ANATOMIA E AVALIAÇÃO SAZONAL HISTOMORFOMÉTRICA DO FÍGADO DE *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiide)

[1]ANA G. M. CIPRIANO, [2]ÉRICA S. MACIEL, [3]LILIAN FRANCO-BELUSSI, [4]RODRIGO ZIERI

[1]Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas -Bolsista PIBIFSP. Lab. de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos – IFSP Barretos. anagabrielimurillo@gmail.com
[2] Doutoranda PPG em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres USP-FMVZ.
[3]Docente UFMS - Laboratório de Patologia Experimental (LAPEx), Instituto de Biociências – Campo Grande - MS
[4]Docente IFSP Barretos - Laboratório de Ensaios Ecotoxicológicos de Animais Aquáticos - IFSP Barretos.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.02.02.00-7 Morfologia dos Grupos Recentes

RESUMO: O fígado é maior glândula encontrada dos vertebrados, podendo variar entre diversos grupos animais, de acordo com o hábito, estágio de vida e período do ano. Trabalhos a respeito da morfologia hepática são escassos, principalmente se tratando de teídeos como o *Ameiva ameiva*, comum no território brasileiro e abundante na região norte do estado de São Paulo. Neste trabalho descrevemos a anatomia hepática e analisamos alterações histomorfométricas de células hepáticas de machos da espécie *Ameiva ameiva* (Teiidae), ao longo das estações do ano, em 20 machos adultos de *A. ameiva* (cinco/estação) na região de Olímpia – SP. Os dados foram submetidos às analises estatísticas conduzidas no software R versão 2.11.1. Após incisão mediana da região ventral, o fígado foi removido e fotografado para descrição anatômica e fragmentos foram levados à rotina histológica para analises histomorfométicas do tecido hepático. De um modo geral, o fígado de *A. ameiva* é dividido em dois lobos, semelhante ao para outros lagartos. Dos parâmetros histológicos analisados o volume e área celular tiveram valores mais expressivos no outono e inverno, o que pode estar relacionado à estocagem de nutrientes e a relação núcleo-citoplasmática (RNC) foi maior na primavera, sugerindo maior atividade nuclear nesse período.

PALAVRAS-CHAVE: morfometria; histologia, réptil, história natural; lagarto.

ANATOMY AND SEASONAL HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION OF THE LIVER OF *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiide)

ABSTRACT: The liver is the largest gland found in vertebrates, and it can vary among different animal groups depending on habit, life stage and, season of the year. Studies on liver morphology are scarce, especially regarding teiids like *Ameiva ameiva*, which is common in Brazilian territory and abundant in the northern region of São Paulo state. In this study, we describe the hepatic anatomy and analyze histomorphometric changes in liver cells of male *Ameiva ameiva* (Teiidae) throughout the seasons, using 20 adult males of *A. ameiva* (five per season) from the region of Olímpia, SP. Statistical analyses were conducted using R software version 2.11.1. After median incision in the ventral region of the body cavity, the liver was removed and photographed for anatomical description and, liver fragments were taken for histological routine to perform histomorphometric analyses of the tissue. Generally, the liver of *A. ameiva* is divided into two lobes, similar to other lizards. Among the histological parameters analyzed, cell volume and area were higher in autumn and winter, which may be related to nutrient storage, and the nuclear-cytoplasmic ratio (NCR) was higher in spring, suggesting increased nuclear activity during this period.

KEYWORDS: morphometry; histology, reptile, natural history; lizard.

INTRODUÇÃO

Os répteis foram os primeiros tetrápodes a apresentarem características morfofisiológicas distintas que os permitiram viver plenamente em ambiente terrestre (Pough *et al*., 2008). Sua grande diversidade deu origem a quatro ordem. Neste estudo a ordem Squamata foi a selecionada, em específico o lagarto *Ameiva ameiva*, pois além de ser um grupo de fácil acesso pois são amplamente distribuídos pelo estado de São Paulo na região de cerrado. Ao longo das estações do ano, esses animais exibem determinados comportamentos que dependem de fatores endógenos como alterações hormonais e exógenos como temperatura, umidade e quantidade de alimento (Rodrigues *et al*., 2003; Pombal; Haddad, 2005), recrutando reservas energéticas armazenadas no fígado, ocasionando mudanças funcionais e estruturais neste órgão (Chaves, 2017).

O fígado é a maior e uma das principais glândulas encontradas nos vertebrados dentre suas funções principais, está o processamento de nutrientes absorvidos pelo sistema digestório, a fim de que possam ser utilizados por outros órgãos, secreção da bile, armazenamento de glicogênio e lipídios, síntese de proteínas e metabolismo de compostos exógenos (Crawshaw; Weinkle, 2000; Hinton *et al*., 2001), podendo variar de acordo com o hábito ou estágio de vida dos organismos (Inoue; Akiyosh, 2003; Rodrigues *et al*., 2017). Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi descrever a anatomia, histologia e a histometria hepática de indivíduos machos e adultos de lagartos da espécie *A. ameiva*, coletados na região de Olímpia-SP ao longo das estações do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte machos adultos de *A. ameiva* foram coletados por meio de busca ativa (cinco/estação) na zona rural da região de Olímpia – SP (licença: 59560-1/SISBIO). Os animais foram aclimatados durante 15 dias no laboratório de Anatomia Comparativa (IFSP- Campus Barretos) em temperatura ambiente (± 23.6°C - climate-data.org) e fotoperíodo natural, alimentados com frutas e minhocas *ad libitum*. Então, os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (1mL/ mL) e eutanasiados com cloreto de potássio (KCl) injetado no coração. Após incisão mediana da cavidade abdominal, tiveram o fígado removido, fotografado e fragmentos foram fixados em Metacarn e submetidos à rotina histológica.

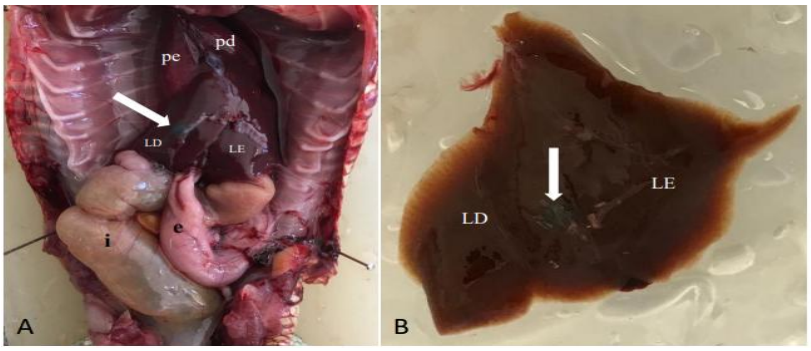
Secções transversais de 5 μm, corados com Hematoxilina-Eosina, foram avaliadas de acordo com sua arquitetura estromal, composição e distribuição dos centros de melanomacrófagos, característica organizacional dos hepatócitos, disposição dos vasos sanguíneos (arteriais, venosos e capilares) e ductos biliares. Foram fotodocumentadas 10 imagens/indivíduo (400x) com câmera digital (Leica DF495) acoplado ao microscópico (Leica DM 4000B). Para o cálculo da densidade volumétrica estrutural, imagens foram selecionadas e avaliadas mediante inclusão de uma gradícula com 252 intersecções. Em seguida foi estimado a presença de hepatócitos, sinusóides, ductos biliares, centros de melanomacrófagos e vasos sanguíneos em cada intersecção. O valor final da densidade de cada estrutura foi calculado pela fórmula: DVl (%) = (Ip x 100) / Tip); onde, Ip refere-se as intersecções positivas para a estrutura e Tip ao total de intersecções contadas na imagem (Rocha *et al*., 1997). O *software* Image Pro-Plus (Media-Cybernetics Inc.) foi usado para a análise dos seguintes parâmetros: perímetro (μm) e área (μm2) dos hepatócitos, perímetro (μm), área (μm2), diâmetro maior e menor (μm) nucleares de seis células/imagem (n=60). Adicionalmente, medidas indiretas foram tomadas: relação núcleo/citoplasma (RNC) (Ranc=área do núcleo/área do citoplasma x 100). O volume nuclear do hepatócito foi estimado pela fórmula: Vn (μm3) = (4/3 x π . r3), onde r é o raio do diâmetro nuclear (Freere & Weibel, 1966), já o volume do hepatócito foi calculado de forma indireta pela fórmula (VHep= (AHep .VNuc) / ANuc), onde AHep = área do hepatócito (μm2); VNuc = volume nuclear (μm3) e ANuc = área nuclear (μm2).

Os dados obtidos foram checados quanto a normalidade e homogeneidade da variância pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. O modelo de Pearson de correlação bivariada foi usado para estimar a associação entre as variáveis biométricas, da densidade volumétrica estrutural e histométricas, sendo as análises conduzidas no software R versão 2.11.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

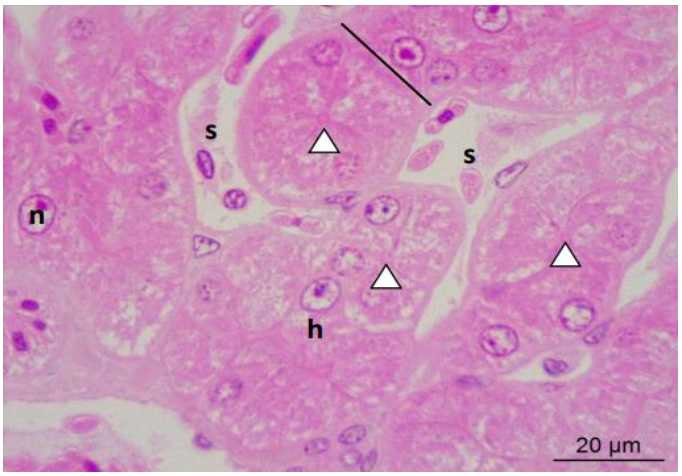
Anatomicamente, o fígado de *A. ameiva* é um órgão volumoso, ocupando grande parte da cavidade corporal superior. Possui cor vermelha bem intensa devido ao grande aporte sanguíneo e formado pelos lobos esquerdo, que recobre parte do intestino, e direito, localizado ventralmente ao estômago. De um modo geral, o fígado de *A. ameiva* é semelhante ao dos demais répteis e muito semelhante ao descrito para o lagarto *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) (Firmiano *et al*., 2011). Porém, são diferentes ao descrito para serpentes, cujo fígado possui apenas um único lobo (Devoe, 2010). A. ameiva apresenta vesícula biliar no lobo direito do fígado, vista pela transparência da cápsula hepática, com cor verde (Figura 1), também muito semelhante aos achados na literatura para o grupo dos répteis (Bacha; Bacha, 2003).

FIGURA 1: Anatomia macroscópica geral de *A. ameiva*. A: Cavidade abdomnotorácica evidenciando o lobo direito (LD) e esquerdo (LE) do fígado e vesícula biliar na região ventral do lobo direito (seta branca). (pe)= pulmão direito; (pd)= pulmão direito; (i)=intestino; (e)= estômago. B: Estruturas hepáticas em detalhe.



Histologicamente, o fígado de *A. ameiva* é composto por hepatócitos de formato poliédrico de diferentes tamanhos. O núcleo dos hepatócitos é grande e esférico, com um único e evidente nucléolo rico em eucromatina, ocupando a porção mais central das células. Os hepatócitos estão organizados no formato de cordões duplos (duas fileiras de células) e uma grande quantidade de sinusóides (rede de capilares) entre os cordões. Entre os hepatócitos é possível visualizar canalículos biliares (Figura 2). Esse mesmo arranjo foi observado em *T. torquatus* (Firmianio *et al*., 2011) e no cágado-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* (Moura *et al*., 2009). Em comparação com grupos mais basais, o anuro *Physalaemus nattereri* também apresentam hepatócitos organizados em cordões duplos, envoltos por sinusoides, porém, com uma grande quantidade de células pigmentadas (melanomacrófagos) (Franco-Belussi *et al*., 2012), diferente do observado em *A. ameiva*. Melanomacrófagos também foram encontrados no fígado do lagarto *Tropidurus hispidus* (Pinto, 2017).

FIGURA 2: Histologia hepática de *A. ameiva*. Arranjo em cordão duplo dos hepatócitos (linha preta), com sinusóides ao redor dos hepatócitos (s) e hemácias em seu interior. Hepatócitos com formato poliédrico (h) e núcleo (n) geralmente grande e canalículos biliares (cabeça de seta) em corte transversal.



As análises histomorfométricas analisadas, área e volume do hepatócito, área e volume nuclear e relação núcleo/citoplasma, ao longo do ciclo anual revelaram alterações nos seguintes parâmetros: área citoplasmática (área do hepatócito) foi maior no inverno em relação às demais estações, entretanto, na primavera, embora menor que no inverno, teve a área citoplasmática maior quando comparada ao período do verão. O verão, portanto, teve a menor área (Tabela 1; Figura 3A) (F=15.08; p-value: 1.252e-09). Em relação ao volume citoplasmático, a estação primavera teve o menor valor quando comparado às demais estações. Não houve variação nesse parâmetro nas outras estações do ano (Tabela 1; Figura 3B) (F= 4.906; p-value: 0.002162). Quando analisado a relação núcleo/citoplasma, os maiores valores foram encontrados para as estações outono e primavera, as quais diferiram do inverno. O verão teve diferença apenas em relação à primavera, com maior valor para essa última estação (Tabela 1; Figura 5) (F= 6.732; p-value: 0.0001676).

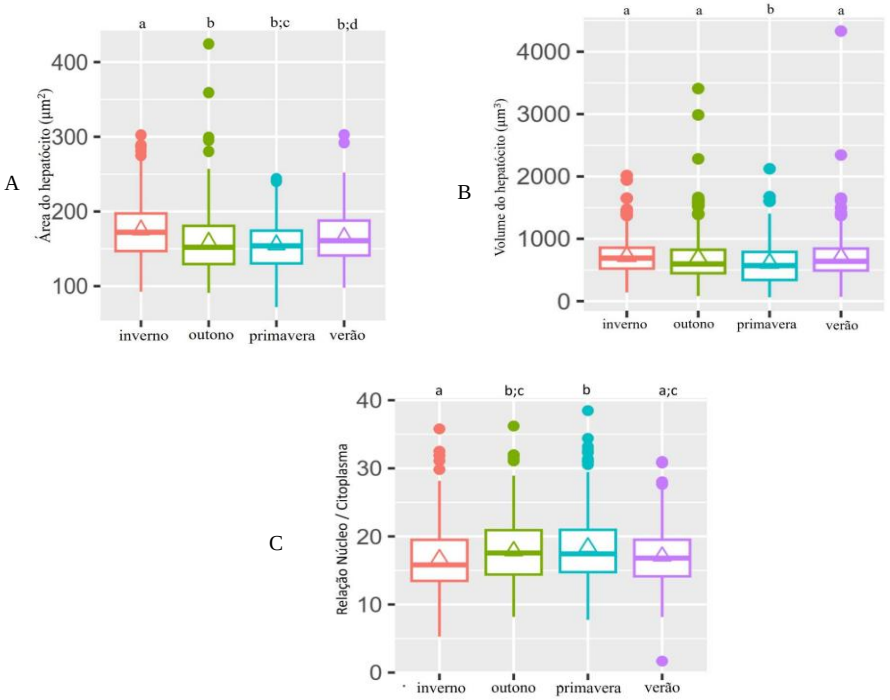
TABELA 1. Dados histomorfométricos das células hepáticas de indivíduos *A. ameiva*

Estações	Área do hepatócito	Área do Núcleo	Volume do hepatócito	Volume do núcleo	RNC
Inverno	175,32 ± 38,52	28,37 ± 12,72	740,18 ± 343,60	117,69 ± 80,56	16,66 ± 3,53
Verão	165,50 ± 51,59	27,54 ± 3,74	1204,07 ± 106,67	189,24 ± 17,50	17,08 ± 5,23
Outono	158,91 ± 21,37	27,41 ± 6,41	728,14 ± 190,07	118,36 ± 38,90	17,80 ± 2,01
Primavera	155,46 ± 75,57	28,00 ± 7,63	610,39 ± 424,47	111,74 ± 4,35	18,43 ± 11,81

A partir de nossos resultados, observamos que a área e o volume citoplasmático dos hepatócitos tiveram as maiores medias durante o período seco. Nesse período, que corresponde ao outono-inverno em nossa região, também se observa uma diminuição nas interações sociais e reprodutivas nesses indivíduos (Maciel, 2022). Uma vez que o metabolismo em organismos ectotérmicos tende a diminuir em épocas desfavoráveis, o estoque de nutrientes nos hepatócitos, dentre eles moléculas lipídicas, se faz importante para suprir as necessidades metabólicas e sobrevivência desses indivíduos (Feria-Ortiz *et al.*, 2018).

Para a RNC, observamos que em *A. ameiva* essa relação é maior no período de outono e primavera, o que sugere uma maior atividade nuclear nesse período frente as mudanças ambientais e preparo para a estação reprodutiva, uma vez que o os túbulos seminíferos, nesse período, estão repletos de espermatozoides, indicando maior atividade em período de maior índice pluviométrico (Maciel *et al.*, 2024).

FIGURA 3. Representação gráfica da área (A), volume (B) e relação núcleo/citoplasma (C) do hepatócito de *A. ameiva* durante o ciclo anual. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p<0,05).



CONCLUSÕES

Neste trabalho, observamos a dinâmica dos hepatócitos ao longo do ciclo anual e as mudanças na área, volume e RNC. No período seco (outono e inverno) observamos maiores valores para área e volume, o que pode estar relacionado ao estoque de nutrientes, dentre eles lipídio, para manutenção do metabolismo básico, uma vez que estão menos ativos em suas relações comportamentais. A RNC, maior na primavera, sugere maior atividade nuclear nesse período, consequentemente maior atividade metabólica e aumento das interações sociais como defesa territorial e reprodução, onde o período chuvoso e a oferta de alimento beneficiam essas interações. Trabalhos com essa temática reforçam a importância de entender como os organismos neotropicais se ajustam ao principal fator natural (precipitação) e como esse fator altera seu comportamento, metabolismo, reprodução e até mesmo aspectos evolutivos.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

E.S.M. colaborou na captura, aclimatação e manejo dos girinos. E.S.M e R.Z. contribuíram para a execução da metodologia. A.G.M.S. e R.Z. atuaram na fotodocumentação e análises. L.F.B. contribuiu com as analises estatísticas e interpretação dos dados. R.Z. e E.S.M. contribuíram na orientação e coorientação do trabalho, auxiliando na metodologia, no preparo do experimento e na revisão do conteúdo. Todos os autores contribuíram com a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado, especialmente aos servidores técnicos de laboratório, ao IFSP Barretos e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica (**PIBIFSP) edital 2023.**

REFERÊNCIAS

BACHA, W. J. J; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2003. 457 p.

CHAVES, M. F. **Caracterização, histologia e biologia reprodutiva de *Leptodactylus macrosternum* (Anura, Leptodactylidae), Nordeste do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical,2017.

CRAWSHAW, G. J; WEINKLE, T. K. **Clinical and Pathological Aspects of the Amphibian Liver**. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 09 - n.03, p 165-173, 2000.

DEVOE, R. **Anatomia e Fisiologia de Anfíbios e Répteis**. In: COLVILLE, T. & BASSERT, J.M. Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária. 2 Ed. Editora Elsevier Saunders, Rio de Janeiro, p.455-478, 2010.

FERIA-ORTIZ, M., ISAÍAS H. SALGADO-UGARTE, I. H. e GARCÍA-VÁZQUEZ, U. O. **Fat Body, Liver, and Carcass Mass Cycles in the Viviparous Lizard *Sceloporus torquatus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae)**, The Southwestern Naturalist 63(1), 1-7, 2018.

FIRMIANO, C. *et al***. Histological study of the liver of the lizard *Tropidurus torquatus* Wied 1820, (Squamata: Tropiduridae**). Journal of Morphological Sciences, n. 28, p. 165-170, 2011.

FRANCO-BELUSSI, L; SANTOS, L. R. S; ZIERI, R; VICENTINI, C. A; TABOGA, S. R; OLIVEIRA, C **Liver anatomy, histochemistry, and ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) during the breeding season**. Zoological Science, v. 29, p. 844-848, 2012.

HAMILTON, P. W; ALLEN, D. C. **Morphometry in histopathology**. Journal of Pathology, v. 175, p. 369-379, 1995.

HINTON, D. E; SEGNER, H; BRAUNBECK, T. **Toxic responses of the liver. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**, 1, 224-268, 2001.

INOUE, A. M; AKIYOSHI, H. **Comparative histochemical studies of the liver in amphibians associated with their phylogeny and diverged mode of living**. Bull. Fac. Life Env. Sci. Shimane Univ., 8:11-21, 2003.

MACIEL, E. S. **Ciclo reprodutivo do macho *Ameiva ameiva* (Squamata: Teiidae) baseado em seus aspectos morfológicos sazonais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE - São José do Rio Preto, 2022.

MACIEL, E. S; ZIERI, R; ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Male genital system of *Ameiva ameiva*** (Squamata: Teiidae). The Anatomical Record, 1–10, 2024.

Moura, LR, *et al*. **Morphological aspects of the liver of thefreshwater turtle Phrynops geoffroanus Schweigger, 1812 (Testudines,Chelidae)**. Braz. J. Morphol. Sci., 26(3-4):129-34, 2009.

PINTO, A. M. **Descrição Morfológica do Sistema Digestório do *Tropidurus hispidus*** (Spix, 1825) / Acácia Maria Pinto. - 2017. 51 f.: il.

POMBAL Jr., JP; HADDAD, C. F. B. **Estratégias e modos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, sudeste do Brasil.** Pap. Avulsos Zool. 45(15):201-213, 2005.

POUGH, F. H *et al*. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 4ª ed., p., 2008.

ROCHA, E; MONTEIRO, RAF; PEREIRA, C. A. **Liver of the brown trout, Salmo trutta (Teleostei, Salmonidae): a stereological study at light and electron microscopic levels**. The Anatomical Record, v. 247, n. 3, p. 317-328, 1997.

RODRIGUES, D. J; LOPES, F. S; UETANABARO, M. **Padrão reprodutivo de *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) na Serra da Bodoquena**, Mato Grosso do Sul, Brasil. Iheringia, Sér. Zool. 93(4):365- 371, 2003.

RODRIGUES, R. A; SATURNINO, K. C; FERNANDES, C. E. **Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming.** Aquaculture Research, vol. 48 (9), p. 1–11, 2017.