



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

**ANÁLISE DESCRITIVA HISTOLÓGICA E DENSIDADE VOLUMÉTRICA
ESTRUTURAL DO TECIDO RENAL E ESPLÊNICO EM *BOANA RANICEPS* (ANURA:
HYLIDAE)**

Brenda de Oliveira Martins

Campo Grande, MS

2022



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

**ANÁLISE DESCRITIVA HISTOLÓGICA E DENSIDADE VOLUMÉTRICA
ESTRUTURAL DO TECIDO RENAL E ESPLÊNICO EM *BOANA RANICEPS* (ANURA:
HYLIDAE)**

Brenda de Oliveira Martins

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

Co-orientadora: Dra. Lilian Franco-Belussi

Campo Grande, MS

Setembro, 2022

Brenda de Oliveira Martins

**ANÁLISE DESCRITIVA HISTOLÓGICA E DENSIDADE VOLUMÉTRICA
ESTRUTURAL DO TECIDO RENAL E ESPLÊNICO EM *BOANA RANICEPS* (ANURA:
HYLIDAE)**

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.

BANCA EXAMINADORA

**Presidente: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**

**Prof. Dr. Classius de Oliveira
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP**

**Prof. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
Universidade Federal de Goiás**

**Prof. Dr. Juan Manuel Pérez Iglesias
Universidad Nacional de San Luis, Argentina**

AGRADECIMENTOS

Á Deus primeiramente por me dar forças e não me deixar desistir, descobri que a minha fé vai muito além do que pensava. Obrigada pelas brisas que sopravam meu rosto quando meus pensamentos andavam por caminhos sombrios, sei que era você segurando minha mão e me dizendo que eu era capaz, eu só precisava ter fé e acreditar em mim. Eu tive. Obrigada aos meus eternos anjos da guarda, sei que ouviam minhas suplicas em cada vela acendida antes de dormir.

Um pequeno agradecimento á mim, pois com muito esforço (físico e principalmente mental) consegui chegar até aqui: concluir um mestrado, em plena pandemia. Ficar longe de casa não foi fácil, mas também ficar em casa também é uma missão difícil. Crescer, virar adulto, ter suas próprias responsabilidades, e pensar diferente dos pais não são tarefas fáceis quando se está dentro da casa deles, mas sobrevivemos.

Meu maior agradecimento sempre vai ser à minha família, aos meus pais. Por mais que brigamos e temos pensamentos diferentes, eu não seria nada sem vocês. Sempre falei dos meus pais com o maior amor do mundo, são pessoas incríveis, e sempre me apoiaram e me incentivaram, não existe outro sentimento além de gratidão. Obrigada por sempre estarem ali, distantes fisicamente, mas sempre fazendo questão de estarem presente de alguma forma. Á minha "baby shark", minha irmã, meu pedacinho de braveza, muito obrigada pela nossa parceria, que só fica mais forte a cada dia. Levou muito tempo para sermos amigas, além de irmãs, confiar uma na outra, contar uma com a outra em qualquer situação. Eu te amo tanto, e sou muito feliz por ser tão forte, por ser uma mulher de opinião, por saber o que quer e decidida a batalhar até chegar lá. Conte sempre comigo, sempre!

Aos meus avós, Sr. Carlos e Dona Alice, que privilégio ter vocês comigo em cada conquista, em cada etapa da escola, da graduação e agora mais uma, a pós. Obrigada por sempre rezar por mim vovó, sua fé me fez ter mais forte, e as chamadas de vídeo amenizavam a saudade. E por falar em saudade vô, não tem uma cerveja e um modão que não lembre o senhor, por mais que tenha o seu jeito mais 'frio', sei que sempre torceu por mim. Obrigada por torcerem pela "pretinha" de vocês, eu consegui caminhar mais um passo. E aos meus tios e tias, vocês são incríveis! Sempre comemorando cada ida minha para casa, e nunca perdemos a oportunidade de se reunir rs. Tio Eder, conte sempre comigo para uma Heineken geladinha com sal, limão e gelo. Tio Eudes, eu sempre estarei pronta para uma partida de truco, e uma moda bem bonita para cantar. Tia Aline, eu sempre vou pedir uma lasanha sua, do jeito que só você faz. Mas sem champignon, ok? :) Tia Gil, sempre vai ser um bolo de chocolate bem gostoso, e sempre sentiremos uma saudade enorme do nosso Mamutinho, mas ele é meu anjo da guarda, sinto isso mais forte do que nunca. Tia Cris, nem sei como explicar o quanto eu amo você, obrigada pela parceria, pelos conselhos, pelas gordisses que amamos. Á vocês muito obrigada família!

Ao Dr. Carlos Eurico Fernandes, professor, orientador, desorientador, parceiro de prosa (e não é só de conversa kk). Obrigada por aceitar ser mais uma vez orientador, foram etapas muito significativas, começamos no estágio I, monografia, e agora mestrado. Que caminhada! Obrigada pelos conselhos, pela preocupação, por acreditar que tudo ia dar certo.

À minha co-orientadora, professora Lilian, meu eterno agradecimento por ter aceitado me orientar também no mestrado, por ser amiga e parceira de todas as horas e rodas de conversas. Ao Lapex, meu deus que família! Duda, Tay, Karine, André, Tiago, Lilian, Stefanni, Carla Letícia, e aos novos integrantes, obrigada por serem a segunda família, e ao laboratório por ser segunda casa. Obrigada pelos conhecimentos trocados, pelas conversas e desabafos, por cada ajuda. Obrigada família Lapex por tantos anos, tantas histórias, tantos conhecimentos e aprendizados. Sentirei falta de vocês, de cada um.

Agora vem uma parte difícil, agradecer á Duda, ou Maria Eduarda quando estava brava. Amiga, eu poderia agradecer por tantas coisas, por cada momento juntas, por cada vez que me ajudou que me acolheu na sua casa, que fez comidinha para mim... Eu ainda não consegui processar esse final, e sim estou afogada em lágrimas que são um misto de saudade e uma gratidão eterna! Você foi minha maior parceira nesses 2 anos de mestrado, a pessoa que estava lá quase todos os dias, em todas as disciplinas, em cada etapa... tá doendo, mas eu espero que você saiba que eu te amo, e que mesmo te irritando muito, eu amo abraçar você. Espero que lembre sempre de mim, seja pegando um ônibus errado, ou tomando uma cervejinha naquele lugar. Você é incrível amiga, saiba disso. Obrigada, obrigada e obrigada!

Outra parte difícil, mas não me perdoaria se não tivesse um espaço pra ela aqui. Malu. Malu é um furacão, quem conhece sabe, ela chega bagunça tudo, mas põe ordem, e aí se as coisas que ela planeja não dão certo, meu deus! Ela é virginiana gente. Nos conhecemos no começo de 2021, e desde aquele dia ela virou meu grudinho. Quantos momentos amiga meu deus quantas saudades eu vou sentir. Mas também te agradeço por segurar minha cabeça e me mandar aguentar e seguir em frente no momento que eu achava que tudo estava perdido, inclusive eu. Mas naquele dia eu só perdi minha lente mesmo kk Cara, você é uma pessoa incrível, uma mulher forte, decidida, eu tenho tanto orgulho! Te amo demais amor da minha vida! Se cuida, e cuida do Matheus, vocês fizeram parte dos melhores momentos do mestrado.

Ao meu grupinho “Fofos, mas terroristas”, Tia Fran, Lucas, Mulan e João, agradeço imensamente pelos momentos na pandemia, cada um se cuidou muito para que pudéssemos nos ver de vez em quando, só pra se lembrar de como é socializar, e para sermos fortes. Foram tantos desabafos, algumas briguinhas, muitas cervejinhas, uma mudança de apê (serei eternamente grata pela ajuda de vocês! Ninguém pinta um apê igual

à gente). Aos feras nenéns, titia ama vocês, e a mabelzinha também! Um adendo muito especial á aquela que carinhosamente chamo de “Tia Fran”, você foi minha primeira amizade aqui em CG, e desde então nunca mais deixamos de ser amigas. Você esteve comigo em quase todos os momentos dessa minha vida aqui, os alegres, os tristes, as terapias, as festinhas, nos dias de sushizinhos, nos almoços juntas... quantas lembranças maravilhosas que levarei comigo ♥ Você e a Tia Cris foram muito importantes nessa minha jornada, obrigada por tudo!!

Aos demais amigos, Leo, Ju, Juliana, Lais, Matheus, Paulinho, e todos que fizeram parte da minha vida em CG, muito obrigada por tantos momentos incríveis! Sentirei muita falta de vocês. Cada um tem um lugarzinho especial no meu coração.

E nessa reta final, obrigada madrinha, tio João e Kym, por me acolherem, por ceder um espaço na sua casa para eu ficar mais um tempinho aqui. Vocês são doidos, mas a loucura vem de família aparentemente. Obrigada pelo acolhimento!

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade dos estudos e dos degraus que subi até aqui. Obrigada a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio das bolsas durante o período do mestrado.

Finalizo agradecendo a Campo Grande, que foi meu lar e minha casa por 7 anos. Foram anos que me fizeram ser uma pessoa melhor, que eu aprendi a me virar, que me fizeram crescer. Não sei se será um adeus, ou um até breve, mas sou grata por tudo que vivi aqui, as coisas boas e as ruins, agradeço a tudo mesmo! A cada pessoa que eu conheci nessa cidade, ao amor que eu vivi aqui, que me fez entender que só amar não é o suficiente, vai muito além disso, obrigada! Agora é hora de ir.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO – REVISÃO.....	10
ABSTRACT - REVISÃO	11
1. REVISÃO	12
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
ARTIGO	22
RESUMO	22
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.2 Preparação histológica.....	26
2.3 Análise da Densidade Volumétrica Estrutural – DVE	26
2.4 Análises Estatísticas	27
3. RESULTADOS	27
3.1 Análises macroscópica e biométrica	27
3.2 Anatomia e histologia do tecido renal.....	27
3.3 Anatomia e histologia do tecido esplênico.....	28
3.4 Análise da Densidade Volumétrica Estrutural.....	29
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO.....	32
6. FIGURAS E TABELAS	33
7. REFERÊNCIAS	40

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito: “Análise descritiva histológica e densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico em *Boana raniceps* (Anura: Hylidae)”

Figura 1. <i>Boana raniceps</i> , (a) em vista e (b) em vista ventral.....	32
Figura 2. Imagem macroscópica da cavidade abdominal de <i>Boana raniceps</i>	33
Figura 3. Representação mesoscópica e secções histológicas do rim de <i>Boana raniceps</i> ..	34
Figura 4. Corpúsculos renais de <i>Boana raniceps</i>	35
Figura 5. Representação mesoscópica e secções histológicas do baço de <i>Boana raniceps</i> em diferentes colorações.....	36

LISTA DE TABELAS

Manuscrito: “Análise descritiva histológica e densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico em *Boana raniceps* (Anura: Hylidae)”

Tabela 1. Estatísticas descritivas para variáveis biométricas obtidas de *Boana raniceps* (n=17) do pantanal sul-mato-grossense.....32

Tabela 2. Estatísticas descritivas para densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico de *Boana raniceps* (n=17) do pantanal sul-mato-grossense.....37

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis biométricas e densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico em *Boana raniceps* (n=17) do pantanal sul-mato-grossense.....38

1 RESUMO – REVISÃO

2 Os primeiros anfíbios surgiram há 380 milhões de anos atrás, e são divididos em três
3 ordens dentro da Classe Amphibia: Anura (sapos, perereca e rãs), Caudata (salamandras e
4 tritões) e Gymnofiona (cobras-cegas). São animais que possuem adaptações para
5 sobreviverem ao ambiente terrestre, mas ainda possuem dependências do ambiente
6 aquático, tanto para reprodução quanto para respiração, sendo assim considerados modelos
7 para estudos. Podem ser encontrados em quase todo o mundo, exceto nos polos e alguns
8 desertos muito áridos. Os anfíbios anuros possuem o maior número de espécies descritas,
9 aproximadamente 7500 espécies até o momento, tendo a região Neotropical com a maior
10 diversidade. Eles são animais de pernas alongadas, se movimentam por saltos e algumas
11 espécies apresentam formas semiaquáticas, enquanto outras apresentam corpos ásperos,
12 pernas relativamente curtas. O Brasil é a região Neotropical onde se encontra a maior
13 riqueza e diversidade de anfíbios anuros, são cerca de 1140 espécies. A região do pantanal,
14 local da maior planície alagada do mundo, é o lugar de grande importância para estudos
15 relacionados a anuros, visto que as características ambientes propiciam a reprodução
16 desses animais. Estes animais são focos de estudos relacionados a modos reprodutivos,
17 ecologia, dieta, parasitologia, mas recentemente estudos histológicos têm sido promissores
18 para análises ambientais, tornando-os bons indicadores, pois estão em contato tanto com
19 ambiente terrestre, quanto aquático. Além da relação diretamente com o ambiente, estudos
20 que envolvem o sistema hematopoiético são importantes para respostas fisiológicas e a
21 influência do ambiente em suas avaliações hematológicas e bioquímicas. Em anuros, o
22 tecido hematopoiético é composto por baço, rim e medula, e em algumas espécies tecidos
23 periféricos do rim e o timo. Estudos descritivos histológicos em anuros estão voltados para a
24 hematologia e morfometria de hemácias, poucos são os estudos que descrevem os órgãos
25 hematopoiéticos, mas alguns trabalhos têm sido promissores mostrando que existem
26 diferenças entre as organizações celulares em diferentes espécies. Assim esses órgãos são
27 biomarcadores interessantes, visto que são fontes de produção e diferenciação celular. O
28 baço é um órgão impar, arredondado, capsular de coloração avermelhada, e
29 histologicamente apresenta distinção entre polpa vermelha e polpa branca. Está associado a
30 resposta imune e produção e reciclagem de células sanguíneas. Já o rim, é um órgão par,
31 alongado e é responsável pela filtração do sangue, e onde ocorre a absorção e eliminação
32 de substâncias. Neste trabalho, é descrita a histologia do tecido renal e esplênico de uma
33 espécie de anuro, *Boana raniceps*.

ABSTRACT - REVISÃO

35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68

The first amphibians appeared 380 million years ago and are divided into three orders within the Amphibia Class: Anura (frogs, frogs, and toads), Caudata (salamanders and newts), and Gymnophiona (blind snakes). They survive both in the terrestrial and aquatic environments, thus being considered good models for environmental studies. They can be found almost all over the world, except at the poles and some very arid deserts. Anuran amphibians have the most significant number of described species, approximately 7500 species so far, with the Neotropical region having remarkable diversity. Brazil is the neotropical region with the greatest richness and diversity of anuran amphibians, with approximately 1140 species. Moreover, the Pantanal presents favorable environmental characteristics for the adaptation of many species, making it a suitable place for several studies, particularly those involving the hematopoietic system. Hematopoietic tissue is composed of the spleen, kidney, and bone marrow, and in some species, peripheral tissues of the kidney and thymus. Descriptive histological studies on hematopoietic organs are still scarce, but some have revealed marked differences between species, being a critical system for studies on physiological responses to the environment. For example, the spleen is an odd, rounded, capsular reddish organ, with a clear distinction between red and white pulp, whose function is proliferation, differentiation, and recycling of blood cells. In turn, the kidney is a paired, elongated organ responsible for filtering the blood, where the absorption and elimination of biomolecules resulting from metabolism occurs. Following the importance of this group as an environmental bioindicator, this study aimed to describe the histology of the splenic and renal tissue of an anuran species, *Boana raniceps*.

69 1. REVISÃO

70

71 Há cerca de 380 milhões de anos surgiram os primeiros anfíbios, animais que fazem
72 parte da Classe Amphibia e são divididos em três ordens: Anura, Caudata e Gymnophiona
73 (Duellman & Trueb, 1999; Pough *et al.*, 2003). Os anfíbios são um grupo de vertebrados
74 tetrápodes que surgiram a partir de peixes com nadadeiras lobadas e possuem adaptações
75 para sobreviverem ao ambiente terrestre, porém continuam dependentes de ambientes
76 aquáticos para reproduzirem e completarem seu ciclo de vida, além de necessitarem de
77 ambientes úmidos para realização das trocas gasosas pela pele (Pough *et al.*, 2003), sendo
78 modelos para estudos evolutivos. Uma característica importante do grupo é a alta
79 permeabilidade cutânea, tornando-os vulneráveis a alterações ambientais. Tal
80 permeabilidade lhes permite a absorção de água e outras substâncias, regulação de
81 temperatura corporal, e aumento ou diminuição dos níveis de umidade conforme
82 necessários nos ciclos diurnos e noturnos (Duellman & Trueb, 1999; Pough *et al.*, 2003;
83 Ficetola & Bernardi 2004). Sendo assim, alterações cutâneas podem refletir sobre
84 alterações ambientais.

85 Resquício da alteração de hábitat durante a evolução é refletido no seu modo
86 reprodutivo, quase sempre apresentando a fase larval (Heyer, 1970), denominada girino.
87 São animais que podem ser encontrados em quase todo o mundo, exceto nos polos e
88 alguns desertos muito áridos (Pough, 1999). Entre os anfíbios, os anuros possuem o maior
89 número de espécies descritas, retratando cerca 7477 espécies (Frost, 2022) destacando a
90 região Neotropical como a mais diversa do globo (Heyer *et al.*, 1990; Duellman, 1999).
91 Devido a sua diversidade, tem se visto um aumento exponencial no número de espécies
92 descritas nas últimas décadas (Guerra *et al.*, 2020), desta maneira o número de espécies
93 conhecidas ainda é subestimado. Apesar da riqueza de espécies, estes animais pertencem
94 ao grupo de vertebrados que estão em risco, com 41% das espécies classificadas como
95 ameaçadas ou extintas segundo a IUCN 2021, devido principalmente a ações antrópicas.

96 No Brasil, encontra-se 1144 espécies de anfíbios anuros, sendo o país da região
97 Neotropical que apresenta a maior riqueza e diversidade do grupo (Segalla *et al.*, 2021).
98 Dentre as regiões brasileiras o pantanal é um local importante para estudos relacionados a
99 anuros, pois suas características ambientais como os ciclos de cheias e secas, propiciam a
100 reprodução desses animais, visto que estes necessitam de um ambiente específico para
101 completar seu ciclo de vida.

102 Muitos estudos realizados com anuros estão relacionados a modos reprodutivos
103 (Prado *et al.*, 2000, 2002, 2005; Landgraf-Filho 2009), investimentos reprodutivos (Prado &

104 Haddad 2003, 2005), ecologia (Delatorre *et al.*, 2015), dieta (Piatti, 2009; Sugai *et al.*, 2012)
105 e parasitos (Trombeta *et al.*, 2008, Campião, 2010; Campião *et al.*, 2012, 2016). Porém,
106 alguns estudos têm mostrado que os aspectos histológicos são promissores para análises
107 de influências do ambiente, incluindo análises de genotoxicidade (Franco-Belussi *et al.*,
108 2016; Gregorio *et al.*, 2016; Pérez-Iglesias *et al.*, 2016).

109 Outro aspecto importante de analisar é o sistema hematopoiético que envolve
110 diferentes tecidos responsáveis pelas funções de defesa, produção, multiplicação e
111 diferenciação das células sanguíneas. Tal sistema é um indicador de respostas fisiológicas e
112 sensíveis às mudanças ambientais, visto que seu contato diretamente com o ambiente
113 influencia nas avaliações hematológicas e bioquímicas (Schmid-Schönbein *et al.*, 1980;
114 Shutler & Marcogliese, 2011).

115 Embora existam semelhanças no sistema hematopoiético entre mamíferos e
116 anfíbios, existem também diferenças como, por exemplo: nos mamíferos a medula óssea é
117 a principal fonte de hematopoiese, já nos anfíbios os tecidos periféricos do baço, fígado e
118 rim são locais de hematopoiese desde o desenvolvimento inicial (Chen e Turpen, 1995;
119 Golub *et al.*, 2004; Nogawa-Kosaka *et al.*, 2011). No baço de anfíbios o baço funciona
120 também como um órgão linfoide, formando algumas vezes linfonodos organizados, mas não
121 há formação desses linfonodos no fígado e rim (Du Pasquier *et al.*, 1989; Robert e Ohta,
122 2009).

123 Estudos descritivos histológicos de órgãos hematopoiéticos em anuros neotropicais
124 são escassos, muitos estudos estão voltados para hematologia (Cabagna-Zenklusen *et al.*,
125 2011; Lajmanovich *et al.*, 2012) e alguns para morfometria de hemácias (Adamowicz, 2003;
126 Grenat *et al.*, 2009). Alguns trabalhos têm mostrado que existem diferenças entre as
127 organizações celulares em diferentes espécies (Dulak, 1990; Oliveira *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*,
128 2009). Assim, os órgãos hematopoiéticos são interessantes biomarcadores, uma vez
129 que são sítio primário da eritropoiese, ocorrendo processo de produção e diferenciação
130 celular (Turner, 1988, Arikan & Çiçek, 2014).

131 Nos anfíbios urodelianos (salamandras e tritões) o baço é um órgão alongado e
132 definido pela vascularização devido a presença de múltiplas artérias e veias (Cowden e
133 Dyer, 1971). Já nos anfíbios anuros o baço é um órgão arredondado. Segundo Turner 1969,
134 nos anfíbios mais recentes a distinção de polpa branca e polpa vermelha são mais visíveis,
135 diferente dos urodelianos e anuros primitivos. Ele descreve a polpa vermelha sendo rica em
136 eritrócitos e com um papel fundamental na hematopoiese, já a polpa branca sendo o local
137 onde se tem a presença de linfócitos B e T, tornando o baço um órgão linfoide. No trabalho

138 de Turner 1973, foi aprofundado o estudo em baço de anuros, mostrando que o baço
139 apresenta grandes respostas à antígenos, tendo um aumento na proliferação celular.

140 Esse órgão frequentemente apresenta agregados de macrófagos com melanina,
141 conhecidos por centros de melanomacrófagos (CMMs), intimamente associadas à resposta
142 imune inata nos anuros, possuindo ação de proteção (Zapata *et al.*, 1996; Agius & Roberts,
143 2003; Passantino *et al.*, 2014). Outras funções importantes do baço são a produção e a
144 reciclagem de células sanguíneas, além da fagocitose e maturação dos eritrócitos (Nilsson,
145 2012).

146 O rim é outro órgão importante, visto que é nele que ocorre a filtração do sangue e
147 onde as substâncias podem ser absorvidas ou secretadas (George & Castro, 1998). Além
148 de sua função renal, algumas espécies de anfíbios utilizam os interstícios pronéfricos para a
149 hematopoiese, como por exemplo, girinos de *Rana temporaria* (Mesenguer *et al.*, 1985). Já
150 o estudo de Carpenter e Turpen, 1979 mostra que os girinos de *Rana pipiens* tem o rim
151 como local de desenvolvimento de células sanguíneas. Já o estudo de De Abreu Manso *et*
152 *al.*, 2009 mostrou que a rã-touro *Lithobates catesbeianus* adulta, tem a medula óssea e o
153 rim para produzir células sanguíneas (heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos).

154 Nos anfíbios anuros a unidade funcional do rim é o néfron, composto por: corpúsculo
155 renal, túbulos proximais e distais, e ducto coletor; não há presença de alça de Henle. Nos
156 anfíbios o rim se apresenta em 2 formas distintas: o pronéfrico nos girinos e mesonéfrico
157 nos adultos, variando a quantidade de néfrons em cada um deles (Saxén e Sariola, 1987;
158 Ma e Jiang, 2007). Tal órgão tem funções como homeostase e a produção de eritropoietina,
159 que estimula a formação de eritrócitos (Cianciarullo, 1997). Logo, ele possui contato direto
160 com os contaminantes que estiverem presentes no ambiente e, devido ao processo de
161 excreção é um dos primeiros órgãos a ser afetado, sendo possível indicar alterações,
162 através da toxicidade nos tecidos (Thophon *et al.*, 2003; Lins *et al.*, 2010).

163 Uma das técnicas mais baratas e fáceis de padronizar para a análise de órgãos é a
164 estereologia. A estereologia é baseada em princípios geométricos, onde o volume,
165 superfície e números de estruturas em tecidos ou em células podem ser determinados
166 quantitativamente, sendo este estudo chamado de morfometria (Reid, 1980). Estudos
167 estereológicos são fortes aliados quando se torna necessário realizar medidas que
168 envolvam área, volume, densidade de estruturas. É uma ciência que tem como base as
169 relações geométricas entre uma estrutura (que existe em três dimensões) e as imagens
170 desta (bidimensionais) (Russ e Dehoff, 2000).

171 Portanto, estudos que descrevem os parâmetros histológicos dos órgãos
172 eritropoiéticos de anuros neotropicais podem fundamentar análises e correlações com
173 variações ambientais. Dessa forma, analisar e relacionar a histologia com do rim e baço
174 representa uma base científica para estudos futuros, contribuindo com o avanço do
175 conhecimento científico.

176 Assim conforme o exposto, neste trabalho foi realizado a descrição histológica e a
177 densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico de *Boana raniceps* (Anura:
178 Hylidae). Para isso, foram empregadas diferentes técnicas histoquímicas, histométricas e de
179 densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico. Em adição, foram
180 correlacionados os índices renossomático e esplenossomático com as medidas
181 histométricas.

182

183 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

184

185 ADAMOWICZ, A.; BOLACZEK, M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima*
186 (*Helicidae*). *Zoologica Poloniae*, v. 48, n. 1-4, p. 93-101, 2003.

187 AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish
188 pathology. *Journal of fish diseases*, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.

189 ARIKAN, HÜSEYİN; ÇIÇEK, KERIM. Haematology of amphibians and reptiles: A review.
190 North-Western. *Journal of zoology*, v. 10, n. 1, 2014.

191 CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C., LAJMANOVICH, R. C., ATTADEMO, A. M., PELTZER, P.
192 M., JUNGES, C. M., FIORENZA BIANCUCCI, G., & BASSÓ, A. Hematología y
193 citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae)
194 en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, v. 59,
195 n. 1, p. 17-28, 2011.

196 CAMPIAO, K. M.; NUNES, M. D.; RODRIGUES, R. B.; SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L. The
197 effect of local environmental variables in the helminth parasite communities of the
198 pointedbelly frog *Leptodactylus podicipinus* from ponds in the pantanal wetlands. *The*
199 *Journal of Parasitology*, v. 98, p. 229-235, 2012.

- 200 CAMPIAO, K. M.; DIAS, O. T.; SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L.; TAVARES, L. E. Living apart
201 and having similar trouble: frog helminth parasites determined by the host or by the
202 habitat? *Canadian Journal of Zoology (Online)*, v. 94, p. 761-765, 2016.
- 203 CAMPIÃO K. M. Influência das características ambientais na comunidade de helmintos
204 parasitas de *Leptodactylus podicipinus* (Anura, Leptodactylídeos) de lagoas do
205 Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Dissertação de
206 Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Programa de Pós-
207 Graduação em Ecologia e Conservação. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 31p,
208 2010.
- 209 CHEN, X.; TURPEN, J. B. Intraembryonic origin of hepatic hematopoiesis in *Xenopus laevis*.
210 *The Journal of Immunology*, v. 154, n. 6, p. 2557-2567, 1995.
- 211 CIANCIARULLO, A. M. Biologia Evolutiva de *Odontophrynus Americanus* 2N e 4N
212 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): Eritropoese, Regulação Gênica, Síntese da
213 Hemoglobina e Caracterização Biológica. 1997.
- 214 COWDEN, R. R.; DYER, R. F. Lymphopoietic tissue and plasma cells in amphibians.
215 *American Zoologist*, v. 11, n. 2, p. 183-192, 1971.
- 216 DE ABREU MANSO, P. P.; DE BRITO-GITIRANA, L.; PELAJO-MACHADO, M. Localization
217 of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Cell and Tissue*
218 *Research*, v. 337, n. 2, p. 301-312, 2009.
- 219 DELATORRE, M.; CUNHA, N. L.; RAIZER, J.; FERREIRA, V. L. Evidence of stochasticity
220 driving anuran metacommunity structure in the Pantanal wetlands. *Freshwater*
221 *Biology (Print)*, v.60, p. 2197-2207, 2015.
- 222 HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E. Frogs of
223 Boracéia. *Arquivos de Zoologia.*, v. 31, p. 231-410, 1990.
- 224 DU PASQUIER, L.; SCHWAGER, J.; FLAJNIK, M. F. The immune system of *Xenopus*.
225 *Annual review of immunology*, v. 7, p. 251-275, 1989.
- 226 DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. 1999. *Biology of amphibians*. New York: McGraw-Hill. 670p.
- 227 DUELLMAN, W.E. Distribution patterns of amphibians in the South America. In: DUELLMAN,
228 W.E. (Ed.). *Patterns of distribution of amphibians – a global perspective*. The Johns
229 Hopkins University Baltimore, London, p. 255-328, 1999

- 230 DULAK, J. The architecture of the spleen of the yellow-bellied toad, *Bombina variegata*.
231 Journal of Zoology, v. 221, n. 3, p. 489-498, 1990.
- 232 FERREIRA, A. DOS SANTOS ROSA, A. B.; MEHANNA, M. Organização celular dos
233 testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do
234 Sul, Brasil). Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 31, n. 4, p. 447-452, 2009.
- 235 FICETOLA, G. F.; BERNARDI, F. Amphibians in a human-dominated landscape: the
236 community structure is related to habitat features and isolation. Biological
237 Conservation, v. 119, p. 219-230, 2004.
- 238 FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia:
239 Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -
240 melanocyte stimulating hormone. Italian Journal of Zoology, v. 83, n. 3, p. 298-305,
241 2016.
- 242 GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. Histologia comparada. 2. ed. São
243 Paulo: Roca, 1998.
- 244 GOLUB, R., ANDRÉ, S., HASSANIN, A., AFFATICATI, P., LARIJANI, M., & FELLAH, J. S.
245 Early expression of two TdT isoforms in the hematopoietic system of the Mexican
246 axolotl. Immunogenetics, v. 56, n. 3, p. 204-213, 2004.
- 247 GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; GOMES, F. R.; OLIVEIRA, C. Flutamide effects
248 on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella*
249 *schneideri*. Aquatic Toxicology, v. 176, p. 181-189, 2016.
- 250 GRENAT, P.R., BIONDA, C., SALAS, N. E., & MARTINO, A. L. Variation in erythrocyte size
251 between juveniles and adults of *Odontophrynus americanus*. Amphibia-Reptilia, v. 30,
252 n. 1, p. 141-145, 2009.
- 253 GUERRA, V.; JARDIM, L.; LLUSIA, D.; MÁRQUEZ, R.; BASTOS, R. P. Knowledge status
254 and trends in description of amphibian species in Brazil. Ecological Indicators, [s.l.], v.
255 118, n. 106754, p. 01-11, 2020.
- 256 HEYER, W. R. Studies on the frogs of the genus *Leptodactylus* (Amphibia: Anura).
257 Contributions in Science, n.191, p.25-48, may, 1970.
- 258 IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-2. Disponível em:
259 <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 15 mai. 2022.

- 260 LAJMANOVÍCH, R. C., PELTZER, P. P., ATTADEMO, A. M., CABAGNA, M. C., JUNGES,
261 C. M., & BASSO, A. Amphibia, Anura, Hylidae, *Argenteohyla siemersi pederseni*
262 (Williams and Bosso, 1994): first record and some hematological data in Santa Fe
263 Province, Argentina. Check List, v. 8, n. 4, p. 790-791, 2012.
- 264 LANDGREF-FILHO P. Padrões reprodutivos de anfíbios anuros em um agroecossistema no
265 estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de
266 Mato Grosso do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.
267 Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 36p, 2009.
- 268 LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como
269 biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. Rev. Acadêmica: Ciências
270 Agrárias e Ambientais. v. 8, n.4, p. 469-484. 2010.
- 271 MA, M.; JIANG, Y. Jagged2a-notch signaling mediates cell fate choice in the zebrafish
272 pronephric duct. PLoS genetics, v. 3, n. 1, p. e18, 2007.
- 273 MESEGUER, J.; LOZANO, M. T.; AGULLEIRO, B. Ultrastructure of the renal granulopoietic
274 tissue of the *Rana ridibunda* tadpole. Journal of submicroscopic cytology, v. 17, n. 3,
275 p. 391-401, 1985.
- 276 NILSSON, S.. Autonomic nerve function in the vertebrates. Springer Science & Business
277 Media, vol. 13, 2012.
- 278 NOGAWA-KOSAKA, N., SUGAI, T., NAGASAWA, K., TANIZAKI, Y., MEGURO, M.,
279 AIZAWA, Y., ... & KATO, T. Identification of erythroid progenitors induced by
280 erythropoietic activity in *Xenopus laevis*. Journal of Experimental Biology, v. 214, n. 6,
281 p. 921-927, 2011.
- 282 OLIVEIRA, C. DE, SANTOS, L. R. DE S., & ZIERI, R. Variações anatômicas no aparelho
283 reprodutor masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae).
284 Biota Neotropica, v.7, p. 43–48, 2007.
- 285 PASSANTINO, L., SANTAMARIA, N., ZUPA, R., POUSIS, C., GAROFALO, R.,
286 CIANCIOTTA, A., & CORRIERO, A. Liver melanomacrophage centres as indicators
287 of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. Journal of Fish Diseases,
288 v.37, n.3, p. 241-250, 2014.
- 289 PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L. T.; OLIVEIRA, C.;
290 SEBASTIÁN, N. G. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating
291 melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus*

- 292 *latinasus*. Environmental Science and Pollution Research International, v. 23, p.
293 9852-9861, 2016.
- 294 PIATTI, L. Comunidade e dieta de anuros (Amphibia, Anura) em um agroecossistema no
295 município de Miranda, Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade
296 Federal de Mato Grosso do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
297 Conservação. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 58p, 2009.
- 298 POUGH, F.H.; CHRISTINE, M.J.; HEISER J.B. A vida dos vertebrados. 3ª ed. Atheneu, São
299 Paulo. 699p, 2003.
- 300 POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER; J. B. A vida dos vertebrados. 4 ed. São Paulo:
301 Editora Atheneu, p. 684,2008.
- 302 POUGH, F. H., HEISER, J. B., McFARLAND, W. N. 1999. A vida dos vertebrados. 2. ed.
303 São Paulo: Editora Atheneu. 834p.
- 304 PRADO, C. P. A.; HADDAD, C.F.B. Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of
305 multimale spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. Journal of Herpetology, v.
306 37, n. 2, p. 354-362, 2003.
- 307 PRADO C. P. A.; HADDAD C. F. B. Size-fecundity relationships and reproductive investment
308 in female frogs in the Pantanal, southwestern Brazil. Herpetological Journal, v.15, p.
309 181-189, 2005.
- 310 PRADO C. P. A.; UETANABARO M.; LOPES F. S. Reproductive strategies of *Leptodactylus*
311 *chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brazil. Journal of Herpetology, v. 38,
312 p.135-139, 2000.
- 313 PRADO C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. Description of a new reproductive
314 mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of reproductive
315 specialization toward territoriality in the genus. Copeia, v. 04, p.1128-1133, 2002.
- 316 PRADO C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. Breeding activity patterns,
317 reproductive modes and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal
318 environment in the Pantanal, Brazil. Amphibia-Reptilia, v. 26, p. 211-221, 2005.
- 319 REID I.M. Morphometric Methods in Veterinary Pathology: A Review. Vet. Pathol.17:522-
320 543, 1980
- 321 ROBERT, J.; OHTA, Y. Comparative and developmental study of the immune system in
322 *Xenopus*. Developmental Dynamics, v. 238, n. 6, p. 1249-1270, 2009.
- 323 RUSS, J. C.; DEHOFF, R. T. Practical stereology. Number v. 1. 2000.

- 324 SAXÉN, L.; SARIOLA, H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatric nephrology*, v. 1, n. 3,
325 p. 385-392, 1987.
- 326 SCHMID-SCHONBEIN, G. W., YUAN Y. SHIH, AND SHU CHIEN. Morphometry of human
327 leukocytes. (1980): 866-875.
- 328 SEGALLA, M. V., BERNECK, B., CANEDO, C., CARAMASCHI, U., CRUZ, C. A. G.,
329 GARCIA, P. C., ... & LANGONE, J. A. List of Brazilian amphibians. *Herpetologia*
330 Brasileira, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.
- 331 SHUTLER, D.; MARCOGLIESE, D. J. Leukocyte profiles of northern leopard frogs,
332 *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands.
333 *Copeia*, v. 2011, n. 2, p. 301-307, 2011.
- 334 SUGAI, J. L. M.; TERRA, J. S.; FERREIRA, V. L. Diet of *Leptodactylus fuscus* (Amphibia:
335 Anura: Leptodactylidae) in the Pantanal of Miranda river, Brazil. *Biota Neotropica*
336 (Online. Edição em Inglês), v. 12, p. 1-1, 2012.
- 337 THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.;
338 SAHAPHONG, S.; Jaritkhuan, S. Histopathological alterations of white seabass,
339 *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental pollution*,
340 v.121, p.307 - 320, 2003.
- 341 TROMBETA, A. M. Estudo da helmintofauna de anfíbios das famílias Cerathophryidae,
342 Leptodactylidae e Leiuperidae do Pantanal Sul, Mato Grosso do Sul. Dissertação de
343 Mestrado. Universidade Estadual de São Paulo: Programa de Pós-Graduação em
344 Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências. Botucatu, São Paulo. 54p,
345 2008.
- 346 TURNER, R. J. The functional development of the reticulo-endothelial system in the toad,
347 *Xenopus laevis* (Daudin). *Journal of Experimental Zoology*, v. 170, n. 4, p. 467-479,
348 1969.
- 349 TURNER, R. J.; MANNING, M. J. Response of the toad, *Xenopus laevis*, to circulating
350 antigens. I. Cellular changes in the spleen. *Journal of Experimental Zoology*, v. 183,
351 n. 1, p. 21-33, 1973.
- 352 TURNER R. J. Amphibians. In: Rowley A., Ratcliffe N. (eds), *Vertebrate Blood Cells*.
353 Cambridge: Cambridge University Press, pp. 129–209, 1988.

354 TURPEN, J. B.; TURPEN, C. J.; FLAJNIK, M. Experimental analysis of hematopoietic cell
355 development in the liver of larval *Rana pipiens*. *Developmental Biology*, v. 69, n. 2, p.
356 466-479, 1979.

357 ZAPATA, A. G., TORROBA, M., SACEDON, R., VARAS, A. & VICENTE, A. Structure of the
358 lymphoid organs of elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology Part A:
359 Ecological Genetics and Physiology*, v. 275, n. 2-3, p. 125-143, 1996.

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

ARTIGO

378

379

380 **Análise descritiva histológica e densidade volumétrica estrutural do tecido renal e**
381 **esplênico em *Boana raniceps* (Anura: Hylidae)**

382 Brenda de Oliveira Martins¹; Lilian Franco-Belussi²; Carlos Eurico dos Santos Fernandes³

383 ¹ Mestranda em Biologia Animal, Instituto de Biociências – Universidade Federal de Mato
384 Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil. Email: brendabernini@gmail.com

385 ² Pós-doc associada ao Laboratório de Patologia Experimental – Lapex e docente associada
386 ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal – Universidade Federal de Mato
387 Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil. Email: lilian.belussi@gmail.com

388 ³ Professor do Instituto de Biociências - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato
389 Grosso do Sul, Brasil. Email:carlos.fernandes@ufms.br

RESUMO

390

391 Os anuros são considerados bioindicadores ambientais devido às características como pele
392 permeável e ciclo de vida dependente dos ambientes aquáticos e terrestres, sendo que
393 alterações no sistema imune são consideradas biomarcadores de efeito de alterações
394 ambientais. Assim, é importante o conhecimento sobre seu sistema hematopoiético e seus
395 principais órgãos. Em anuros, o sistema é constituído pela medula óssea, o baço e o rim.
396 Poucos são os estudos que abordam esse tema, e menos ainda são as descrições a
397 respeito da histologia desses órgãos. Diante disso este trabalho propõe fazer uma descrição
398 histológica e analisar a densidade volumétrica estrutural do tecido renal e do tecido
399 esplênico de *Boana raniceps*, a fim de obter conhecimento sobre como organizam-se suas
400 estruturas e composição celular, e sobre a histologia nessa espécie. Dessa forma, pretende-
401 se contribuir para o entendimento das relações entre esses órgãos e suas constituições em
402 anuros. Para isso, foram analisados 17 indivíduos machos adultos de *Boana raniceps*
403 coletados na Base de Estudos do Pantanal (BEP-UFMS) entre os meses de outubro a
404 março de 2018/2019. Os órgãos foram pesados, processados por técnica histológica e
405 analisados por testes estatísticos. As secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina
406 (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Tricrômico de Masson (TM), Reticulina (método de
407 Gomori) e May-Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW). Para o baço e o rim foi feita a densidade
408 volumétrica estrutural por meio de *softwares*, além de calculado o índice esplenossomático
409 (IES) para o baço, e o índice renossomático para o rim (IRS). O peso médio dos indivíduos
410 foi de 11,4 ±1,5g, e o tamanho médio (CRC) foi de 5,9 ±0,3 cm. O IRS representou 0,42% e

411 IES em torno de 0,14%, do peso do indivíduo. As estruturas mais predominantes nos rins
412 foram túbulos contorcidos proximais (TCP) e túbulos contorcidos distais (TCD) com 60,4 e
413 16,8%, respectivamente. No baço, a estrutura mais predominante foi a polpa vermelha com
414 79%, seguida da polpa branca com 12,2%. O IRS de *B. raniceps* apresentou correlação
415 negativa com o peso do indivíduo, indicando que o desenvolvimento renal estabiliza em
416 determinado período da fase adulta. A relação positiva entre o peso corporal e o CRC indica
417 que o animal continua crescendo e ganhando peso mesmo na fase adulta. A correlação
418 negativa entre TCP e TCD, evidencia a função de manter o equilíbrio hídrico no ambiente
419 terrestre, visto que o TCP é a estrutura responsável por reabsorver a água do filtrado
420 glomerular. Esses parâmetros renais e esplênicos aqui descritos em *B. raniceps* podem
421 direcionar futuros estudos que visam avaliar alterações nesses órgãos em anuros, bem
422 como sugerem a utilização de técnicas tanto histológicas, quanto de densidade volumétrica
423 estrutural para essa avaliação.

424 Palavras-chave: histologia, anuros, rim, baço.

425

426

ABSTRACT

427 Anurans are important environmental bioindicators because they depend on aquatic and
428 terrestrial environments. However, few studies have described and evaluated the structure of
429 organs that make up the hematopoietic system. Therefore, this study aimed to describe and
430 characterize the histology of the splenic and renal tissue of *Boana raniceps*. Seventeen
431 males of *Boana raniceps* collected at the Base de Estudos do Pantanal (BEP-UFMS)
432 between October and March 2018/2019 were analyzed. Spleen and liver were weighed and
433 processed by histological technique. The splenosomatic and renosomatic indexes were
434 calculated. Tissue sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E), Periodic Acid
435 Schiff (PAS), Masson Trichrome (TM), Reticulin (Gomori method), and May-Grünwald-
436 Giemsa-Wright (MGGW). In addition, the structural volumetric density of both organs was
437 evaluated. The mean weight of the individuals was 11.4 ± 1.5 g, and the mean size (CRC)
438 was 5.9 ± 0.3 cm. The IRS represented 0.42% and IES around 0.14% of the individual's
439 weight. The most predominant structures in the kidneys were proximal convoluted tubules
440 (TCP) and distal convoluted tubules (DCT), with 60.4 and 16.8%, respectively. In the spleen,
441 the most predominant structure was red pulp with 79%, followed by white pulp with 12.2%.
442 The SRI of *B. raniceps* showed a negative correlation with the individual's weight, indicating
443 that renal development stabilizes during adulthood. However, the positive relationship
444 between body weight and CRC indicates that the animal continues to grow and gain weight
445 even in adulthood. The negative correlation between TCP and TCD evidences the function of

446 maintaining water balance in the terrestrial environment since TCP is the structure
447 responsible for absorbing water from the glomerular filtrate. Therefore, it is concluded that
448 descriptive histological studies help obtain knowledge about the splenic and renal tissue of *B.*
449 *raniceps*.

450 **Keywords:** histology, anurans, kidney, spleen

451

452 1. INTRODUÇÃO

453

454 Os anuros possuem grande importância ecológica visto que apresentam papéis
455 fundamentais em teias alimentares, uma vez que conectam o ambiente terrestre e aquático
456 por possuírem uma fase larval aquática (Phillips, 1990; Duellman & Trueb, 1999). Além
457 disso, possuem permeabilidade cutânea para realizarem trocas gasosas, sendo
458 considerados indicadores ambientais, pois ficam em contato direto com contaminantes e
459 podem absorver facilmente esses produtos (Blaustein, 1994; Haddad, 2008). A família
460 Hylidae possui grande diversidade de espécies entre os anuros incluindo a espécie *Boana*
461 *raniceps* Cope, 1862 (Frost, 2022). Esta espécie possui ampla distribuição na América do
462 Sul, ocorrendo na região do pantanal sul-mato-grossense. Apesar de existirem diversos
463 estudos com anfíbios anuros na região do pantanal sul-mato-grossense, pouco se sabe a
464 respeito do sistema hematopoiético e a relação entre as estruturas desses órgãos em
465 anuros neotropicais.

466 Em anuros, o sistema hematopoiético é constituído pelo rim, baço e medula óssea
467 (Duellman & Trueb, 1986), apresentando diferentes padrões entre as organizações celulares
468 e estruturas de acordo com as espécies (Dulak, 1990; Oliveira et al. 2007; Ferreira et al.
469 2009). Tais órgãos são importantes fontes de estudos, pois são sítios de eritropoiese e
470 estão relacionados com função linfóide e excretora (Rollins-Smith, 1998; Yaparla *et al.*,
471 2017). Durante a metamorfose em anuros, os rins sofrem transformações passando do tipo
472 pronefro (George *et al.*, 1998) para mesonefro na fase adulta (Saxén, 1987; Møbjerg *et al.*,
473 2000)

474 O baço é um órgão localizado na cavidade abdominal, encapsulado, de cor vermelho
475 escuro e formato oval ou esférico. É dividido em polpa branca e vermelha, semelhante aos
476 mamíferos (Alvarez, 1990). Nos anfíbios há diferença entre as proporções de polpa branca e
477 polpa vermelha (Pitchappan, 1980; Gül et al. 2011). Além das polpas, o baço é constituído
478 por um estroma sustentado por células reticulares, pequenas arteríolas circundadas por

479 fibras reticulares e, internamente, por células mioendoteliais (Dulak, 1990; Barrutia et al.
480 1985).

481 O rim é outro órgão importante, visto que é nele que ocorre a filtração do sangue e
482 onde as substâncias podem ser absorvidas ou secretadas (George & Castro, 1998). Nos
483 rins de anuros, ocorrem algumas alterações como respostas à contaminantes, como
484 infiltração de células mononucleares, hipertrofia das células da cápsula de Bowman,
485 destruição da borda em escova, degeneração glomerular e hemorragia, sendo estas
486 alterações associadas à intoxicação (Çakici, 2015).

487 Assim conforme o exposto, tanto baço quanto os rins são órgãos importantes para
488 avaliação da homeostase dos animais e por isso neste trabalho foi realizada a descrição do
489 tecido renal e esplênico de *Boana raniceps* (Anura: Hylidae) a fim de fornecer parâmetros
490 dentro da normalidade para a espécie, bem como propor uso tanto da histologia quanto da
491 densidade volumétrica estrutural como ferramentas. Para isso, foram empregadas diferentes
492 técnicas histoquímicas, histométricas e de densidade volumétrica estrutural do tecido renal e
493 esplênico, em adição, foram correlacionados os índices renossomático e esplenossomático
494 com as medidas histométricas.

495 2. MATERIAIS E MÉTODOS

496

497 2.1 Amostragem, ambiente e biometria

498 Machos da espécie de *Boana raniceps* (n = 17) (Figura 1) foram capturados por
499 busca ativa em sítios de vocalização na região do Passo do Lontra, Base de Estudos do
500 Pantanal (BEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, município de
501 Corumbá, Mato Grosso do Sul (19°34'37"S, 57°00'42"W), durante o período chuvoso
502 compreendido entre os meses de outubro a março (Alho, 2005) de 2018 e 2019.

503 Após captura, os espécimes eram mantidos em caixa de polietileno (30 x 50 x 45 cm)
504 com aeração natural e temperatura ambiente (entre 25 a 28°C) até a eutanásia. Os
505 espécimes foram eutanasiados com aplicação tópica de xilocaína 5%. Em seguida, eram
506 anotados o peso corporal (g) e a medida do comprimento rostro-cloacal (cm). O rim e o baço
507 foram retirados e pesados para a determinação do índice renossomático ($IRS = \text{peso do rim (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100$) e do índice esplenossomático ($IES = \text{peso do baço (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100$), respectivamente. Todos os procedimentos com os animais foram
508 aprovados pela comissão de ética no uso de animais/CEUA da Universidade Federal de
509 Mato Grosso do Sul sob o número 997/2018 e SISBIO projeto número 63297-1.
511

512 2.2 Preparação histológica

513

514 Após serem pesados, os rins e o baço foram fixados em metacarn (60% de metanol;
515 30% clorofórmio e 10% de ácido acético) a temperatura ambiente $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 3 horas e
516 transferidos para álcool 70%. Ambos foram submetidos a procedimentos histotécnicos de
517 rotina para inclusão em Paraplast (Sigma ®) e secções histológicas de 3 μm . As secções
518 histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise e descrição da
519 arquitetura tecidual, seguidas das reações histoquímicas de PAS (Ácido Periódico de *Schiff*),
520 para demonstrar a presença de polissacarídeos, muco, substâncias neutras e membranas
521 basais, Tricrômico de Masson (TM) foi utilizado para diferenciação entre colágeno e fibra
522 muscular lisa e Reticulina (método de Gomori), para identificar a presença de fibras
523 reticulínicas, segundo Carson & Hlakik, (2009) e Survarna et al. (2018). Secções do baço
524 foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW) para auxiliar na
525 identificação dos diferentes tipos celulares, assim como diferenciar e caracterizar as polpas
526 brancas e vermelhas. O método de MGGW foi adaptado de Rodrigues et al. (2020). Após
527 desparafinização em estufa ($\sim 56^{\circ}\text{C}$), as secções foram hidratadas em xilol (2 passagens/10
528 min.), álcool 100°GL (2 passagens/1 min.), 95°GL (2 passagens/1 min.), 80°GL (1
529 passagem/1 min.) e 70°GL (1 passagem/1 min.). Posteriormente à secagem, as secções
530 foram coradas por 5 min. em solução de MGGW adicionando-se, posteriormente, água
531 destilada por 10 min. Em seguida, foram lavadas em água corrente, secas e montadas em
532 *entellan*TM (Merck®).

533

534 2.3 Análise da Densidade Volumétrica Estrutural – DVE

535

536 Para análise do tecido renal, foram obtidas cinco imagens em H&E (magnitude de
537 400x; RGB 4096 \times 3286 *pixels*) de cada espécime em um sistema de câmera digital
538 (Opticam LOPT14003) acoplado a um microscópio de campo claro (Zeiss PrimoStar ®).
539 Cada imagem foi sobreposta a uma gradícula contendo 108 intersecções para estimativa da
540 densidade dos túbulos contorcidos proximais (TCP), túbulos contorcidos distais (TCD),
541 corpúsculos renais (CR), ductos coletores (DC) e rede vascular intersticial ou espaço
542 intersticial (EI).

543 No baço, a densidade volumétrica estrutural foi estimada considerando uma imagem
544 (RGB 4096 \times 3286 *pixels*) por animal em magnitude de 100x, nas secções coradas em
545 MGGW. Uma gradícula de 108 intersecções foi adicionada em cada imagem para estimativa

546 do percentual de polpa branca, polpa vermelha, espaço intersticial ou sinusoidal, agregados
547 de melanomacrófagos (MMs) e vasos sanguíneos.

548 Para ambos os órgãos, a DVE foi estimada pela seguinte fórmula: $DVE (\%) =$
549 $(\text{contagem da estrutura}/\text{total de intersecções obtidas}) \times 100$, segundo Rodrigues et al.
550 (2017). O *software* ImageJ 1.48v foi utilizado para essas análises.

551

552 **2.4 Análises Estatísticas**

553

554 Os dados foram analisados de forma descritiva, estimando-se a média, desvio
555 padrão, mediana e quartis 25% e 75%. O IRS e o IES foram correlacionados pelo método de
556 binomial de Pearson com as variáveis biométricas e histométricas. O *software* SPSS 21.0 foi
557 usado para essas análises.

558

559 **3. RESULTADOS**

560

561 **3.1 Análises macroscópica e biométrica**

562 Os exemplares machos de *B. raniceps* analisados apresentaram peso médio de 11,4
563 $\pm 1,5$ g, variando entre 9,1 a 15,4g e o tamanho médio (CRC) de $5,9 \pm 0,3$ cm, variando entre
564 5,4 a 6,9 cm. O peso médio do rim foi de $0,480 \pm 0,005$ g, variando entre 0,037 a 0,059g. O
565 peso médio do baço foi de $0,015 \pm 0,011$ g, variando entre 0,004 a 0,045g. O IES e o IRS
566 foram utilizados para as análises de correlações com os dados biométricos e a densidade
567 volumétrica. O IRS representou 0,42% e o IES em torno de 0,14%, do peso dos indivíduos
568 (Tabela 1).

569

570 **3.2 Anatomia e histologia do tecido renal**

571 Os rins de *Boana raniceps* são estruturas pares, localizados retroperitonealmente
572 próximos aos testículos em sua porção cranial, de formatos alongados, de coloração
573 vermelho escuro e rico em vasos sanguíneos que adentram o parênquima externamente. A
574 artéria renal ramifica-se em vários segmentos menores e mais estreitos (Figura 2a) ao
575 passo que os ramos venosos apresentam trajeto oposto, com drenagem simultânea ao baço
576 (Figura 2b). Paralelamente à veia renal, é possível verificar os ureteres que se direcionam à
577 porção superior do órgão (Figura 2b). A estrutura vascular pôde ser reconhecida nas

578 imagens mesoscópica, as quais revelaram diferenças quanto à densidade tintorial das
579 estruturas. Além disso, conjuntos de ductos coletores, em regiões de aspecto menos denso,
580 podem ser observados junto à região da pelve (Figura 3a).

581 Microscopicamente, os rins apresentam-se uniformes, sem a distinção entre regiões
582 específicas como córtex ou medula. Uma delgada cápsula de tecido conjuntivo recobre
583 externamente todo o órgão. Em algumas ocasiões foi possível identificar a presença de
584 infiltrado agranulocítico periférico à região pélvica vascularizada (Figura 3b). As estruturas
585 analisadas compreenderam os túbulos contorcidos proximais, túbulos contorcidos distais,
586 corpúsculos renais, ductos coletores e espaços intersticiais (incluindo veias, artérias e
587 capilares) (Fig. 3c). Os túbulos contorcidos proximais (TCP) são caracterizados por um
588 epitélio do tipo colunar sendo que internamente, em contato com o lúmen tubular, apresenta
589 uma borda “em escova” bem desenvolvida, destacadas pela reação ao PAS (Figura 3c). Os
590 túbulos contorcidos distais (TCD) não apresentam essa característica, além de possuírem
591 células epiteliais menores. Esses aspectos morfológicos facilitaram a identificação de ambos
592 os tipos tubulares para a análise da densidade estrutural volumétrica. Depósitos
593 intracelulares hialinos de tamanho variável no epitélio tubular proximal foram
594 frequentemente encontrados sem que houvesse associação a lesões focais ou difusas
595 (Figura 3d). Ductos coletores (DC) apresentam epitélio cúbico simples e sem a presença de
596 borda em escova. Essa estrutura, tipicamente tubular, alonga-se junto aos túbulos proximais
597 e distais além de apresentar estreito contato com capilares intersticiais (Figura 3e). Os
598 núcleos de ambos os segmentos apresentam-se homogêneos, centralizados e com
599 nucléolos evidentes.

600 O sangue chega ao rim pelas artérias renais e é distribuído até os corpúsculos
601 renais, os quais desempenham a depuração plasmática. Os corpúsculos consistem na
602 cápsula de Bowman e o glomérulo, sendo este apresentando três tipos de células: os
603 podócitos, as células mesangiais e os capilares sanguíneos glomerulares. A morfologia dos
604 corpúsculos renais está representada na figura 4.

605

606 **3.3 Anatomia e histologia do tecido esplênico**

607

608 O baço é um órgão único situado junto ao mesentério (Figura 2b). Possui aspecto
609 avermelhado devido a grande quantidade de sinusóides presentes em seu parênquima.
610 Externamente é recoberto por uma cápsula de tecido conjuntivo. Na visão mesoscópica, o

611 órgão apresenta-se compacto, com evidentes contrastes entre as regiões ricas em
612 agrupamentos de células agranulocíticas (polpa branca) e granulocíticas (polpa vermelha).

613 As características gerais do tecido esplênico em *Boana raniceps* estão
614 representadas na Figura 5. O tecido esplênico é composto predominantemente pela polpa
615 branca e vermelha. Não há formação nodular para a polpa branca, embora essas se
616 dispersem de forma bem distinta. Diferenças quanto a densidade de ambas as polpas pode
617 variar entre os espécimes (Figura 5 a e b). A polpa vermelha circunda a polpa branca e
618 apresenta alta concentração de células granulocíticas prontamente identificadas pela
619 coloração de MGGW (Figura 5c). Ramos arterial adentra o parênquima via a cápsula
620 esplênica, formada por feixes musculares e fibras reticulínicas, as quais se estendem mais
621 densamente junto à polpa branca em relação à vermelha (Figura 5f). Foram observadas
622 veias difusamente distribuídas em todas as secções histológicas com predominância nas
623 regiões de polpa vermelha.

624

625 **3.4 Análise da Densidade Volumétrica Estrutural**

626

627 As densidades volumétricas estruturais do rim e do baço estão descritas na tabela 2.
628 No rim, a maior parte do parênquima foi composto pelos túbulos contorcidos proximais
629 (TCP) e distais (TCD), com 60,4% e 16,8 %, respectivamente. No entanto, uma alta variação
630 entre os espécimes pode ser observada. No baço, a polpa vermelha foi predominante em
631 relação à demais estruturas observadas, seguida pela polpa branca, com 79% e 12,2 %
632 respectivamente. Ambas apresentaram-se homogêneas quanto à distribuição entre os
633 espécimes.

634 A correlação entre os dados biométricos com a densidade das estruturas renais e
635 esplênicas estão representadas na tabela 3. No rim, o peso corporal e o índice
636 renossomático foram medidas importantes para se estimar possíveis variações no
637 parênquima renal. Contudo, ambas apresentaram-se distintas quanto à associação com os
638 TCP e TCD. TCP e TCD associaram-se negativamente ($r = -0,87$, $p < 0,001$).

639 No baço, o peso corporal e o índice esplenossomático não se correlacionaram às
640 variações na densidade estrutural. Polpa branca e polpa vermelha associaram-se
641 negativamente ($r = -0,98$, $p < 0,001$).

4. DISCUSSÃO

642

643

644 Em anuros o baço é único, de formato oval a circular, coloração avermelhada e está
645 associado ao aparelho digestório e sistemas urogenitais em vertebrados (Romer & Parsons
646 1986). É um órgão linfoide do sistema imunológico, responsável por funções
647 hematopoiéticas e de renovação de hemácias, além de fagocitose, armazenamento e
648 maturação de eritrócitos (Alvarez 1990; Nilsson, 2012). Sabe-se que células esplênicas de
649 anuros são visualizadas a partir de estágio de desenvolvimento 45 (Manning & Horton 1969)
650 e a separação da polpa branca e vermelha, com o aparecimento de células da linhagem
651 hematopoiética é evidenciada no estágio 50 (Manning & Horton 1969). O órgão reduz de
652 tamanho durante a metamorfose voltando a aumentar no período pós-metamórfico através
653 de um mecanismo desconhecido (Neely e Flajnik, 2016).

654

655 A polpa branca está dispersa, sendo circundada pela vermelha e apresentam
656 concentrações inversamente proporcionais (Tabela 3). Em *Ichthyophis kohtaoensis*, *Rana*
657 *perezi* e *Physalaemus nattereri* o padrão de organização de polpa branca e polpa vermelha
658 é difuso, onde células linfoides estão espalhadas pela polpa vermelha, sem que haja uma
659 delimitação da área (Cooper & Wright 1976; Zapata et al. 1982; Álvarez 1990, Franco-
660 Belussi & Oliveira, 2016), diferindo de *Bufo calamita* e *Bombina variegata* que apresentam
661 padrão nodular, assim as polpas são separadas por um septo (Cooper & Wright, 1976;
662 Barrutia et ai. 1983; Dulak 1990). A organização da estrutura esplênica é um caractere
663 filogenético, apresentando-se difusa em espécies basais e nodular em espécies derivadas
664 (Cooper & Wright 1976, Franco-Belussi & Oliveira, 2016). Portanto em *Boana raniceps* o
665 baço não admite um estado plesiomórfico, evidenciando uma diferenciação das duas
666 regiões, apesar de não serem organizadas em nódulos.

666

667 O peso do baço varia de acordo com a fase de desenvolvimento e também sobre a
668 influência de agroquímicos ou pastagens (McMurry *et. al.*, 2009). Com relação aos dados
669 observados o peso médio do baço foi de $0,015 \pm 0,011g$, representando 0,14%, do peso total
670 dos indivíduos (Tabela 1), não correlacionando com o tamanho ou peso do animal (Tabela
671 3). O índice esplenossomático correlaciona-se positivamente com o peso do órgão (Tabela
672 3), indicando que o crescimento é proporcional ao ganho de peso do animal na fase adulta.

672

673 Trabéculas de tecido conjuntivo invadindo o parênquima esplênico foram observadas
674 em *B. raniceps*, diferindo do baço de *Pelophylax bedriagae* (Akat, 2018). Os feixes de tecido
675 conjuntivo são comuns em baços de mamíferos, que adentram ao órgão e associam-se as
676 células musculares lisas (Connolly et al. 1999, Mebius & Kraal 2005, Cesta, 2016),
677 características relacionadas ao controle do volume sanguíneo interno do baço (Barcroft,
1925). O baço de *Boana raniceps* apresenta fina cápsula fibrosa, trabéculas associadas a

678 feixes musculares e fibras reticulínicas, evidenciando uma pequena capacidade de
679 contração, dados observados em *P. bedriagae* (Akat, 2018).

680 Nos anuros os rins desenvolvem-se a partir do mesoderma intermediário (Vize et al.
681 1995; Dressler 2006; Attia et al. 2012) e apresentam-se em pares de órgãos bilateralmente
682 simétricos compartilhando a unidade funcional básica de todos os rins de vertebrados, o
683 néfron, padrões observados em *Boana raniceps* (Figuras 3 e 4). O crescimento do rim
684 durante a metamorfose acompanha o crescimento corporal, aumentando o número de
685 néfrons e a complexidade renal, alterando de pronefros para mesonefros (Droz e
686 McLaughlin, 2017). O índice renossomático em *B. raniceps* apresentou correlação negativa
687 com o peso do indivíduo, indicando que o desenvolvimento renal estabiliza em determinado
688 período da fase adulta, enquanto o ganho de peso e o crescimento corporal continuam
689 (Tabela 2).

690 Os anuros vivem grande parte de suas vidas na água doce e seus fluidos corporais
691 são mais concentrados que o meio aquático em que vivem, dessa forma, ganha
692 constantemente água e perdem sais para o ambiente, apresentando concentração de íons
693 plasmáticos relativamente constantes frente as variações do hábitat (Bradley, 2009),
694 portanto como na maioria dos vertebrados, eles são osmorreguladores e eliminam o
695 excesso de água em sua urina, que é diluída (Randall *et al.*, 2000). O NaCl perdido é
696 recuperado através da alimentação e por transporte ativo realizado por proteínas presentes
697 em seu tegumento (Hildebrand, 1995), desta maneira a pele funciona como principal órgão
698 osmorregulador na fase adulta, além de participar de processos fisiológicos como trocas
699 gasosas e produção de secreções.

700 Tanaka *et al.* (2005) e Suzuki *et al.* (2015) descreveram padrões de distribuição e
701 expressão de aquaporinas, proteínas presentes na pele ventral e bexiga urinária de anuros
702 que contribuem para a absorção e translocação de água e sais através das células epiteliais
703 destas regiões. Anfíbios com hábitos aquáticos expressam menos grupos de aquaporinas
704 em sua pele pélvica, devido ao contato direto com a água, já pererecas arborícolas possuem
705 mais grupos de aquaporinas para a absorção hídrica, indicando que estes animais estão
706 aptos a viverem em ambientes com pouca água (Tanaka, T. *et al.*, 2005).

707 Desta maneira o hábito arborícola de *Boana raniceps* indica a relevância da pele
708 pélvica na osmorregulação destes animais, explicando a correlação negativa entre o ganho
709 de peso e aumento corpóreo dos indivíduos e estruturas renais como corpúsculo e túbulo
710 contorcido distal (Tabela 2). Pode-se inferir que conforme o organismo cresce, ocorre um
711 aumento da superfície da pele pélvica, expressando mais aquaporinas, e a função
712 osmorregulatória principal é transferida para a pele e as proporções de algumas estruturas
713 renais são alteradas.

714 Os nefróns apresentam uma extremidade em forma de funil peritoneal conectado a
715 uma estreita abertura tubular fortemente ciliada, a cápsula de Malpighi é anexada
716 lateralmente a esse túbulo, dividindo-se em túbulo contorcido proximal e túbulo contorcido
717 distal, separados por um segmento de junção equivalente à alça de Henle observada nos
718 néfrons de mamíferos e de aves (Gray, 1932). Apesar dos anuros não apresentarem a alça
719 de Henle a porção anterior do túbulo distal corresponde filogeneticamente ao ramo espesso
720 ascendente da alça de Henle dos mamíferos, por apresentar ação de *diuréticos de alça*,
721 auxiliando na redução da reabsorção de água na porção final do túbulo distal e ducto coletor
722 (Greger, 1985; Alves, 2002).

723 Em anuros arborícolas é observado um grupo de aquaporinas (AQP2) encontradas
724 nos túbulos contorcidos distais e ductos coletores (Ogushi et al., 2007) que auxiliam no
725 transporte de água e íons sob ação de hormônios antidiuréticos como a vasotocina,
726 característica também observada em mamíferos (Kortenoeven e Fenton, 2014), no entanto o
727 gene para aquaporinas está ausente em *Xenopus tropicalis* (Suzuki e Tanaka, 2009; Shibata
728 et al., 2014). Em *B. raniceps* as proporções de túbulos contorcidos distais diminuem
729 conforme o indivíduo cresce (Tabela 2), dada a colaboração desta região para a formação
730 de uma urina diluída e a necessidade de o equilíbrio hídrico no ambiente terrestre, evitando
731 a perda de água.

732

733 5. CONCLUSÃO

734

735 A descrição histológica realizada neste trabalho colaborou para conhecimento sobre
736 a espécie *Boana raniceps* e foi possível conhecer sobre os parâmetros para tal.
737 Histologicamente o tecido renal e esplênico de é semelhante aos demais anfíbios, diferindo
738 de algumas espécies em relação às organizações celulares. No tecido renal, as diferenças
739 nas densidades estruturais indicam que este órgão sofre mudanças ao longo do
740 desenvolvimento do indivíduo. Cada estrutura tem uma função específica e pode se alterar
741 conforme o ambiente em que vive. Já o tecido esplênico, apresentou estruturas bem
742 definidas, e suas correlações podem indicar que o órgão pode sofrer mudanças em sua
743 morfologia durante o crescimento. Estudos relacionados a órgãos hematopoiéticos são
744 promissores para a avaliação dos animais, visto que são estruturas que sofrem influências
745 diretas do ambiente em que vivem. Assim, este trabalho pode servir como um padrão para
746 esta espécie para próximos estudos.

747

748 **AGRADECIMENTOS**

749 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida
 750 durante o período do mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
 751 PPGBA-UFMS, e ao Laboratório de Patologia Experimental – LAPEX.

752

753 **6. FIGURAS E TABELAS**

754

755

756

757

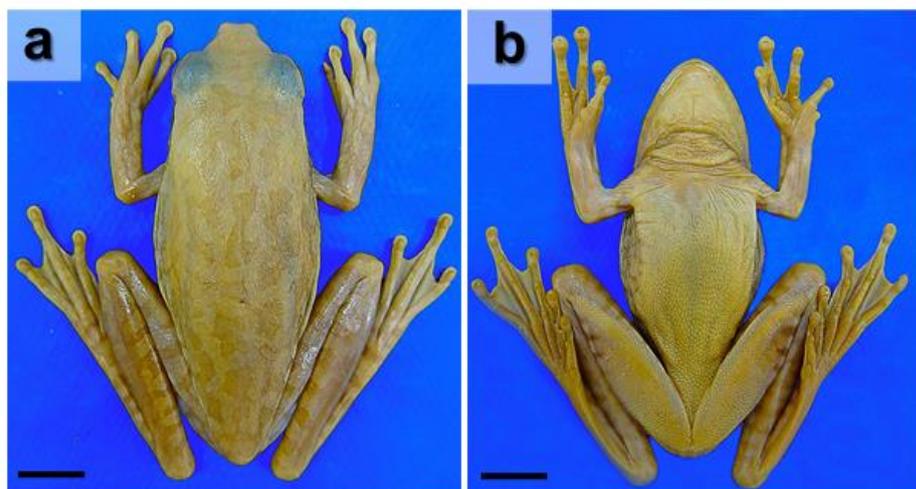
758

759

760

761

762



763 **Figura 1.** *Boana raniceps*, (a) em vista dorsal e (b) em vista ventral.

Tabela 1: Estatísticas descritivas para variáveis biométricas obtidas de *Boana raniceps* (n=17) do pantanal sul-matogrossense.

	Média	DP	Min.	Max.	IC 95%
Peso (g)	11,4	1,5	9,1	15,4	10,6 - 12,2
CRC (cm)	5,9	0,3	5,4	6,9	5,7 - 6,1
Peso do baço (g)	0,015	0,011	0,000	0,050	0,009 - 0,021
Peso do rim (g)	0,480	0,005	0,037	0,059	0,048 - 0,050
Índice Esplenossomático (%)	0,14	0,12	0,04	0,49	0,07 - 0,20
Índice Renossomático (%)	0,42	0,06	0,31	0,52	0,41 - 0,44

DP = desvio padrão; Min. = valor mínimo; Max. = valor máximo encontrado
 IC 95% = Intervalo de Confiança 95%

764

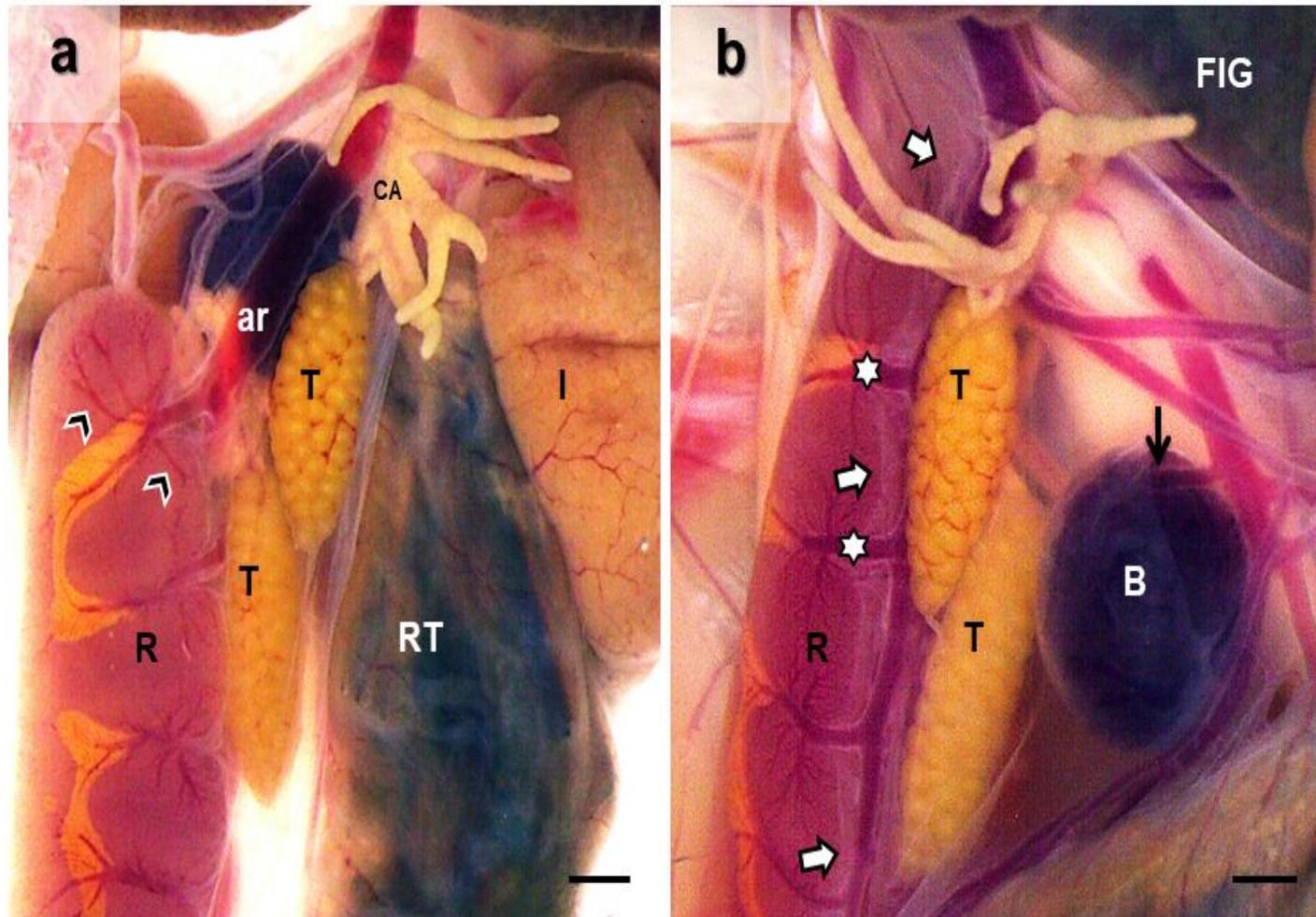


Figura 2. Imagem macroscópica da cavidade abdominal de *Boana raniceps* identificando: R – rim, ar – artéria e as ramificações menores (cabeça de seta), ramos venosos (asteriscos), ureteres (setas brancas); B – bço note a artéria adentrando-se na capsula (seta); T – testículos; CA - corpo adiposo; RT - reto; I - intestino; FIG - fígado. Barra = 1 cm.

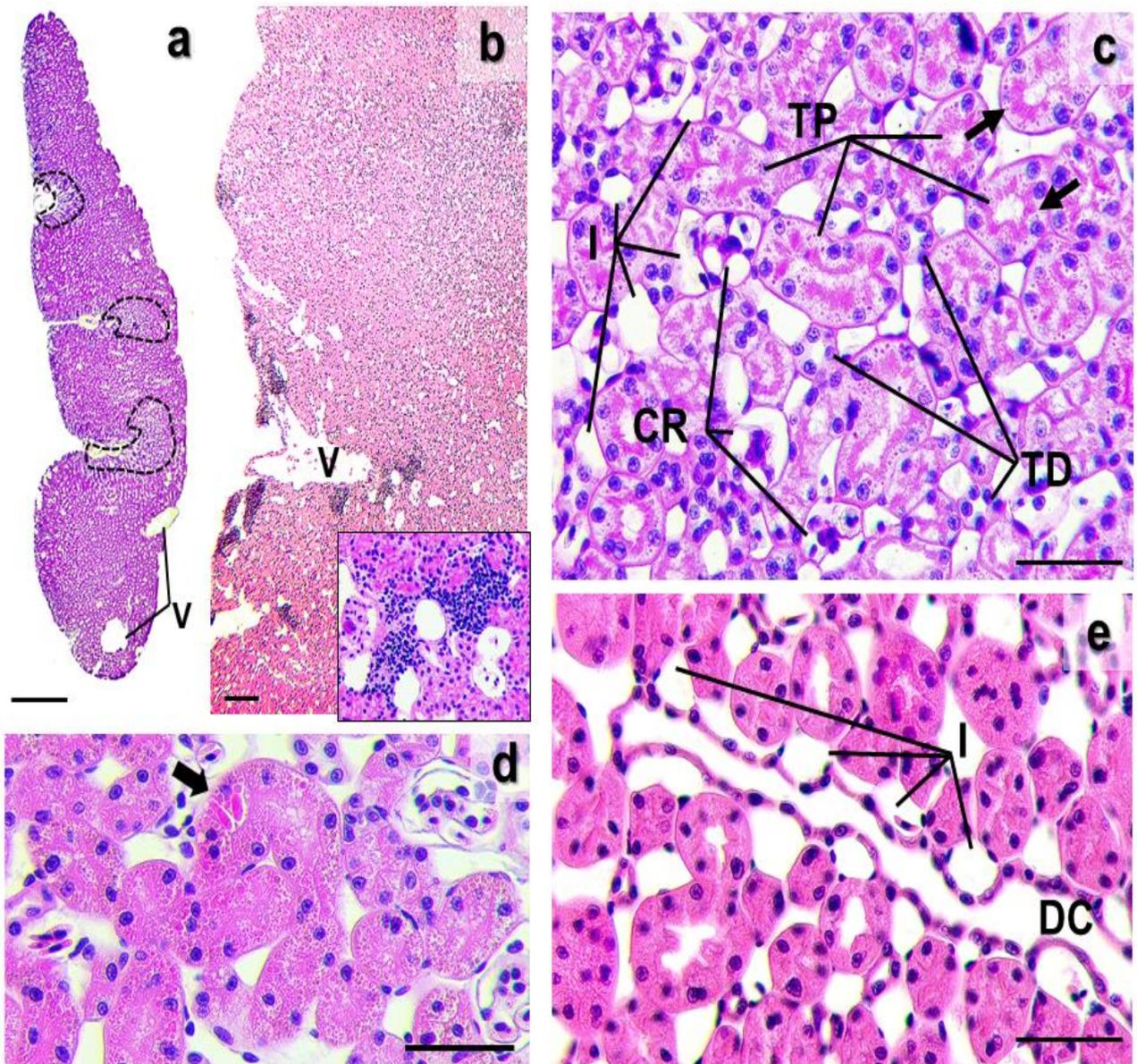


Figura 3. Representação mesoscópica e secções histológicas do rim de *Boana raniceps*. Em **(a)** áreas demarcadas mostram maior densidade de ductos coletores coincidindo com regiões pélvicas; V, vasos sanguíneos; HE, barra = 0,1 mm. **(b)**, imagem em menor aumento da região da pélvis renal; no detalhe infiltrado agranulocítico perivascular; V, vasos sanguíneos; HE, barra = 200 µm. **(c)**, caracterização morfológica do parênquima e estroma renais; I, capilares intersticiais revestidos internamente por um endotélio; CR, corpúsculo renal; TP, túbulo contorcido proximal - note a borda epitelial em escova (seta); TD, túbulo contorcido distal; PAS, barra = 50 µm. **(d)**, TP apresentando depósitos hialinos goticulares (seta); HE, barra = 50 µm. **(e)** aspectos do parênquima renal evidenciando um ducto coletor (DC) – note a formação epitelial cúbico simples, rico em capilares vasculares intersticiais (I) adjacentes; HE, barra = 50 µm.

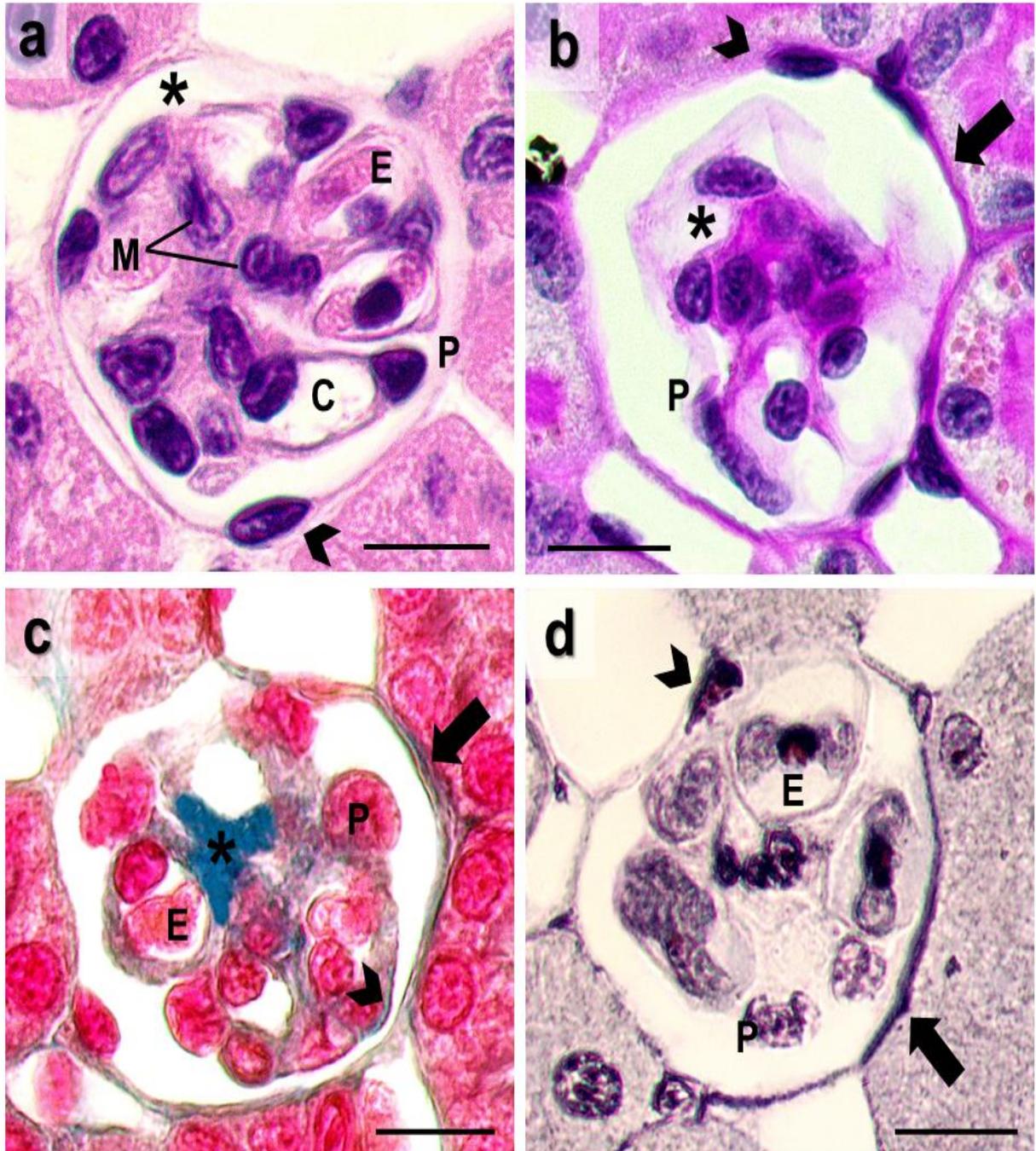


Figura 4. Corpúsculos renais de *Boana raniceps*. **(a)**, a estrutura é composta pela cápsula de Bowman (lâmina basal parietal) formada por células epiteliais parietais (P), com núcleos bem evidentes (cabeça de seta); abaixo da cápsula observa-se o espaço glomerular ou urinário (asterisco); o glomérulo encontra-se centralizado observando-se a presença dos podócitos (P); células mesangiais (M) conectadas à matriz mesangial e capilares sanguíneos (C) com a presença eventual de eritrócitos (E); HE. **(b)**, lâmina basal parietal (seta) e matriz mesangial (asterisco) positivamente marcada pela reação histoquímica ao ácido periódico de Schiff; PAS. **(c)**, matriz mesangial apresenta reação positiva para colágeno tipo I (asterisco), seguida por fraca reação na lâmina basal parietal (seta) quanto visceral (cabeça de seta); núcleos dos podócitos coram-se em vermelho (P); eritrócitos (E); Tricrômico de Masson (TM). **(d)**, lâmina basal parietal apresenta moderada marcação para colágeno tipo III (seta); núcleo de uma célula epitelial parietal (cabeça de seta); núcleo eritrocitário (E); podócitos (P); Reticulina (método de Gomori); barra = 10 μ m.

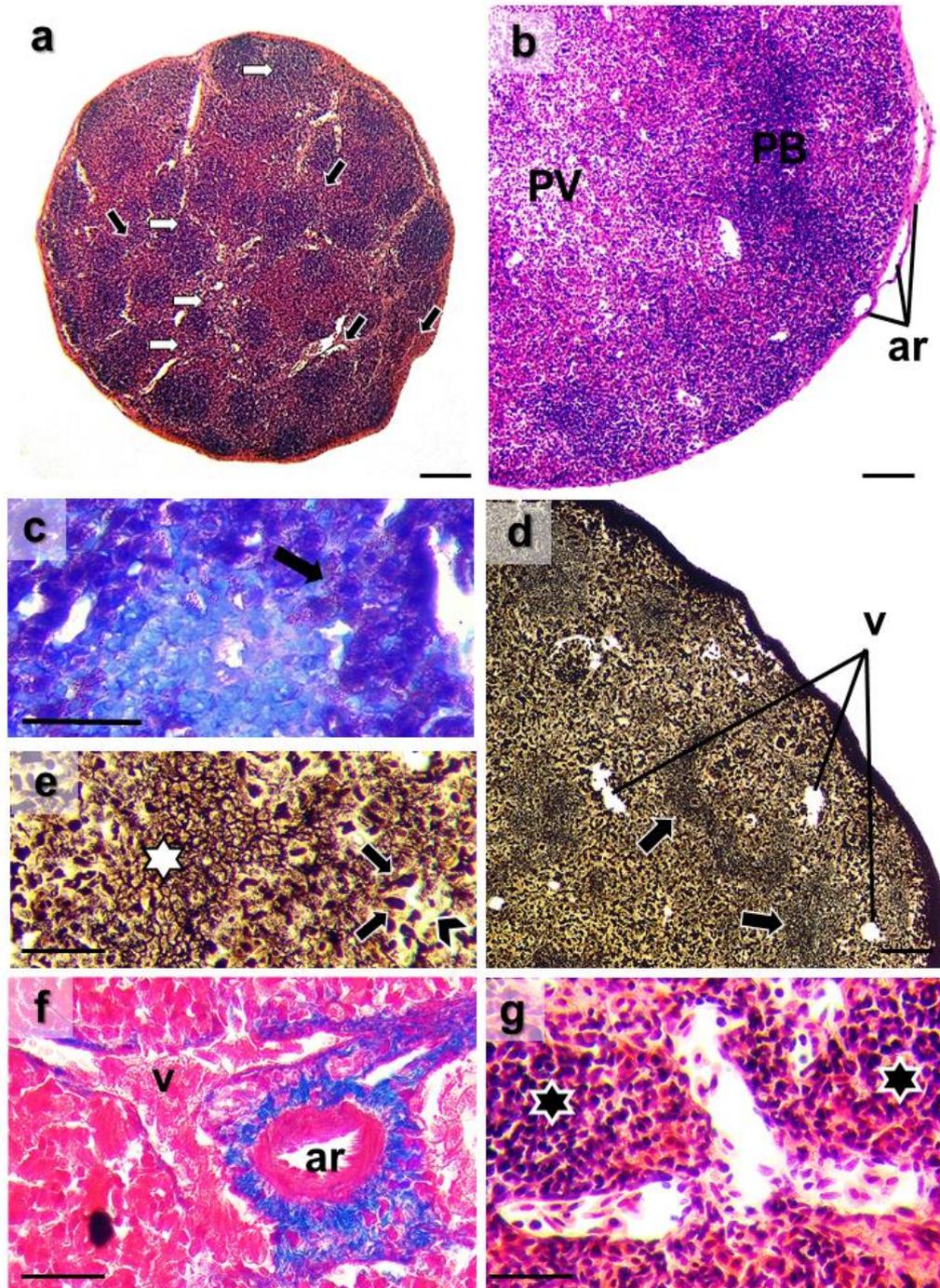


Figura 5. Representação mesoscópica e secções histológicas do baço de *Boana raniceps* em diferentes colorações. Em **a**, parênquima com destaque para as polpas brancas (setas brancas) e vermelhas (setas pretas); cápsula apresenta marcada coloração eosinofílica; Hematoxilina & Eosina (HE). **(b)** as polpas vermelhas (PV) são mais frouxas enquanto que as polpas brancas (PB) são notadamente mais densas; ramos arteriais (ar) adentram o tecido via cápsula; HE, barra = 100 μ m. **(c)**, linfócitos mostram núcleos azuis claros enquanto granulócitos apresentam núcleos fortemente basofílicos com citoplasma eosinofílico (seta); MGGW, barra = 50 μ m. **(d)**, observa-se o detalhe das fibras reticulares distribuídas internamente na polpa branca (seta) e das veias (v) junto à polpa vermelha; **(e)** detalhe da polpa branca (asterisco) evidenciando a rede de fibras reticulares densamente dispostas; cordões esplênicos (setas) envolvem um vaso sinusoidal (cabeça de seta); reação histoquímica para Reticulina (método de Gomori); barra = 50 μ m. **(f)**, detalhe de um ramo da veia esplênica (v), ao lado de uma arteríola esplênica (a) com marcação positiva (cor azul) para colágeno tipo 1; TM, barra = 50 μ m. **(g)**, segmento de veia esplênica localizada entre duas polpas brancas (asterisco); HE, barra = 50 μ m.

Tabela 2. Estatísticas descritivas para densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico de *Boana raniceps* (n=17) do pantanal sul-matogrossense.

Rim	Média	DP	Mediana	Quartis	
				25%	75%
Túbulo contorcido proximal	60,4	21,1	67,0	56,0	73,0
Túbulo contorcido distal	16,8	18,5	11,0	7,4	17,0
Corpúsculo renal	6,7	6,9	4,2	0,2	12,0
Ducto coletor	1,3	3,2	0,0	0,0	0,0
Espaço Intersticial	14,6	7,9	13,0	9,3	19,0
Baço					
Polpa vermelha	83,8	8,8	85,2	84,3	87,8
Polpa branca	12,2	8,4	11,1	9,3	12,0
Centro de melanomacrófagos	0,7	0,8	0,4	0,0	1,6
Espaço Intersticial	1,5	1,4	1,9	0,0	2,6
Vasos sanguíneos	1,9	1,5	1,9	0,0	2,8

DP = desvio padrão;

Tabela 3: Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis biométricas e densidade volumétrica estrutural do tecido renal e esplênico em *Boana raniceps* (n=17) do pantanal sul-mato-grossense.

Rim	Peso do rim (g)	CRC (cm)	IRS (%)	TCP (%)	TCD (%)	CR (%)	DC (%)	I (%)
Peso corporal (g)	ns	0,71 ^{**}	-0,66 ^{**}	0,36 ^{**}	-0,31 ^{**}	-0,23 [*]	ns	ns
Peso do rim (g)	--	ns	0,58 ^{**}	ns	ns	ns	ns	ns
CRC (cm)	--	--	-0,40 ^{**}	ns	ns	ns	ns	ns
IRS (%)	--	--	--	-0,25 [*]	0,23 [*]	ns	ns	ns
TCP (%)	--	--	--	--	-0,87 ^{**}	-0,29 ^{**}	ns	-0,43 ^{**}
TCD (%)	--	--	--	--	--	ns	ns	ns
CR (%)	--	--	--	--	--	--	-0,26 [*]	ns
DC (%)	--	--	--	--	--	--	--	ns

Baço	Peso do baço (g)	CRC (cm)	IES (%)	PB (%)	PV (%)	CMMs (%)	Vasos (%)	I (%)
Peso corporal (g)	ns	0,71 ^{**}	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Peso do baço (g)	ns	ns	0,98 ^{**}	ns	ns	ns	ns	ns
CRC (cm)	--	--	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IES (%)	--	--	--	ns	ns	ns	ns	ns
PB (%)	--	--	--	--	-0,98 ^{**}	ns	ns	ns
PV (%)	--	--	--	--	--	ns	ns	ns
CMMs (%)	--	--	--	--	--	--	ns	ns
Vasos (%)	--	--	--	--	--	--	--	ns

CRC = comprimento rostro-cloacal; IRS = índice renossomático; TCP = túbulo contorcido proximal;

TCD = túbulo contorcido distal; CR = corpúsculo renal; DC = ducto coletor; I (interstício);

IES = índice esplenossomático; PB = polpa branca; PV = polpa vermelha; CMMs = centro de melanomacrófagos;

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

7. REFERÊNCIAS

- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.
- AKAT, E. Histological characteristics of the pancreas and spleen of *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Biharean Biologist* 12 (2): 102-105, 2018.
- ALHO, C. J. R. The Pantanal. The world's largest wetlands. In: Lauchlan, H., Fraser, L.H., Keddy, P.A., editors. *Ecology and onservation*. Cambridge University Press; p.203–71, 2005.
- ALHO, C. J. R.; GONÇALVES, H. C. Biodiversidade do Pantanal: Ecologia & Conservação. 1ª ed. Campo Grande: Editora UNIDERP, p. 145. ISBN 858739294-8, 2005.
- ALVAREZ, R. An ultrastructural study of the spleen of the ranid frog *Rana perezii*. *Journal of morphology*, v. 204, n. 1, p. 25-32, 1990. doi:10.1002/(ISSN)1097-4687
- ARIKAN, H., ÇIÇEK, K. Haematology of amphibians and reptiles: A review. *North-Western journal of zoology*, v. 10, n. 1, 2014.
- ATTIA, L., YELIN, R., SCHULTHEISS, T.M. Analysis of nephric duct specification in the avian embryo. *Development* 139:4143–4151, 2012.
- BARCROFT, J., HARRIS, H.A., ORAHOVATS, D., WEISS, R.: A contribution to the physiology of the spleen. *The Journal of Physiology* 60(5-6): 443-456, 1925.
- BARRUTIA, M. S. G.; VILLENA, A.; GOMARIZ, R. P.; RAZQUIN, B. & ZAPATA, A. Ultrastructural changes in the spleen of the natterjack, *Bufo calamita*, after antigenic stimulation. *Cell and tissue research*, v. 239, n. 2, p. 435-441, 1985.
- BARRUTIA, M.S., LECETA, J., FONFRÍA, J., GARRIDO, E., ZAPATA, A. Nonlymphoid cells of the anuran spleen: an ultrastructural study in the natterjack, *Bufo calamita*. *The American Journal of Anatomy* 167:83–94, 1983. doi:10.1002/aja.v167:1
- BLAUSTEIN, A. R. Chicken little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica*, v. 50, n. 1, p. 85-97, 1994.
- ÇAKICI, Ö. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 67, n. 3, p. 237-243, 2015.
- CAMPIÃO K. M. Influência das características ambientais na comunidade de helmintos parasitas de *Leptodactylus podicipinus* (Anura, Leptodactylídeos) de lagoas do Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Programa de Pós-

- Graduação em Ecologia e Conservação. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 31p, 2010.
- CAMPIAO, K. M.; DIAS, O. T.; SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L.; TAVARES, L. E. Living apart and having similar trouble: frog helminth parasites determined by the host or by the habitat? *Canadian Journal of Zoology (Online)*, v. 94, p. 761-765, 2016.
- CAMPIAO, K. M.; NUNES, M. D.; RODRIGUES, R. B.; SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L. The effect of local environmental variables in the helminth parasite communities of the pointedbelly frog *Leptodactylus podicipinus* from ponds in the pantanal wetlands. *The Journal of Parasitology*, v. 98, p. 229-235, 2012.
- CARSON, A. F., & HLADIK, L. C. (2009). *Histotechnology: A selfinstructional text*. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press.
- CECCATO, E. CRAMP, R. L. SEEBACHER F., FRANKLIN, C.E. Early exposure to ultraviolet-B radiation decreases immune function later in life. *Conservation physiology*, v. 4, n. 1, 2016.
- CESTA, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology* 34(5): 455-465, 2006.
- CONNOLLY, J.H., CANFIELD, P.J., MCCLURE, S.J., WHITTINGTON, R.J. Histological and immunohistological investigation of lymphoid tissue in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *The Journal of Anatomy* 195(2): 161-171, 1999.
- COOPER, E.L, WRIGHT, R.K. The anuran amphibian spleen. An evolutionary model for terrestrial vertebrates. In: Battisto JR, Streilein JW, editors. *Immuno-Aspects of the Spleen*. Amsterdam: Elseviermorth-Holland Biomedical Press. pp. 47–58, 1976.
- DE OLIVEIRA, C.; SANTOS, L. R. de S.; ZIERI, R. Variações anatômicas no aparelho reprodutor masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). *Biota Neotrop*, Campinas, v. 7, n. 1, 2007.
- DELATORRE, M.; CUNHA, N. L.; RAIZER, J.; FERREIRA, V. L. Evidence of stochasticity driving anuran metacommunity structure in the Pantanal wetlands. *Freshwater Biology (Print)*, v.60, p. 2197-2207, 2015.
- DRESSLER, G. R. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:509–529, 2006.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 1986
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. *Biology of amphibians*. New York: McGraw-Hill. 670p. 1999.
- DULAK, J. The architecture of the spleen of the yellow-bellied toad, *Bombina variegata*. *Journal of Zoology*, v. 221, n. 3, p. 489-498, 1990.

- FERREIRA, A. DOS SANTOS ROSA, A. B.; MEHANNA, M. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 31, n. 4, p. 447-452, 2009.
- FICETOLA, G. F.; BERNARDI, F. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation*, v. 119, p. 219-230, 2004.
- FRANCO-BELUSSI, L., DE OLIVEIRA, C. The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia: Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -melanocyte stimulating hormone. *Italian Journal of Zoology* 83(3): 298-305, 2016.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (04/26/2022 02:47pm). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. *Histologia comparada*. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998.
- GRAY, P. Memoirs: the development of the amphibian kidney. The development of the kidney of triton vulgaris and a comparison of this form with *Rana temporaria*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. s2-75, p.425-465, 1932.
- GREGER, R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiological Reviews*, v.65, p.760-793, 1985.
- GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; GOMES, F. R.; OLIVEIRA, C. Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquatic Toxicology*, v. 176, p. 181-189, 2016.
- GÜL, Ç.; TOSUNOĞLU, M.; ERDOĞAN, D. Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica*, v. 6, n. 2, p. 137-147, 2011.
- HADDAD, C.F.B. Uma análise da lista brasileira de anfíbios ameaçados de extinção. Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, v. 2, p. 287-295, 2008.
- JUNK, W.J. & CUNHA, C.N.D. Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. *Ecol. Eng.* 24:391-401. 2005.
- KORTENOEVEN, M. L., AND FENTON, R. A. Renal aquaporins and water balance disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 1533–1549, 2014.
- LANDGREF-FILHO P. Padrões reprodutivos de anfíbios anuros em um agroecossistema no estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de

- Mato Grosso do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 36p, 2009.
- LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev. Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*. v. 8, n.4, p. 469-484. 2010.
- MANNING, M. J. E HORTON, J.D. Histogenesis of lymphoid organs in larvae of the South African clawed toad, *Xenopus laevis* (Daudin). *J Embryol Exp Morphol*. 22:265–77. [PubMed: 5361557], 1969.
- MCMURRY, S. T., SMITH, L. M., DUPLER, K. D., & GUTIERREZ, M. B. Influence of Land Use on Body Size and Splenic Cellularity in Wetland Breeding Spea spp. *Journal of Herpetology*, 43(3), 421–430, 2009.
- MEBIUS, R.E., KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* 5(8): p. 606-616, 2005.
- MØBJERG, N.; LARSEN, E. H.; JESPERSEN, Å. Morphology of the kidney in larvae of *Bufo viridis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Journal of Morphology*, v. 245, n. 3, p. 177-195, 2000.
- NEELY, H. R., & FLAJNIK, M. F. Emergence and Evolution of Secondary Lymphoid Organs. *Annual review of cell and developmental biology*, 32, 693–711. 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125306>
- NILSSON, S. Autonomic nerve function in the vertebrates. Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media, vol. 13, 2012.
- OGUSHI, Y., MOCHIDA H., NAKAKURA T., SUZUKI M., AND TANAKA S. Immunocytochemical and phylogenetic analyses of an arginine vasotocin-dependent aquaporin, AQP-h2K, specifically expressed in the kidney of the tree frog, *Hyla japonica*. *Endocrinology* 148: 5891–5901, 2007.
- PASSANTINO, L., SANTAMARIA, N., ZUPA, R., POUSIS, C., GAROFALO, R., CIANCIOTTA, A., & CORRIERO, A. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases*, v.37, n.3, p. 241-250, 2014.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L. T.; OLIVEIRA, C.; SEBASTIÁN, N. G. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 23, p. 9852-9861, 2016.
- PHILLIPS, K. Where have all the frogs and toads gone? *BioScience*, v. 40, n. 6, p. 422-425, 1990.

- PIATTI, L. Comunidade e dieta de anuros (Amphibia, Anura) em um agroecossistema no município de Miranda, Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul: Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 58p, 2009.
- PITCHAPPAN, R. M. On the phylogeny of splenic structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 4, p. 395-416, 1980.
- POUGH, F.H.; CHRISTINE, M.J.; HEISER J.B. A vida dos vertebrados. 3ª ed. Atheneu, São Paulo. 699p., 2003.
- PRADO C. P. A.; HADDAD C. F. B. Size-fecundity relationships and reproductive investment in female frogs in the Pantanal, southwestern Brazil. *Herpetological Journal*, v.15, p. 181-189, 2005.
- PRADO C. P. A.; UETANABARO M.; LOPES F. S. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brazil. *Journal of Herpetology*, v. 38, p.135-139, 2000.
- PRADO C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. Breeding activity patterns, reproductive modes and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia*, v. 26, p. 211-221, 2005.
- PRADO C. P. A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. F. Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of reproductive specialization toward territoriality in the genus. *Copeia*, v. 04, p.1128-1133, 2002.
- RODRIGUES, R. A., SATURNINO, K. C., & FERNANDES, C. E. (2017). Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming. *Aquaculture Research*, 48, 1–11.
- RODRIGUES, R. A., SIQUEIRA, M. S., MARTINS, B. O., FERNANDES, C. E., FRANCO BELUSSI, L., & PROVETE, D. B. (2020). *Staining of fish red blood cells*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bd9yi97w>.
- ROLLINS-SMITH, L. A., RAMSEY, J. P., PASK, J. D., REINERT, L. K., & WOODHAMS, D. C. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integrative and comparative biology*, v. 51, n. 4, p. 552-562, 2011.
- ROMER, A. S. E PARSONS, T. S. Anatomia Comparada dos Vertebrados. 5 ed. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo Ltda., 559p. 1985.
- SAXÉN, L. Organogenesis of the Kidney. Cambridge University Press, 1987.
- SHIBATA, Y., SANO, T., TSUCHIYA, N., OKADA, R., MOCHIDA, H., TANAKA, S., AND SUZUKI, M. Gene expression and localization of two types of AQP5 in *Xenopus*

- tropicalis under hydration and dehydration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307: R44–56, 2014.
- SUGAI, J. L. M.; TERRA, J. S.; FERREIRA, V. L. Diet of *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) in the Pantanal of Miranda river, Brazil. *Biota Neotropica* (Online. Edição em Inglês), v. 12, p. 1-1, 2012.
- SUVARNA, K. S.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Ed.). Bancroft's theory and practice of histological techniques E-Book. Elsevier Health Sciences, 2018
- SUZUKI, M., AND TANAKA, S. Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 153: 231–241, 2009.
- THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; Jaritkhuan, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental pollution*, v.121, p.307 - 320, 2003.
- TROMBETA, A. M. Estudo da helmintofauna de anfíbios das famílias Ceratophryidae, Leptodactylidae e Leiuperidae do Pantanal Sul, Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências. Botucatu, São Paulo. 54p, 2008.
- TURNER R. J. *Amphibians*. In: Rowley A., Ratcliffe N. (eds), *Vertebrate Blood Cells*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 129–209, 1988.
- VIZE, P.D., JONES, E.A., PFISTER, R. Development of the *Xenopus* pronephric system. *Dev Biol* 171:531–540, 1995.
- YAPARLA, Amulya et al. Immune system organs of amphibians. 2017.
- ZAPATA, A. G., TORROBA, M., SACEDON, R., VARAS, A. & VICENTE, A. Structure of the lymphoid organs of elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, v. 275, n. 2-3, p. 125-143, 1996.

