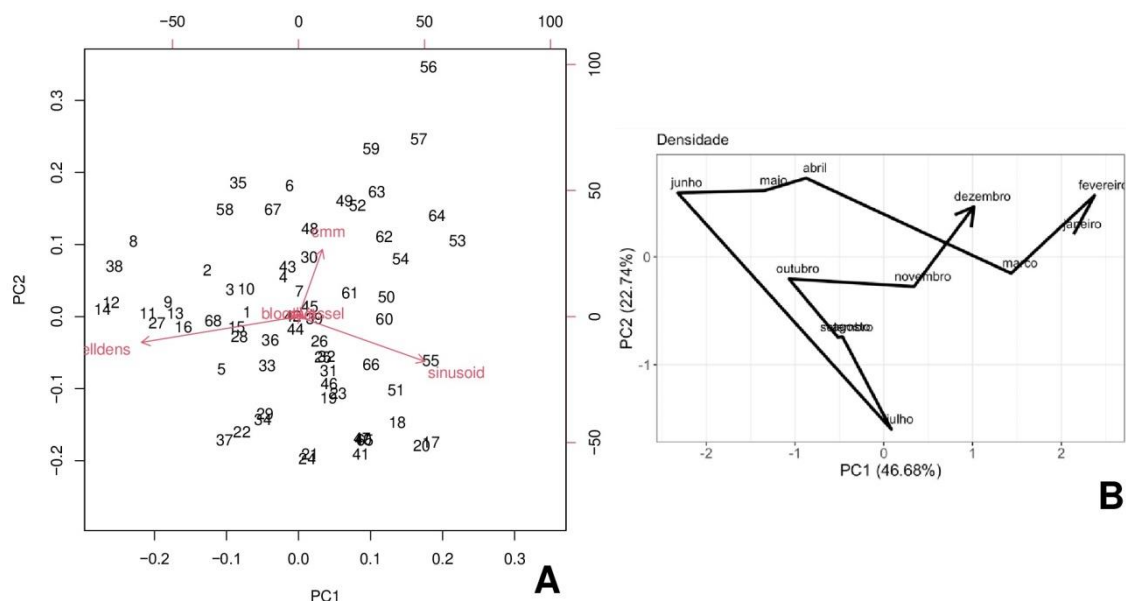
#### 4.2. Densidade Estrutural Hepática

A densidade dos hepatócitos foi inferior nos meses mais quentes e úmidos em relação aos meses mais frios e secos. Esses valores contrastam com a densidade sinusoidal a qual foi maior nos meses de verão em relação ao inverno (Figura 06 – B e C respectivamente). Os vasos sanguíneos e os ductos biliares seguiram o mesmo padrão dos sinusoides e MMCs que apresentaram uma maior proporção nos meses mais quentes e úmidos (Figura 06 – D e E, respectivamente).



**Figura 06:** Distribuição mensal do percentual relativo da densidade estrutural hepática da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) - (Melanomacrófagos, (B) - Hepatócitos, (C) - Sinusoides, (D) - Vasos sanguíneos e (E) - Ductos biliares, (E).

As análises de ordenação de densidade (Figura 7 – A) mostraram que as variáveis que mais contribuíram para a ordenação foram os sinusoides que se apresentaram negativamente correlacionado com PC2 e positivamente correlacionado com PC1, os MMCs estiveram positivamente correlacionado com PC2 e os hepatócitos negativamente correlacionado com PC1. Podemos observar Figura 07 - B a trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Os dados de média e erro padrão mensal está representada na Tabela 4. Os resultados das análises de Densidade volumétrica estrutural que incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor z e valor *p* podem ser observados na Tabela complementar 08.



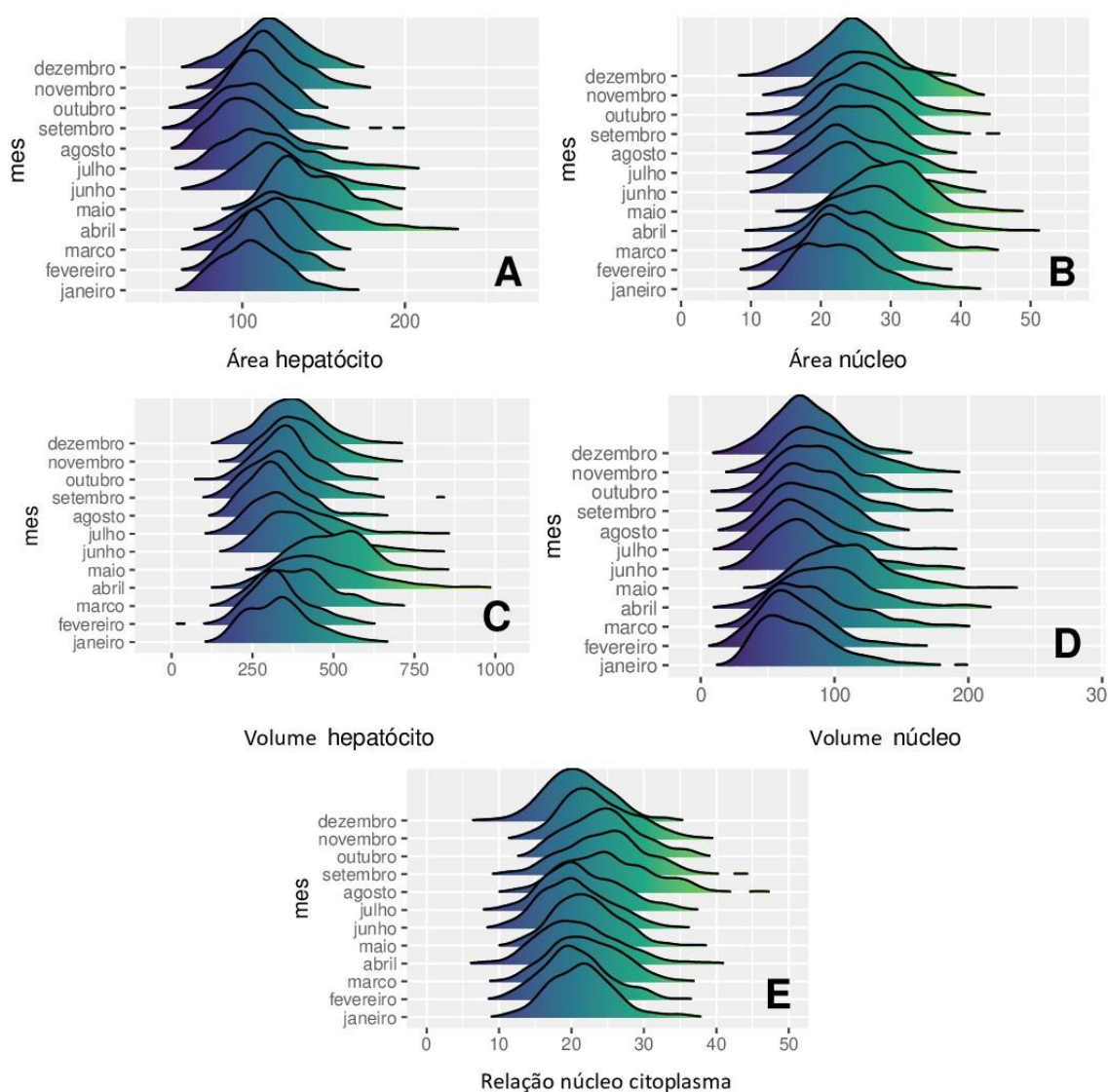
**Figura 07.** (A): Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrando a distribuição estacional do conjunto de dados de densidade estrutural hepática de espécies *Dendropsophus minutus*. (B): Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

**Tabela 04:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) da densidade volumétrica estrutural hepática da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

| MÊS       | HEPATÓCITOS        | SINUSOIDES         | VASOS SANGÜÍNEOS  | MMCs               | DUCTOS BILIARES   |
|-----------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Abril     | 68,399 $\pm$ 1,878 | 20,218 $\pm$ 1,276 | 0,370 $\pm$ 0,216 | 11,250 $\pm$ 0,935 | 0,244 $\pm$ 0,115 |
| Maio      | 70,714 $\pm$ 3,724 | 18,888 $\pm$ 3,713 | 0,158 $\pm$ 0,097 | 10,595 $\pm$ 0,749 | 0,119 $\pm$ 0,119 |
| Junho     | 76,746 $\pm$ 2,140 | 15,171 $\pm$ 1,893 | 0,185 $\pm$ 0,101 | 7,896 $\pm$ 0,199  | 0,000 $\pm$ 0,000 |
| Julho     | 58,060 $\pm$ 2,703 | 35,657 $\pm$ 2,361 | 0,011 $\pm$ 0,011 | 6,179 $\pm$ 0,582  | 0,090 $\pm$ 0,070 |
| Agosto    | 63,060 $\pm$ 2,013 | 29,126 $\pm$ 2,117 | 0,000 $\pm$ 0,000 | 7,678 $\pm$ 1,338  | 0,138 $\pm$ 0,110 |
| Setembro  | 62,520 $\pm$ 1,715 | 28,746 $\pm$ 1,181 | 0,000 $\pm$ 0,000 | 8,730 $\pm$ 1,336  | 0,000 $\pm$ 0,000 |
| Outubro   | 67,720 $\pm$ 1,439 | 24,047 $\pm$ 2,023 | 0,000 $\pm$ 0,000 | 8,115 $\pm$ 2,775  | 0,119 $\pm$ 0,120 |
| Novembro  | 59,400 $\pm$ 0,840 | 30,412 $\pm$ 2,843 | 1,841 $\pm$ 1,460 | 8,111 $\pm$ 1,298  | 0,238 $\pm$ 0,184 |
| Dezembro  | 58,174 $\pm$ 1,139 | 29,682 $\pm$ 1,933 | 2,365 $\pm$ 0,821 | 9,126 $\pm$ 1,838  | 0,650 $\pm$ 0,145 |
| Janeiro   | 49,968 $\pm$ 1,796 | 34,761 $\pm$ 1,827 | 1,158 $\pm$ 0,371 | 13,333 $\pm$ 1,435 | 0,777 $\pm$ 0,258 |
| Fevereiro | 48,158 $\pm$ 1,627 | 33,412 $\pm$ 2,023 | 0,650 $\pm$ 0,285 | 17,015 $\pm$ 2,647 | 0,761 $\pm$ 0,171 |
| Março     | 52,341 $\pm$ 1,707 | 33,597 $\pm$ 1,129 | 1,031 $\pm$ 0,134 | 12,605 $\pm$ 1,993 | 0,423 $\pm$ 0,081 |

### 4.3. Morfometria hepática

Dentre os dados de morfometria hepática foram observadas diferenças significativas entre os meses analisados. Observou maior área e volume celular e nuclear nos meses de maio e abril em relação aos outros meses (Figura 08 – A, B, C, D). Já a relação núcleo citoplasma permaneceu homogênea durante o ciclo anual (Figura 08 – E). A média e erro padrão mensal está representado na tabela 5.

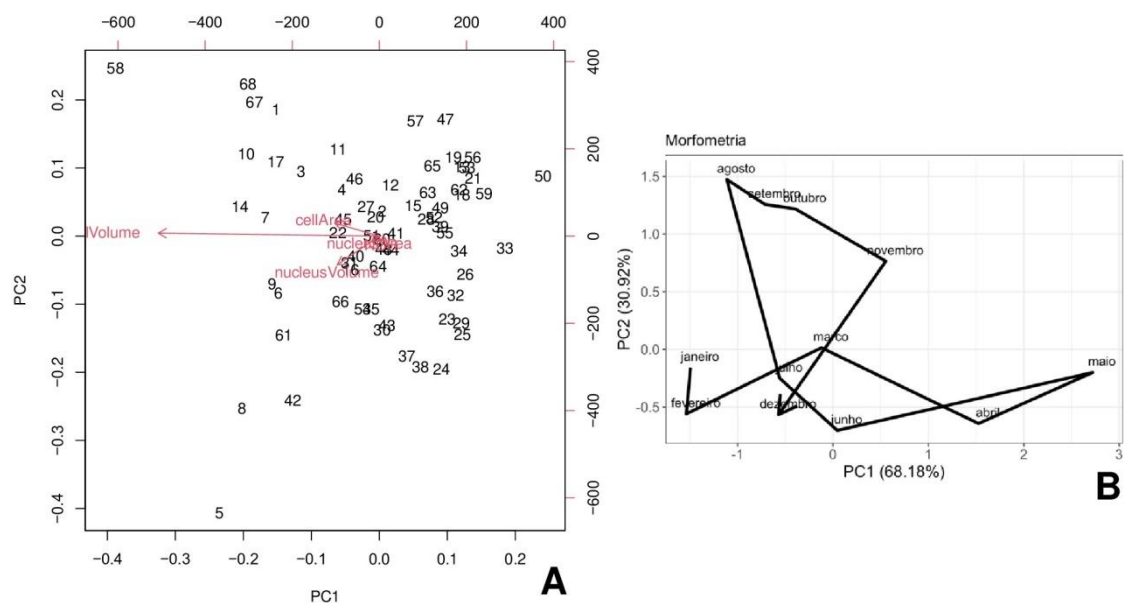


**Figura 08:** Distribuição mensal do percentual relativo da Morfometria Celular da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) - Área do Hepatócito,  $\mu\text{m}^2$ , (B) -, Área do núcleo,  $\mu\text{m}^2$ , (C) - Volume do hepatócito,  $\mu\text{m}^3$ , (D) - Volume do núcleo,  $\mu\text{m}^3$  e (E) - Relação núcleo citoplasma (RNC).

**Tabela 5:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) da morfometria hepática da espécie *Dendropsophus minutus* de acordo com o mês de captura.

| MÊS       | ÁREA<br>HEPATÓCITO  | ÁREA<br>NUCLEAR    | VOLUME<br>HEPATÓCITO | VOLUME<br>NUCLEAR  | RNC                |
|-----------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| Abril     | 133,577 $\pm$ 5,481 | 27,323 $\pm$ 0,936 | 462,458 $\pm$ 23,269 | 96,118 $\pm$ 5,310 | 21,050 $\pm$ 0,959 |
| Maio      | 138,231 $\pm$ 4,221 | 29,872 $\pm$ 1,019 | 501,597 $\pm$ 06,454 | 109,87 $\pm$ 6,834 | 21,915 $\pm$ 1,154 |
| Junho     | 122,892 $\pm$ 6,273 | 24,933 $\pm$ 1,294 | 399,921 $\pm$ 28,845 | 82,713 $\pm$ 6,400 | 20,620 $\pm$ 0,436 |
| Julho     | 116,758 $\pm$ 6,730 | 24,492 $\pm$ 1,318 | 364,000 $\pm$ 26,295 | 77,909 $\pm$ 5,688 | 21,518 $\pm$ 0,759 |
| Agosto    | 101,182 $\pm$ 2,615 | 24,776 $\pm$ 1,044 | 321,131 $\pm$ 08,809 | 79,832 $\pm$ 3,855 | 25,074 $\pm$ 1,426 |
| Setembro  | 105,520 $\pm$ 5,408 | 25,430 $\pm$ 1,051 | 338,088 $\pm$ 26,380 | 82,402 $\pm$ 5,778 | 24,628 $\pm$ 0,607 |
| Outubro   | 107,405 $\pm$ 2,739 | 26,008 $\pm$ 1,089 | 349,728 $\pm$ 17,500 | 85,974 $\pm$ 5,512 | 24,465 $\pm$ 0,658 |
| Novembro  | 117,491 $\pm$ 4,276 | 27,461 $\pm$ 1,772 | 390,285 $\pm$ 22,237 | 92,541 $\pm$ 8,212 | 23,582 $\pm$ 0,891 |
| Dezembro  | 117,562 $\pm$ 3,618 | 24,091 $\pm$ 1,243 | 372,659 $\pm$ 19,679 | 77,253 $\pm$ 5,433 | 20,814 $\pm$ 0,802 |
| Janeiro   | 106,316 $\pm$ 5,419 | 22,595 $\pm$ 1,695 | 334,865 $\pm$ 30,602 | 72,514 $\pm$ 8,623 | 21,423 $\pm$ 0,652 |
| Fevereiro | 110,365 $\pm$ 3,395 | 22,526 $\pm$ 0,887 | 330,610 $\pm$ 17,496 | 68,984 $\pm$ 4,638 | 20,628 $\pm$ 0,695 |
| Março     | 116,518 $\pm$ 3,611 | 25,435 $\pm$ 1,563 | 379,547 $\pm$ 24,914 | 84,382 $\pm$ 8,123 | 21,945 $\pm$ 0,688 |

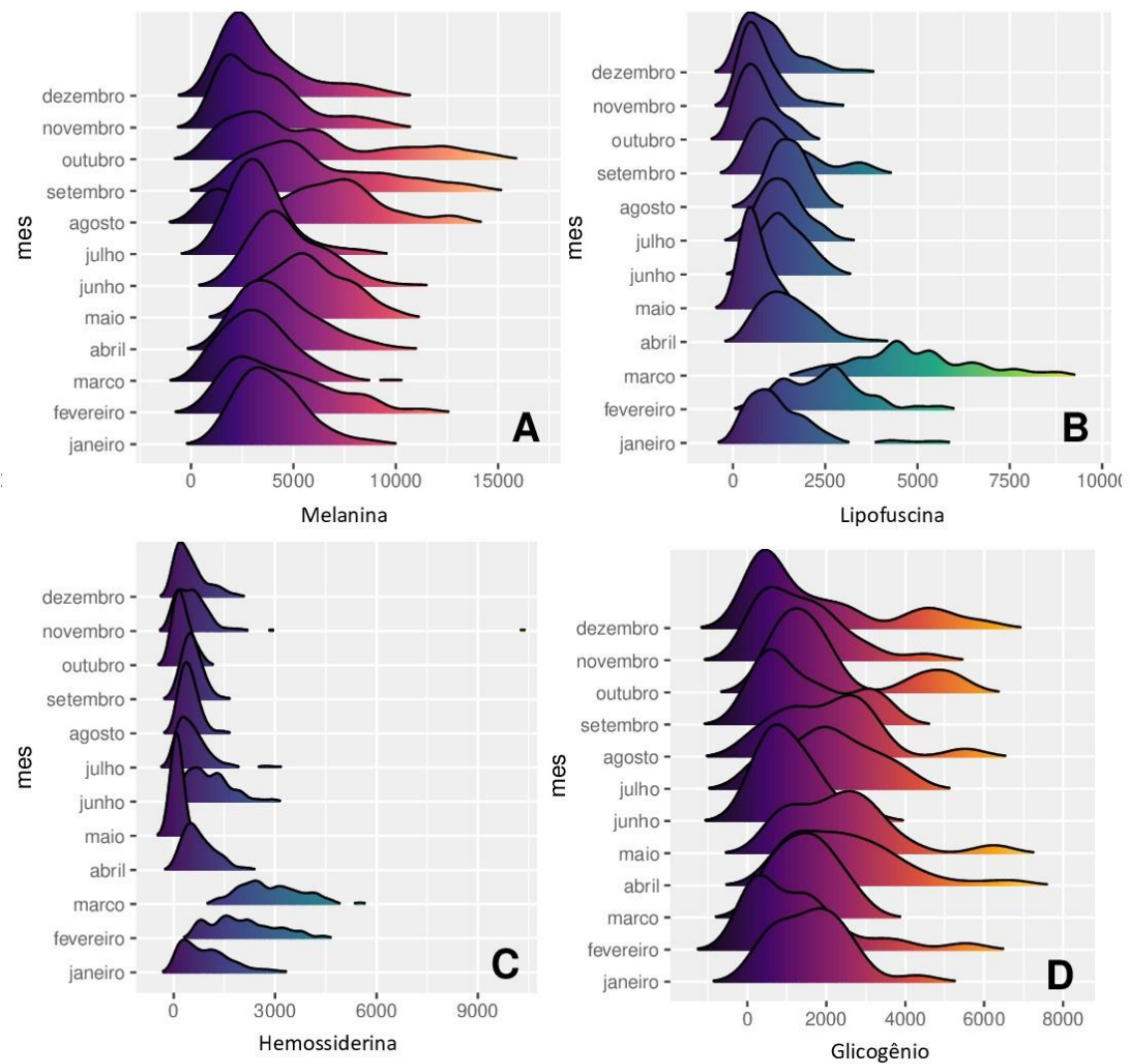
As variáveis que mais contribuíram para a ordenação em relação a morfometria celular foram o volume celular que correlacionou-se negativamente com PC1 e positivamente com PC2 além do volume, negativamente correlacionado com PC2. Para morfometria, o fator mês que demonstrou cerca de 47% da variância dos dados, e as diferenças se deram entre os meses de abril e maio em relação aos outros meses (Figura 09 - A). A análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados pode ser observada na figura 09 – B. Os resultados das análises de morfometria celular que incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor  $z$  e valor  $p$  podem ser observados na Tabela complementar 09.



**Figura 09.** (A): Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrando a distribuição estacional do conjunto de dados da morfometria hepática de espécies *Dendropsophus minutus*. (B): Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

#### 4.4. Histoquímica hepática

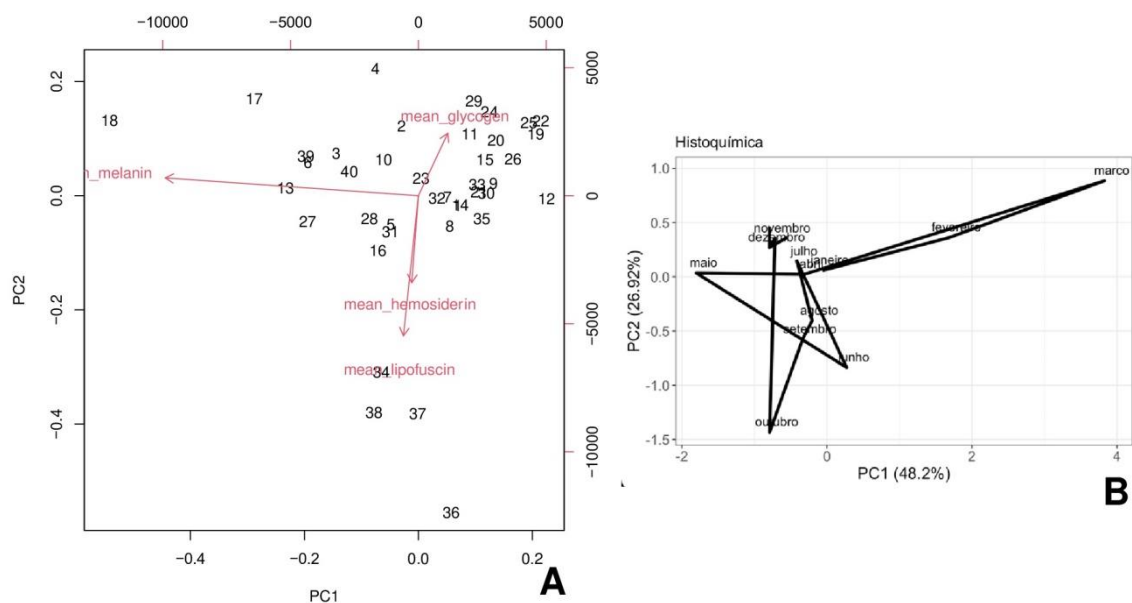
As análises histoquímicas não apresentaram diferença anual significativa. Foi observada heterogeneidade nos dados ao longo dos meses (Figura 10). As análises de melanina aparecem negativamente correlacionado com PC2, os pigmentos lipofuscina e hemossiderina se mostram negativamente correlacionados com PC1 e o glicogênio, de forma bem discreta, aparece positivamente correlacionado com PC2 (Figura 11 – A). Porém a análise de trajetória de mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados mostra os centroides de fevereiro e março bem distantes do restante dos meses (Figura 11 - B). Os dados de média e erro padrão estão representados na Tabela 6.



**Figura 10.** Distribuição mensal do percentual relativo ( $\mu\text{m}^2$ ) das Análises Histoquímicas da espécie *Dendropsophus minutus*, (A) - Melanina, (B) - Lipofusцина, (C) - Hemossiderina e (D) – Glicogênio.

**Tabela 6:** Média e respectivos erros padrões da média ( $\pm$ ) das análises de pigmentos hepáticos (hemossiderina, lipofuscina e melanina) e glicogênio da espécie *Dendropsophus minutus*. Os resultados estão apresentados em média (%)  $\pm$  erro padrão da média.

| ESTAÇÃO   | HEMOSSIDERINA     | LIPOFUSCINA       | MELANINA          | GLICOGÊNIO        |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Outono    | 0,285 $\pm$ 0,042 | 0,792 $\pm$ 0,080 | 1,521 $\pm$ 0,089 | 6,612 $\pm$ 0,718 |
| Inverno   | 0,205 $\pm$ 0,030 | 0,791 $\pm$ 0,083 | 1,537 $\pm$ 0,184 | 5,868 $\pm$ 0,808 |
| Primavera | 0,197 $\pm$ 0,048 | 0,468 $\pm$ 0,080 | 1,317 $\pm$ 0,222 | 5,348 $\pm$ 1,158 |
| Verão     | 0,675 $\pm$ 0,125 | 1,485 $\pm$ 0,330 | 1,245 $\pm$ 0,127 | 4,693 $\pm$ 0,587 |



**Figura 11:** (A): Componentes principais (PC1 e PC2) demonstrando a distribuição estacional do conjunto de dados de histoquímica de espécies *Dendropsophus minutus*. Análise de trajetória mostrando a mudança temporal no fenótipo médio de cada compartimento dos dados. Note que cada conjunto de dados possui uma dinâmica diferente ao longo do tempo, demonstrando atrasos (*delays*) em relação à resposta ao ambiente. Números indicam os espécimes.

## 5 – Discussão

As diferenças nas análises biométricas (massa corporal e comprimento rostro-cloacal) podem ser explicadas por fatores como a estação reprodutiva da espécie, que ocorre entre outubro e fevereiro (Provete et al., 2011). Assim, os animais avaliados nos meses de abril a outubro podem ser juvenis, ou seja, ainda não atingiram a idade reprodutiva e, por isso, possuem um tamanho

corporal menor e uma menor massa; enquanto aqueles avaliados de novembro a fevereiro são machos adultos em atividade de forrageamento para a reprodução. Oliveira et al. (2007) também encontraram uma variação anual no tamanho corporal de *D. minutus*, o que pode estar associado com a disponibilidade de alimentos, competição por recursos, fatores climáticos e condições bióticas. Em nosso trabalho, não foi observada uma diferença nos índices de massa escalonada e hepatossomático. Chaves et al. (2017) avaliando anuros na região nordeste do Brasil observaram uma variação no *SMI* devido às mudanças climáticas; enquanto que Gondim et al. (2020) observaram diferenças no *IHS* em regiões áridas e semi-áridas ao se tratar do distúrbio agrícola. Portanto, podemos propor que as diferenças nesses índices estão relacionadas a um determinado estressor e a tendência de ocorrer alterações pode diferir entre indivíduos e populações de diferentes localidades.

As adaptações no tecido hepático (aumento de hepatócitos e diminuição de vasos sanguíneos, ductos biliares, sinusóides e melanomacrófagos) e nos hepatócitos (aumento da área e volume celular e nuclear) podem estar relacionadas a fatores como: dieta, metabolismo, maturidade sexual, infecções, variações ambientais e contaminação por xenobióticos (Scapin e Giuseppe, 1994; Gisbert et al., 2008; Bolla et al., 2011; Franco-Belussi et al., 2012; Fanali et al., 2017; Leão et al., 2020); sendo que a diferença na densidade dos melanomacrófagos nos meses mais quentes e úmidos pode estar relacionada a uma maior capacidade do sistema imune do animal, em resposta às variáveis climáticas que caracterizam esta estação (UV, temperatura e pluviosidade).

Na literatura não há trabalhos relacionados com a morfometria hepática anual dos anuros, no entanto, um estudo relatou variações fisiológicas em cinco espécies coletadas em ambientes naturais (Leão et al., 2020). De acordo com esses autores, os organismos apresentam potenciais metabólicos distintos, o que pode influenciar no volume dos hepatócitos. Dessa forma, podemos sugerir que a maior proporção de área e volume celular e nuclear, nos meses de maio e abril, pode ter ocorrido devido ao aumento do índice de chuvas, que proporcionam uma maior diversidade alimentar.

Estudos *in vivo* com *Physalaemus nattereri* evidenciaram diferenças na proporção dos pigmentos melanina, hemossiderina e lipofuscina no tecido

hepático após tratamento envolvendo estresse térmico (Santos et al., 2014). Porém, em nosso estudo não foi observada uma variação, provavelmente devido ao clima da região de coleta de *D. minutus*, que não sofre mudanças drásticas, o que não afeta a produção desses pigmentos. Também não foram observadas alterações significativas no acúmulo de glicogênio durante as estações. Estudos atestam que em área tropicais e subtropicais muitas espécies de anuros mantêm níveis de atividade ao longo do ano (Kiss et al., 2009; De Amaral et al., 2022), como a espécie *Brachycephalus pitanga*, um forrageador ativo que mantém dieta constante durante todo o ano (De Oliveira e Haddad, 2015). *D. minutus* ocorre todo o ano, visto que os indivíduos foram coletados em todos os meses durante plena atividade de vocalização. Portanto, é esperado que não haja alteração no padrão do glicogênio, tendo em vista que ele está relacionado com a alimentação.

## **6 – Conclusão**

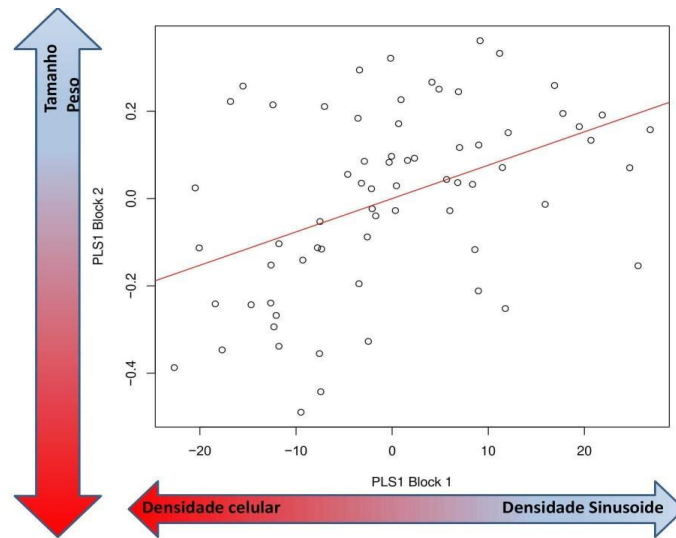
A trajetória temporal das variáveis foi bastante diferente entre os módulos fenotípicos, porém novembro até março se destacaram dos restantes para os dados biométricos, de densidade volumétrica estrutural e de morfometria celular. No entanto, existem algumas exceções. Por exemplo, para a densidade volumétrica estrutural não só aqueles meses se destacaram, mas também abril até julho; e para morfometria hepatocelular, em que apenas abril e maio se destacaram do restante. Portanto podemos concluir que cada módulo estudado é influenciado de forma diferente em relação a sazonalidade, mesmo ao se tratar da região estudada que não apresenta variações bruscas nos elementos climáticos, como temperatura, umidade e IUUV (Figura complementar 1).

## **7 – Resultados Suplementares**

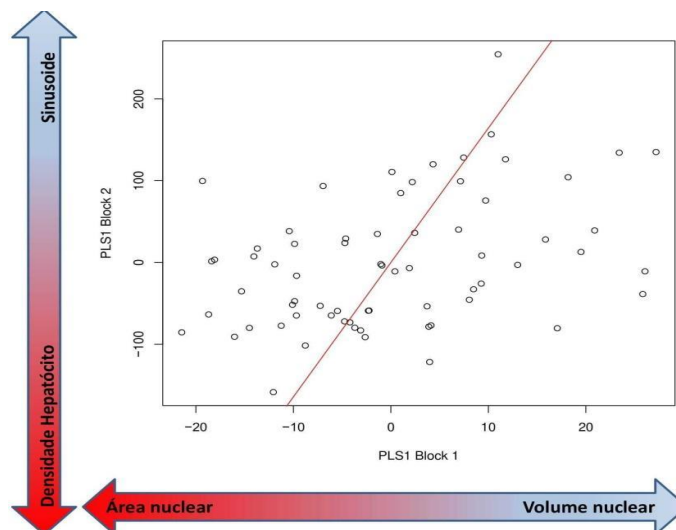
Por fim, a densidade foi associada com variáveis biométricas ( $r$ -PLS = 0.438; tamanho do efeito = 3.060;  $P$  = 0.002), e também com morfometria celular ( $r$ -PLS = 0.393; tamanho do efeito = 2.726;  $P$  = 0.002), mas não há

diferença significativa entre os tamanhos de efeito dos dois modelos (diferença par-a-par = 0.226;  $P = 0.82$ ; figuras 12 e 13).

No entanto, a morfometria dos hepatócitos não foi associada com variáveis biométricas ( $r$ -PLS = 0.245; tamanho do efeito = 1.379;  $P = 0.083$ ). Portanto, parece existir uma integração fenotípica entre densidade dos componentes teciduais e morfometria do hepatócito e variáveis biométricas do indivíduo.

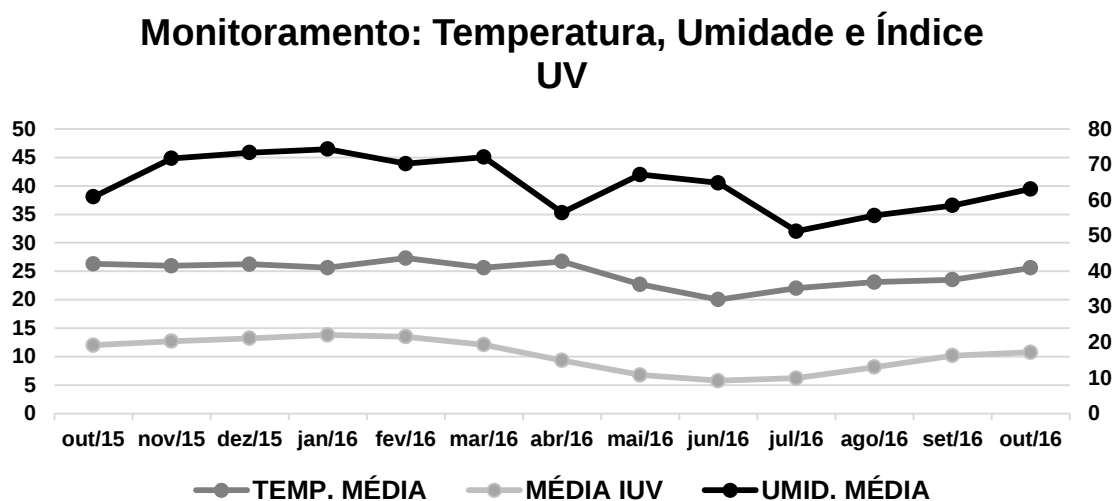


**Figura 12:** Resultado do modelo de mínimos quadrados parciais (two-block Partial Least Squares, PLS) mostrando a associação entre Dados Biométricos e a Densidade Volumétrica Estrutural.



**Figura 13:** Resultado do modelo de mínimos quadrados parciais (two-block Partial Least Squares, PLS) mostrando a associação entre Densidade Volumétrica Estrutura e Morfometria Celular.

## 8 – Tabelas e figura complementares



**Figura complementar 01.** Representação gráfica de Temperatura (eixo primário em C°), Índice de Radiação IUV (eixo primário em intensidade de radiação) e Umidade (eixo secundário em %) coletadas no período de outubro de 2015 a outubro de 2016.

**Tabela 07:** Resultados das análises estatísticas dos dados biométricos. Os resultados incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor z e valor  $p$ .

| MESES                | CONT<br>R. | SE<br>(CONTR.) | VALOR<br>DE Z | VALOR<br>DE $p$ |
|----------------------|------------|----------------|---------------|-----------------|
| Janeiro : Abril      | 0,41       | 0,22           | 3,08          | 0,001           |
| Janeiro : Maio       | 0,34       | 0,28           | 2,14          | 0,016           |
| Janeiro : Junho      | 0,42       | 0,26           | 2,76          | 0,002           |
| Janeiro : Julho      | 0,29       | 0,25           | 2,02          | 0,015           |
| Janeiro : Agosto     | 0,42       | 0,29           | 2,44          | 0,004           |
| Janeiro : Setembro   | 0,32       | 0,25           | 2,12          | 0,018           |
| Janeiro : Outubro    | 0,37       | 0,28           | 2,23          | 0,013           |
| Janeiro : Novembro   | 0,15       | 0,27           | 0,55          | 0,287           |
| Janeiro : Dezembro   | 0,06       | 0,26           | -0,71         | 0,748           |
| Fevereiro : Março    | 0,13       | 0,26           | 0,32          | 0,369           |
| Fevereiro : Abril    | 0,37       | 0,22           | 2,79          | 0,002           |
| Fevereiro : Maio     | 0,29       | 0,28           | 1,73          | 0,038           |
| Fevereiro : Junho    | 0,37       | 0,25           | 2,51          | 0,005           |
| Fevereiro : Julho    | 0,24       | 0,24           | 1,70          | 0,046           |
| Fevereiro : Agosto   | 0,38       | 0,28           | 2,31          | 0,005           |
| Fevereiro : Setembro | 0,28       | 0,26           | 1,88          | 0,032           |
| Fevereiro : Outubro  | 0,31       | 0,28           | 1,81          | 0,034           |
| Fevereiro : Novembro | 0,12       | 0,26           | 0,12          | 0,454           |
| Fevereiro : Dezembro | 0,05       | 0,26           | -0,91         | 0,816           |
| Março : Abril        | 0,38       | 0,22           | 2,99          | 0,001           |
| Março : Maio         | 0,26       | 0,26           | 1,56          | 0,058           |
| Março : Junho        | 0,35       | 0,24           | 2,44          | 0,006           |

|                     |      |      |       |       |
|---------------------|------|------|-------|-------|
| Março : Julho       | 0,23 | 0,23 | 1,65  | 0,049 |
| Março : Agosto      | 0,37 | 0,26 | 2,46  | 0,004 |
| Março : Setembro    | 0,29 | 0,25 | 1,91  | 0,023 |
| Março : Outubro     | 0,27 | 0,26 | 1,73  | 0,041 |
| Março : Novembro    | 0,19 | 0,24 | 1,13  | 0,129 |
| Março : Dezembro    | 0,12 | 0,25 | 0,28  | 0,385 |
| Abril : Maio        | 0,13 | 0,24 | 0,46  | 0,338 |
| Abril : Junho       | 0,08 | 0,21 | -0,01 | 0,506 |
| Abril : Julho       | 0,14 | 0,20 | 0,92  | 0,193 |
| Abril : Agosto      | 0,03 | 0,24 | -1,33 | 0,904 |
| Abril : Setembro    | 0,09 | 0,22 | -0,10 | 0,553 |
| Abril : Outubro     | 0,14 | 0,24 | 0,62  | 0,275 |
| Abril : Novembro    | 0,26 | 0,22 | 1,97  | 0,022 |
| Abril : Dezembro    | 0,42 | 0,22 | 3,21  | 0,001 |
| Maio : Junho        | 0,08 | 0,27 | -0,38 | 0,635 |
| Maio : Julho        | 0,04 | 0,27 | -1,10 | 0,851 |
| Maio : Agosto       | 0,12 | 0,30 | -0,09 | 0,548 |
| Maio : Setembro     | 0,07 | 0,29 | -0,63 | 0,728 |
| Maio : Outubro      | 0,03 | 0,29 | -1,61 | 0,947 |
| Maio : Novembro     | 0,21 | 0,27 | 1,00  | 0,173 |
| Maio : Dezembro     | 0,33 | 0,28 | 2,09  | 0,013 |
| Junho : Julho       | 0,12 | 0,24 | 0,36  | 0,365 |
| Junho : Agosto      | 0,05 | 0,27 | -0,99 | 0,839 |
| Junho : Setembro    | 0,10 | 0,24 | -0,12 | 0,561 |
| Junho : Outubro     | 0,07 | 0,27 | 0,53  | 0,701 |
| Junho : Novembro    | 0,27 | 0,25 | 1,84  | 0,033 |
| Junho : Dezembro    | 0,41 | 0,24 | 2,80  | 0,003 |
| Julho : Dezembro    | 0,29 | 0,25 | 2,08  | 0,017 |
| Agosto : Setembro   | 0,09 | 0,27 | -0,30 | 0,604 |
| Agosto : Outubro    | 0,12 | 0,31 | 0,00  | 0,504 |
| Agosto : Novembro   | 0,27 | 0,27 | 1,55  | 0,050 |
| Agosto : Dezembro   | 0,43 | 0,28 | 2,74  | 0,001 |
| Setembro : Outubro  | 0,10 | 0,29 | -0,16 | 0,568 |
| Setembro : Novembro | 0,17 | 0,25 | 0,86  | 0,215 |
| Setembro : Dezembro | 0,33 | 0,27 | 2,18  | 0,009 |
| Outubro : Novembro  | 0,24 | 0,28 | 1,33  | 0,096 |
| Outubro : Dezembro  | 0,35 | 0,28 | 2,15  | 0,011 |

**Tabela 08:** Resultados das análises estatísticas dos dados de densidade volumétrica estrutural. Os resultados incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor z e valor *p*.

| MESES              | CONTR. | SE<br>(CONTR.) | VALOR DE<br>Z | VALOR DE<br><i>p</i> |
|--------------------|--------|----------------|---------------|----------------------|
| Janeiro : Abril    | 23,58  | 12,74          | 3,18          | 0,001                |
| Janeiro : Maio     | 26,29  | 16,21          | 2,80          | 0,001                |
| Janeiro : Junho    | 33,64  | 14,94          | 3,56          | 0,001                |
| Janeiro : Julho    | 10,92  | 14,39          | 1,04          | 0,156                |
| Janeiro : Agosto   | 15,38  | 16,41          | 1,44          | 0,071                |
| Janeiro : Setembro | 14,72  | 15,07          | 1,59          | 0,056                |
| Janeiro : Outubro  | 21,42  | 16,39          | 2,27          | 0,010                |
| Janeiro : Novembro | 11,65  | 15,00          | 1,06          | 0,150                |
| Janeiro : Dezembro | 10,59  | 15,09          | 0,90          | 0,200                |

|                      |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Fevereiro : Março    | 6,10  | 14,04 | -0,00 | 0,500 |
| Fevereiro : Abril    | 24,84 | 12,50 | 3,26  | 0,001 |
| Fevereiro : Maio     | 27,59 | 16,23 | 2,94  | 0,002 |
| Fevereiro : Junho    | 35,12 | 14,56 | 3,79  | 0,001 |
| Fevereiro : Julho    | 14,87 | 14,47 | 1,70  | 0,038 |
| Fevereiro : Agosto   | 18,11 | 15,76 | 1,88  | 0,027 |
| Fevereiro : Setembro | 17,25 | 14,75 | 1,97  | 0,026 |
| Fevereiro : Outubro  | 23,45 | 16,39 | 2,47  | 0,007 |
| Fevereiro : Novembro | 14,70 | 15,00 | 1,57  | 0,057 |
| Fevereiro : Dezembro | 13,39 | 16,02 | 1,35  | 0,092 |
| Março : Abril        | 20,95 | 11,70 | 2,93  | 0,001 |
| Março : Maio         | 23,63 | 15,50 | 2,59  | 0,004 |
| Março : Junho        | 30,95 | 14,10 | 3,49  | 0,001 |
| Março : Outubro      | 18,68 | 15,75 | 2,07  | 0,015 |
| Março : Novembro     | 9,98  | 14,02 | 0,70  | 0,257 |
| Março : Dezembro     | 7,95  | 14,06 | 0,48  | 0,323 |
| Abril : Maio         | 2,75  | 13,73 | -1,14 | 0,865 |
| Abril : Junho        | 10,31 | 12,22 | 1,25  | 0,112 |
| Abril : Julho        | 19,26 | 11,93 | 2,75  | 0,001 |
| Abril : Agosto       | 10,99 | 14,25 | 1,13  | 0,123 |
| Abril : Setembro     | 10,66 | 12,77 | 1,27  | 0,096 |
| Abril : Outubro      | 5,01  | 13,67 | -0,29 | 0,626 |
| Abril : Novembro     | 14,03 | 12,99 | 1,82  | 0,037 |
| Abril : Dezembro     | 14,23 | 13,05 | 1,93  | 0,032 |
| Maio : Junho         | 7,58  | 15,60 | 0,18  | 0,418 |
| Maio : Julho         | 21,46 | 15,84 | 2,31  | 0,005 |
| Maio : Agosto        | 13,11 | 17,95 | 1,04  | 0,153 |
| Maio : Setembro      | 12,95 | 16,02 | 1,20  | 0,126 |
| Maio : Outubro       | 6,46  | 17,61 | -0,18 | 0,572 |
| Maio : Novembro      | 16,42 | 16,41 | 1,66  | 0,050 |
| Maio : Dezembro      | 16,76 | 16,24 | 1,74  | 0,043 |
| Junho : Julho        | 27,78 | 13,69 | 3,28  | 0,001 |
| Junho : Agosto       | 19,55 | 16,73 | 2,07  | 0,011 |
| Junho : Setembro     | 19,67 | 14,68 | 2,29  | 0,008 |
| Junho : Outubro      | 12,66 | 16,01 | 1,13  | 0,131 |
| Junho : Novembro     | 23,15 | 14,76 | 2,78  | 0,003 |
| Junho : Dezembro     | 23,70 | 14,71 | 2,93  | 0,002 |
| Julho : Agosto       | 8,35  | 15,94 | 0,42  | 0,352 |
| Julho : Setembro     | 8,61  | 13,97 | 0,60  | 0,276 |
| Julho : Outubro      | 15,22 | 15,17 | 1,67  | 0,048 |

**Tabela 09:** Resultados das análises estatísticas dos dados de morfometria hepática. Os resultados incluem o contraste, erro padrão (SE) do contraste, valor z e valor p.

| MESES             | CONTR. | SE<br>(CONTR.) | VALOR<br>DE Z | VALOR<br>DE p |
|-------------------|--------|----------------|---------------|---------------|
| Janeiro : Abril   | 132,67 | 85,80          | 2,46          | 0,002         |
| Janeiro : Maio    | 173,97 | 107,33         | 2,54          | 0,002         |
| Fevereiro : Abril | 136,68 | 83,81          | 2,52          | 0,002         |
| Fevereiro : Maio  | 178,15 | 107,16         | 2,61          | 0,001         |
| Março : Abril     | 85,48  | 75,16          | 1,78          | 0,027         |
| Março : Maio      | 126,63 | 109,39         | 1,95          | 0,023         |
| Abril : Julho     | 101,57 | 74,82          | 2,22          | 0,006         |
| Abril : Agosto    | 145,98 | 86,54          | 2,54          | 0,002         |

|                  |        |        |      |       |
|------------------|--------|--------|------|-------|
| Abril : Setembro | 128,29 | 81,98  | 2,54 | 0,003 |
| Abril : Outubro  | 116,22 | 88,95  | 2,10 | 0,008 |
| Abril : Novembro | 74,07  | 81,29  | 1,44 | 0,073 |
| Abril : Dezembro | 93,20  | 83,79  | 1,80 | 0,031 |
| Maio : Junho     | 106,47 | 104,53 | 1,63 | 0,045 |
| Maio : Julho     | 142,98 | 97,63  | 2,38 | 0,004 |
| Maio : Agosto    | 186,75 | 115,71 | 2,54 | 0,001 |
| Maio : Setembro  | 169,07 | 107,45 | 2,50 | 0,003 |
| Maio : Outubro   | 156,86 | 109,79 | 2,27 | 0,005 |
| Maio : Novembro  | 114,58 | 110,67 | 1,67 | 0,037 |
| Maio : Dezembro  | 134,72 | 104,65 | 2,03 | 0,013 |

## 9 – Referências

ADAMS, D. C., COLLYER M. L., KALIONTZOPOULOU A., BALKEN E.K. 2021. Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 4.0. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>.

AGIUS, C., AGBEDE, S. A. An electronmicroscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. In: **J Fish Biol.** n. 24, 1984, p. 471–488.

AGIUS, C., ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. In: **J. Fish Dis.** n. 26, 2003, p. 499-509.

AKIYOSHI, H., INOUE, A. M. Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers. In: **Comp. Hepatol.** 2012, p. 2-11.

BARNI, S. *et. al.* Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. In: **Journal of Anatomy.** Vol. 195, 1999, p. 19-25.

BOLLA, S.; OVE, N.; ANIL, A. Liver alterations induced by long-term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. In: **Histological and biochemical aspects. Aquaculture.** Vol. 3121, n. 4, 2011, p. 117-125.

BRAUNBECK, J. B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liverultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. In: **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.** Vol. 19, 1990, p. 405-418.

BUCKE, D.; WATERMANN, B.; FEIST, S. Histological variations of hepato-splenic organs from the North Sea dab, *Limanda limanda* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Vol.7, nº4, 1984, p.255-268.

CARLOS, C. S. et. al. Glicogenoses: uma revisão geral. In: **Bioscience Journal**. Vol. 30, 2014, nº 5.

CÉSARINI, J. P. Melanins and their Possible Roles through Biological Evolution. In: **Advances in Space Research**. Vol.18, 1996, nº 12, p. 35-40.

CHANG, Y.M., HOU, P.C.L. Thermal acclimation of metabolic rate may be seasonally dependent in the subtropical anuran latouche's frog (*Rana latouchii*, Boulenger). **Physiol. Biochem.** 2005, Zool. 78, 947–955.

CHAVES, M. F. et al. Correlations of condition factor and gonadosomatic, hepatosomatic and lipo-somatic relations of *Leptodactylus macrosternum* (ANURA: Leptodactylidae) in the Brazilian Semi-arid. In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Vol. 89, nº 3, 2017, p. 1591-1599.

CHRISTIANSEN, J. L.; GRZYBOWSKI, J.M.; KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage Aggregations and their Age Relationships in the Yellow Mud Turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). In: **Pigment Cell Research**. Vol. 9, 1996, nº4, p. 185-190.

COLLYER, M. L.; ADAMS, Dean C. RRPP: An r package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. **Methods in Ecology and Evolution**, 2018, v. 9, n. 7, p. 1772-1779.

CPTEC, 2016. <https://www.cptec.inpe.br/cidades/previsao.do>. Acesso: de outubro de 2015 a outubro de 2016.

DE AMARAL, M. et al. Seasonal variations in the intermediate metabolism in South American tree-frog *Boana pulchella*. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 192, 2022, n. 2, p. 297-311.

DE OLIVEIRA, E. G.; HADDAD, C. F. B. Diet seasonality and feeding preferences of *Brachycephalus pitanga* (Anura: Brachycephalidae). **Journal of Herpetology**, 2015, v. 49, n. 2, p. 252-256.

DE OLIVEIRA, C. et al. Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. **Ecotoxicology and genotoxicology**: non-traditional terrestrial models, v. 32, n. 125, 2017, p. 2.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. (Ed.). Padrões de distribuição de anfíbios: uma perspectiva global. **JHU Press**, 1999.

ELIAS, H. Liver morphology. In: **Biological Reviews**. Vol. 30, 1955, p. 263–310.

FANALI, L. Z.; Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. In: **Amphib-Reptil**. Nº 38, 2017, p. 175-185.

FARRAR, E.S.; B.E. FRYE. Seasonal variation in the effects of adrenaline and glucagon in *Rana esculenta*. **Gen. Comp. Endocrinol**, Vol. 33. 1977, p. 76-81.

FENOGLIO, C.; G. BERNOCCHI; S. BARNI. Frog hepatocyte modifications induced by seasonal variations: A morphological and cytochemical study. In: **Tissue and Cell**. Nº 24(1), 1992, p. 17- 29.

FRANCO-BELUSSI, L.; Liver Anatomy, Histochemistry, and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. In: **Zoological Science**. Vol. 29, 2012, p. 844-848.

FRANCO-BELUSSI, L.; CASTRUCCI, A. M. L.; OLIVEIRA, C. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. In: **Zoology (Jena)**. Vol. 116, 2013, p. 316-324.

FRANCO-BELUSSI, L., SKOLD, H. N., DE OLIVEIRA, C.; Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. In: **J Exp Biol**. Vol. 219 (9), 2016, p. 1378-1383.

FRANCO-BELUSSI, L. *et al.* Idiosyncratic liver alterations of five frog species to land use changes in the Brazilian Cerrado. **bioRxiv**, 2020, pág. 837534.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (*Date of access*). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. [doi.org/10.5531/db.vz.0001](https://doi.org/10.5531/db.vz.0001), 2023.

GISBERT, E., ORTIZ-DELGADO, J.B., SARASQUETE, C. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. In: **Histology and Histopathology**. n. 23, 2008, p. 1525-1539.

GONDIM, P. deM; RODRIGUES, JOÃO FABRÍCIO M.; CASCON, PAULO. Fluctuating asymmetry and organosomatic indices in anuran populations in agricultural environments in semi-arid Brazil. **Herpetological Conservation and Biology**, 2020, v. 15, n. 2, p. 354-366.

GRANICK, S. Iron Metabolism and Hemochromatosis. In: **Bulletin of the New York Academy of Medicine**. Vol. 25, n. 7, 1949, p. 403-428.

GUPPY, M. The biochemistry of metabolic depression: a history of perceptions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, Vol.139, 2004, p. 435-442.

HAMILTON, P. W. et. al; Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. In: **Methods**. Nº 70, 2014, p. 59-73.

HERRÁEZ, M. P., ZAPATA A. G. Structural characterization of the melanomacrophage centers (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. In: **European Journal Morphology**. Vol. 29, n. 2, 1991, p. 89–102.

HERRÁEZ, M. P.; ZAPATA, A. G. Structure and Function of the Melano-Macrophage Centres of the Goldfish *Carassius auratus*. In: **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Vol. 12, 1986, p.117-126.

HILDEBRAND M., GOSLOW G. **Análise da Estrutura dos Vertebrados**. 2ª ed. Atheneu: São Paulo. 2006.

INMET, 2016. <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso: de outubro de 2015 a outubro de 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.: **Histologia Básica**. São Paulo: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 9ª ed., 1999, 427p.

KALASHNIKOVA, M. M. Erythrophagocytosis and Pigment Cells of the Amphibian Liver. In: **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. Vol. 113, 1992, p.82-84.

KISS, A. C. I. et al. Seasonal metabolic changes in a year-round reproductively active subtropical tree-frog (*Hypsiboas prasinus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 2009, Vol. 152, n. 2, p. 182-188.

KURZ, T. Can Lipofuscin Accumulation be Prevented? In: **Rejuvenation Research**. Vol. 11, nº 2, 2008, p. 441-443.

LEÃO, T.; SIQUEIRA, M.; MARCONDES, S.; FRANCO-BELUSSI, L. DE OLIVEIRA, C. FERNANDES, C. E. Comparative liver morphology associated with the hepatosomatic index in five Neotropical anuran species. In: **The Anatomical Record**, 2020.

LEGENDRE, P. lmodel2: Model II Regression. R package version 1.7-3. <https://CRAN.R-project.org/package=lmodel2>, 2018.

OLIVEIRA, E. F.; FEIO, R. N.; MATTA, S. L. P. Aspectos reprodutivos de *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) no município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, 2007, Vol. 54, nº. 313, p. 231-239.

DE OLIVEIRA, C. *et al.* Melanic pigmentation in ectothermic vertebrates: occurrence and function. *Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects*. Hauppauge: **Nova Science Publisher**, 2012, p. 213-225.

PEIG, J., GREEN, A.J. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. **Oikos**, Vol.118, 2009, p.1883–1891.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. *et al.* Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research**, Vol. 23, n. 10, 2016, p. 9852-9861.

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

PROVETE, D. B *et al.* Anurofauna do noroeste paulista: lista de espécies e chave de identificação para adultos. **Biota Neotropica**, Vol. 11, 2011, p. 377-391.

ROMER A. S.; PARSON, T.S.: Anatomia Comparada dos Vertebrados. **Editora: Atheneu**, São Paulo, 1985.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J.: Histologia, texto e atlas. 2ª ed. **Editora Panamericana**, São Paulo, 1993.

SALEH, H. H. Fish liver as indicator of aquatic environmental pollution. In: **Bulletin of the National Institute of Oceanography & Fisheries**. Vol. 8, 1982, p. 69 – 79.

SANTOS, L. R. S., FRANCO-BELUSSI, L., ZIERI, R., BORGES, R. E.; DE OLIVEIRA, C. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). In: **The Anatomical Record**, 2014, p. 864-875.

SCAPIN, S. & G. DI GIUSEPPE. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. In: **Comp. Biochem. Physiol.** Vol. 2, 1994, p. 189-195.

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Lipofuscin. In: **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. Vol. 36, 2004, p. 1400-1404.

WICKHAM, H. SPRINGER-VERLAG; New York: 2016. Elegant graphics for data analysis. **[Google Scholar]**, 2016.

WILKE, Claus O. Ridgeline Plots in 'ggplot2'[R Package Ggridges Version 0.5. 3]. January. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggridges/index.html>, 2021.

ZUASTI, A. et. al. Occurrence of melanina granules and melanosynthesis in the Kidney of *Sparus auratus*. In: **Pigment Cell Research**. Vol. 2, 1989, p.93-99.