

STÉPHANIE ASSÉF MILLEN VALENTE TEIXEIRA

MORFOLOGIA DO TEGUMENTO DE ANFÍBIOS ANUROS DA MATA
ATLÂNTICA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS
COMPORTAMENTAIS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T266m
2014

Teixeira, Stéphanie Asséf Millen Valente, 1987-
Morfologia do tegumento de anfíbios anuros da Mata
Atlântica e sua aplicação em estudos comportamentais /
Stéphanie Asséf Millen Valente Teixeira. – Viçosa, MG, 2014.
xiv, 112f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Mariana Machado Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Anuro. 2. Anfíbio. 3. Histoquímica. 4. Morfometria.
5. Mata Atlântica. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 597.8

STÉPHANIE ASSÉF MILLEN VALENTE TEIXEIRA

MORFOLOGIA DO TEGUMENTO DE ANFÍBIOS ANUROS DA MATA
ATLÂNTICA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS
COMPORTAMENTAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2014.

José Lino Neto

Ita de Oliveira e Silva

Mariana Machado Neves
(Orientadora)

Dedicado à Tia Penha (*in memoriam*)
que tanto me apoiou e sonhou com este dia.

“Tudo parece impossível até que seja feito!”

(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

Nada nesta vida se faz sozinho, é necessário termos pessoas comprometidas conosco e que estejam sempre disposta a nos dar um pouco do seu tempo e de sua paciência para que tudo se realize. Neste sentido tenho muitas pessoas a agradecer.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me sustentado e me levado a todos os caminhos que percorri.

À UFV pelos sete anos de formação profissional e pessoal, pelos mestres que conheci e pela oportunidade de realização deste trabalho. À CAPES pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível realizá-lo.

À Professora Mariana Neves que me acolheu em seu laboratório e se dispôs a me orientar durante a graduação e mestrado, obrigada pelos conselhos, ensinamentos e por me deixar unir as paixões da minha vida, a histologia e a herpetologia!

Aos meus coorientadores Renato Feio e Leandro Licursi pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e por estarem sempre dispostos a me atender.

Ao Lino pela disponibilidade em tirar as lindas fotos dos meus animais e por participar da banca examinadora, colaborando com excelentes sugestões.

À Ita por fazer parte da banca examinadora e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural, Clóvis, Sérgio, Izabel e Adilson por estarem sempre prontos a me socorrer nos momentos de dúvidas durante a execução dos experimentos.

Ao Carlos Sperber e Marcelo Ribeiro por disponibilizarem o laboratório de Ortopterologia e me auxiliarem no manuseio do estereomicroscópio. Ao professor Leonardo Behring pela grande ajuda na realização e análises estatísticas.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, Tio Gilmar, Karla, Rosangela, Lorenço e Daiane, por estarem sempre dispostos a procurar outro protocolo para as minhas inclusões, rs! Pela atenção dispensada a mim e ao meu trabalho, pelos cafezinhos e sugestões durante todo o desenvolvimento deste.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, Prof. Serrão, Monteiro, Madu, Dihego, Douglas, Débora, Wagner, Kenner, Luíza e Polly que me acompanharam desde o início dessa jornada estando sempre disponíveis a ajudar.

Ao laboratório de Sistemática Molecular, em nome da Prof. Jorge Dergam, por sempre disponibilizarem tão gentilmente o fotomicroscópio.

paciência para ouvir as minhas histórias. À Vanessa, Bruno, Bia e Cláudia que se tornaram mais que primos, principalmente durante os anos de Viçosa, obrigada pelo apoio e companheirismo.

À Vude, que durante os anos de Viçosa sempre cuidou de mim com muito carinho e atenção.

À Mariana Moraes que foi mais que um achado neste período. Sem palavras para agradecer e descrever o que sua amizade e companheirismo significaram pra mim nestes dois anos de convivência. Obrigada pelos conselhos, pelas broncas, pelos momentos de descontração, pelas idas aos fins de semana ao laboratório, enfim, por ter participado de todas as etapas de realização deste trabalho.

À May, Rafa, Gi, Olivia, Deb, Hygor Jorge, Gui, Giorgio, Mari Neves e Deborah Romas que são importantes pilares na minha vida e peças essenciais nesta conquista.

À TROPA, Jansen, Felipe, Vanessa, Bruno, Lailla, Aline, Shrek, Bronca, Nelson e Kju, por serem a família que eu escolhi. Por se alegrarem e sofrerem junto comigo. Por me tirarem do estresse e me fazerem ver que não só de trabalho vive o homem!

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Serei eternamente grata!!!

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Distribuição geográfica dos anfíbios no mundo e no Brasil	4
2.2 Função e macroscopia do tegumento de anuros.....	7
2.3 Características microscópicas do tegumento de anuros	8
2.4 Características morfofisiológicas das glândulas tegumentares	13
2.5 Referências	19
3. Capítulo I- CARACTERÍSTICAS DO TEGUMENTO DE <i>Phyllomedusa burmeisteri</i> E <i>Hypsiboas semilineatus</i> E SUA RELAÇÃO COM O HABITAT E COMPORTAMENTO ANIMAL	29
3.1 Introdução	30
3.2 Materiais e Métodos	33
3.2.1 Captura dos animais	33
3.2.2 Biometria corporal, eutanásia e obtenção do tegumento	33
3.2.3 Avaliação do tegumento sob microscopia de luz.....	34
3.2.3.1 Processamento histológico	34
3.2.3.2 Colorações histológicas e histoquímicas.....	35
3.2.3.3 Avaliação dos tipos de fibras colágenas em microscopia de polarização .	36
3.2.3.4 Histomorfometria do tegumento	36

3.2.3.5 Análise estatística.....	36
3.2.4 Avaliação do tegumento sob estereomicroscopia	37
3.2.5 Avaliação do tegumento em microscopia eletrônica de varredura (MEV)..	37
3.2.6 Avaliação do tegumento sob espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS)	38
3.2.7 Avaliação do tegumento em microscopia eletrônica de transmissão (MET)	38
3.3 Resultados	39
3.3.1 Biometria corporal de <i>P. burmeisteri</i> e <i>H. semilineatus</i>	39
3.3.2 Morfologia e histoquímica do tegumento nas três regiões corporais de <i>P. burmeisteri</i> e <i>H. semilineatus</i>	39
3.3.3 Histomorfometria do tegumento de <i>P. burmeisteri</i> e <i>H. semilineatus</i>	48
3.3.4 Histologia, histoquímica e histomorfometria das glândulas tegumentares de <i>P. burmeisteri</i> e <i>H. semilineatus</i>	48
3.4 Discussão.....	58
3.5 Referências	64
4. Capítulo II- MORFOLOGIA DO TEGUMENTO DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Dendropsophus</i> VIVENTES NA MATA ATLÂNTICA	72
4.1 Introdução	73
4.2 Materiais e Métodos	74
4.2.1 Captura dos animais	74
4.2.2 Biometria corporal, eutanásia e obtenção do tegumento	75
4.2.3 Avaliação do tegumento sob microscopia de luz.....	75

4.2.3.1	Processamento histológico	75
4.2.3.2	Colorações histológicas e histoquímicas.....	76
4.2.3.3	Avaliação dos tipos de fibras colágenas em microscopia de polarização .	77
4.2.3.4	Histomorfometria do tegumento	77
4.2.3.5	Análise estatística.....	78
4.2.4	Avaliação do tegumento sob estereomicroscopia	78
4.2.5	Avaliação do tegumento em microscopia eletrônica de varredura (MEV)..	78
4.2.6	Avaliação do tegumento sob espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS)	79
4.3	Resultados	80
4.4	Discussão	92
4.5	Referências.....	95
5	CONCLUSÕES GERAIS	103
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
7	ANEXOS	106
7.1	Anexo I: Coloração por hematoxilina e eosina	106
7.2	Anexo II: Coloração por azul de toluidina.....	107
7.3	Anexo III: Coloração por <i>Oil Red O</i>	108
7.4	Anexo IV: Coloração <i>Periodic Acid Schiff</i> (PAS).....	109
7.5	Anexo V: Coloração por <i>Alcian Blue</i> pH 2.5.....	110
7.6	Anexo VI: Coloração por mercúrio de bromofenol	111
7.7	Anexo VII: Coloração por <i>picrosirius red</i>	112

RESUMO

TEIXEIRA, Stéphanie Asséf Millen Valente, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Morfologia do tegumento de anfíbios anuros da Mata Atlântica e sua aplicação em estudos comportamentais.** Orientador: Mariana Machado Neves.

O tegumento dos anuros desempenha funções fisiológicas importantes, como osmorregulação, termorregulação, trocas gasosas e proteção, mecânica e química. Ele pode apresentar projeções macroscópicas, como verrugas, tubérculos e espinhos e estrias. Histologicamente, o tegumento desses animais é formado pela epiderme, composta pelas camadas córnea, espinhosa e basal, e derme subdividida em derme esponjosa e derme compacta. Entre as dermes é possível observar uma camada calcificada, denominada Eberth-Katschenko (E-K). São escassos os trabalhos descrevendo a morfologia tegumentar em espécies de anuros da Mata Atlântica, principalmente da família Hylidae. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia e histoquímica do tegumento de *Phyllomedusa burmeisteri* e *Hypsiboas semilineatus*, comparando-as quanto ao habitat e comportamento, e avaliar o tegumento das espécies *Dendropsophus elegans* e *D. minutus* evidenciando possíveis características espécie-específicas. Quatro indivíduos de cada espécie foram coletados na Mata da Biologia, em Viçosa - MG, sob a licença número 10504-1 (IBAMA) e CEUA (protocolo 067/2012). Amostras das regiões da cabeça e troncos, dorsal e ventral, foram fixadas em solução de Karnovsky, incluídas em parafina e resina, para avaliação em microscopia de luz sob aspectos histológicos, morfométricos e histoquímicos. Secções histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT), *periodic acid schiff* (PAS), mercúrio de bromofenol (MB), *alcian blue* (AB) pH 2,5, *picrosirius red* (PS) e *oil red O* (ORO). Outros fragmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, para análise e caracterização do tegumento em microscopia eletrônica de transmissão, varredura e EDS. Animais da coleção herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen foram fotografados e avaliados em estereomicroscópio. Os resultados obtidos nas quatro espécies analisadas mostraram a presença de projeções superficiais nas regiões da cabeça e tronco dorsal de cada espécie, variando desde verrugas à pequenas elevações, e na região ventral, que apresentou grandes verrugas separadas por estrias. A camada E-K não foi observada em *P.burmeisteri*

e *H. semilineatus*, mas sim em *D. elegans* e *D. minutus*, localizada em toda porção dorsal e composta principalmente por cálcio e fósforo. A variação entre a derme esponjosa das regiões e espécies se deveu à organização e presença das unidades cromatóforas, que se mostraram completas na cabeça e tronco dorsal, com iridóforos e melanóforos, em todas as espécies e xantóforos ausentes apenas em *H. semilineatus*. Além disso, em todas as espécies, a região ventral não apresentou essas unidades, pois as células cromatóforas estão dispostas aleatoriamente. Já a derme compacta apresentou fibras colágenas do tipo I e III dispostas em várias direções. Vários tipos glandulares foram observados entre as espécies, permitindo diferenciá-las taxonomicamente, além de validar dados comportamentais. Todas as espécies apresentaram glândulas seromucosas (PAS⁺, AB⁺ e MB⁺) e granulares A (MB⁺), enquanto que apenas a *P. burmeisteri* apresentou glândulas lipídicas (ORO⁺) e granulares B (PAS⁺ e MB⁺). Exemplares das espécies *D. elegans* apresentaram glândulas granulares B (AB⁺). Os resultados histoquímicos mostraram que há grande produção de polissacarídeos e proteínas que umidificam e protegem o tegumento. Já as glândulas lipídicas impermeabilizam o tegumento de *P. burmeisteri*, sendo mais eficiente contra a dessecação. Apesar da marcação histoquímica entre as glândulas granulares B ter sido diferente entre duas espécies, nos demais parâmetros histoquímicos analisados, nas três regiões corporais, não se observou diferença entre as espécies, assim como na histologia da epiderme. O parâmetro tipo glandular em *D. elegans* e *D. minutus* se mostrou o mais confiável para a diferenciação dessas espécies, quando utilizada a morfologia do tegumento como ferramenta. Portanto, observou-se que tegumento dos anuros nos fornece informações importantes quanto ao comportamento dos animais, o que permite sua ocupação em diferentes habitats, além de apoiar pesquisas relacionadas à taxonomia, já que ocorrem variações morfológicas do tegumento entre espécies.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Stéphanie Asséf Millen Valente, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Morphology of anuran integument of the Atlantic Forest and its application in behavioral studies.** Adviser: Mariana Machado Neves.

The integument of the anuran plays important physiological functions such as osmoregulation, thermoregulation, gas exchange and protection, mechanical and chemical. It can present macroscopic projections like warts, tubercles, spines, and grooves. Histologically, the integument of these animals consists of the epidermis, composed of the corneal, spinosum and basal layers, and dermis subdivided in spongy and compact stratum. Among the stratum is possible to observe a calcified layer, termed the Eberth-Katschenko (E-K). There are few studies describing the cutaneous morphology in anuran species from the Atlantic Forest, especially the Hylidae family. Therefore, the aim of this study was to analyze the morphology and histochemistry of the integument of *Phyllomedusa burmeisteri* and *Hypsiboas semilineatus*, comparing them in relation to habitat and behavior, and to evaluate the integument of species *Dendropsophus elegans* and *D. minutus* showing possible species-specific characteristics. Four individuals of each species were collected in the Forest Biology in Viçosa - MG, under the number 10504-1 (IBAMA) and CEUA (protocol 067/2012) license. Samples from regions of the head and trunk, dorsal and ventral, were fixed in Karnovsky solution, embedded in paraffin and resin for evaluation histological, morphometric and histochemistry, under light microscopy. Histologic sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), toluidine blue (AT), periodic acid Schiff (PAS), mercury bromophenol (MB), alcian blue (AB) pH 2.5, picosirius red (PS) and oil red O (ORO). Other fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate 0.1 M buffer for analysis and characterization of the integument in transmission, scanning electron microscopy and EDS. Animals of the Museum of Zoology João Moojen herpetological collection were photographed and evaluated under a stereomicroscope. The results obtained in the four species analyzed showed the presence of surface projections around the head and dorsal trunk of each species, ranging from warts to small elevations, and in the ventral region, which showed large warts separated by grooves. The EK layer was not observed in *P.burmeisteri* and *H. semilineatus* but in *D.elegans* and *D. minutus*, located in all the dorsal

portion and composed mainly of calcium and phosphorus. The variation between the regions and spongy stratum species was due to the presence of chromatophores and units organization, which showed the complete head and dorsal trunk, with iridophore and melanophores in all species, and xanthophores absente only in *H. semilineatus*. Moreover, in ventral region in all species, showed the absence of units, because the chromatophores cells, when present, are randomly arranged . Have the compact stratum showed collagen fibers type I and III arranged in various directions. Several glandular types were observed among species, allowing them apart taxonomically, and validate behavioral data. All species showed seromucous glands (PAS⁺, AB⁺ and MB⁺) and the granular A (MB⁺), whereas only *P. burmeisteri* presented lipid glands (ORO⁺) and granule B (PAS⁺ and MB⁺). Specimens of *D. elegans* showed granular glands B (AB⁺). The histochemical results showed that there is large production of polysaccharides and proteins that umidificam and protect the integument. Already lipid glands waterproof the integument of *P. burmeisteri*, being more efficient against drying. Despite the histochemical staining of the granular glands B have been different between the two species, in other histochemistry parameters analyzed in the three body regions, no difference was observed between species, as well as the histology of the epidermis. The glandular type parameter *D. elegans* and *D. minutus* proved more reliable for the differentiation of these species when used the morphology of the integument as a tool. Therefore, it was observed that the anuran integument gives us important information about the behavior of animals, allowing their occupation in different habitats, and supports research related to taxonomy, since morphological variations of the integument between species occur.

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas de maior biodiversidade do planeta (Duellman e Trueb, 1994), sendo o habitat de diversas espécies de anuros, muitas delas endêmicas (Frost, 2013). Estes animais são considerados importantes bioindicadores da qualidade ambiental, pois são afetados diretamente pelo desmatamento, fragmentação do habitat e poluição (Marques e Duleba, 2004).

Uma das características sinapomórficas mais relevantes dos anfíbios é a morfofisiologia do seu tegumento, órgão de extrema complexidade e responsável por grande parte das funções fisiológicas necessárias à sobrevivência e comportamento desses indivíduos (Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2008). A estrutura altamente especializada deste órgão permitiu que estes animais explorassem ambientes terrestres diversos, ocupando áreas distantes dos corpos d'água (Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2008).

O tegumento de todos os anfíbios compartilha características comuns, como a alta permeabilidade, além de estar envolvido em processos orgânicos, como trocas gasosas, osmorregulação, termorregulação e proteção, mecânica e química (Duellman e Trueb, 1994; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009; Pelli *et al.*, 2010; Mangione *et al.*, 2011).

Geralmente o tegumento é formado por uma epiderme com epitélio estratificado e uma derme com duas regiões distintas, a derme esponjosa e a derme compacta (Duellman e Trueb, 1994; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005). Na derme esponjosa é possível encontrar células pigmentadas e glândulas mucosas, cuja secreção impede a dessecação do animal e forma uma barreira de proteção (Clarke, 1997). O tegumento úmido é uma característica essencial para a exploração de ambientes terrestres, pois só assim é possível que os eventos

fisiológicos desempenhados por este órgão ocorram. Além disso, glândulas granulares ou de veneno contribuem para a proteção do indivíduo contra predadores e contra o crescimento e entrada de microrganismos patogênicos (Toledo e Jared, 1995).

Já na derme compacta observa-se grande quantidade de matriz extracelular, formada principalmente por fibras colágenas, vasos sanguíneos e nervos (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Azevedo *et al.*, 2006; Felseburgh *et al.*, 2007; Rigolo *et al.*, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009).

A morfologia, histologia e histoquímica do tegumento e de suas glândulas, bem como a distribuição de células cromatóforas, podem variar entre espécies e região do corpo do animal, sendo muitas vezes determinada pelo habitat (Amey e Grigg, 1995; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009). Essa alta plasticidade faz com que o tegumento funcione como uma identidade espécie-específica, nos permitindo comprovar dados taxonômicos e subsidiar informações acerca da história natural desses indivíduos. Dessa forma, o estudo do tegumento dos anuros nos permite correlacionar diversas áreas de pesquisa, sendo essencial para a compreensão tanto de aspectos histológicos quanto da fisiologia e comportamento inerentes a cada espécie.

Com base no exposto, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar e comparar a histologia, a histoquímica e a morfometria do tegumento de diferentes espécies de anuros de ocorrência na Mata Atlântica brasileira, a fim de relacionar as características tegumentares com aspectos comportamentais de cada uma das espécies, bem como avaliar possíveis características espécie-específicas. As espécies *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824), *Phyllomedusa burmeisteri* (Boulenger, 1882), *Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824) e *D. minutus*

(Peter, 1872) ainda não tiveram seu tegumento descrito, assim como sua morfologia não foi relacionada aos aspectos acima descritos.

Sendo assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Descrever a histologia do tegumento de três regiões corporais, cabeça, troncos dorsal e ventral, das espécies *Hypsiboas semilineatus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Dendropsophus elegans* e *D. minutus*, a partir da análise descritiva de sua arquitetura tecidual;

- Avaliar as características morfométricas, em microscopia de luz, das três regiões corporais nas quatro espécies, comparando-as quanto a espessura da epiderme, derme esponjosa, derme compacta, número de glândulas granulares e mucosas por área, além de comprimento e largura das mesmas;

- Caracterizar histoquimicamente as secreções glandulares nas diferentes regiões corporais;

- Analisar os elementos químicos presentes no tegumento das espécies em questão, principalmente com relação à presença da camada de Eberth-Katschenko, utilizando a técnica de espectroscopia de raios X;

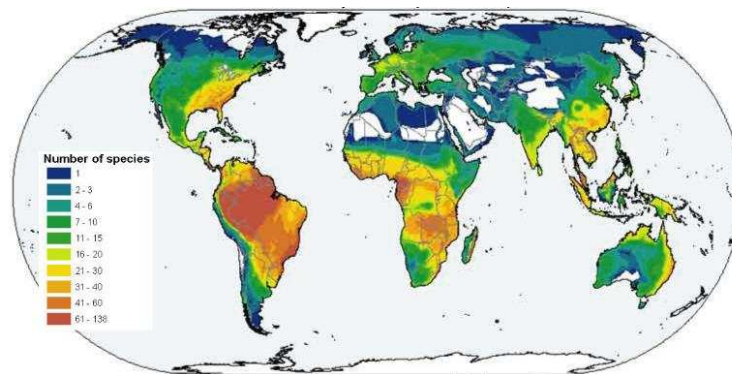
- Caracterizar a superfície tegumentar a partir de análises feitas em estereomicroscópio e microscópio eletrônico de varredura, para observação de verrugas, espinhos e tubérculos;

- Descrever as características ultraestruturais de componentes do tegumento de anuros nas três regiões corporais, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distribuição geográfica dos anfíbios no mundo e no Brasil

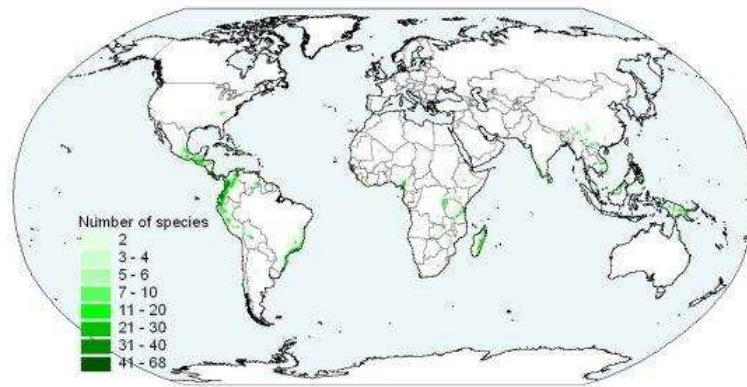
Os anfíbios atuais pertencem à classe Lissamphibia, que compreende 7044 espécies descritas mundialmente, sendo classificados taxonomicamente em três ordens: Caudata ou Urodela com 652 espécies, Gymnophiona com 192 e Anura com 6200 espécies. Os anfíbios estão distribuídos em todos os continentes, sendo o Brasil o país com a maior diversidade de espécies no mundo (Fig. 1), possuindo uma espécie de Urodela, 32 de Gymnophiona e 913 de Anura (Frost, 2013; IUCN 2013; SBH, 2013).



<http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/geographic-patterns>

Figura 1: Distribuição Global de Anfíbios (IUCN, 2013)

A Mata Atlântica, um dos biomas mais ameaçados e com maior diversidade animal do mundo, é o habitat de várias espécies de anuros, muitas delas endêmicas (Fig. 2) (Duellman e Trueb, 1994; Frost, 2013). A família Hylidae, apresenta 926 espécies no mundo com 355 viventes no Brasil, sendo que destas, 286 são endêmicas de Mata Atlântica. Os hílideos são, em sua maioria, arborícolas e noturnos, apesar de serem descritos os mais diversos comportamentos (Juncá, 2006; Frost, 2013; SBH, 2013).



<http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/geographic-patterns>

Figura 2: Distribuição Global de espécies de anfíbios endêmicas (IUCN, 2013)

As espécies, *Hypsiboas semilineatus*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Dendropsophus elegans* e *D. minutus*, estudadas neste trabalho, apresentam diferentes distribuições geográficas, como mostrado na figura 3. Destas, apenas *D. minutus* é encontrada em outros países. A espécie *P. burmeisteri* pode ser encontrada em regiões de Cerrado, enquanto que as demais são endêmicas de Mata Atlântica (Frost, 2013).

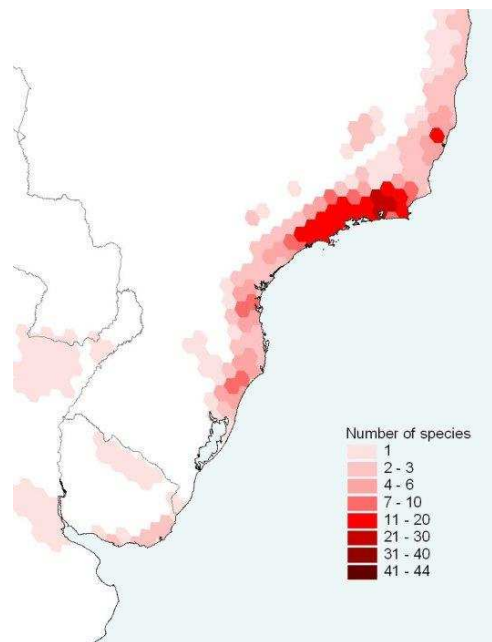


<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>

Figura 3: Distribuição global das espécies *D. minutus*, *D. elegans*, *P. burmeisteri* e *H. semilineatus* (Frost, 2013)

Apesar da grande diversidade, o desmatamento, a fragmentação do habitat, a entrada de microrganismos patogênicos, como o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, e a diminuição da qualidade ambiental têm causado grandes perdas na diversidade de anfíbios na Mata Atlântica (Fig. 4) (Woehl e Woehl, 2008; Conlon, 2011).

Estratégias de manejo e conservação ambiental têm sido propostas com base no comportamento e fisiologia destes animais, a fim de reduzir a perda da biodiversidade (Redford *et al.*, 2003; Marques e Duleba, 2004; Haddad *et al.*, 2008). No caso de anuros, o tegumento é o órgão responsável pela homeostase, sendo os estudos acerca de sua estrutura e função um fator importante no planejamento de tais estratégias.



<http://www.iucnredlist.org/initiatives/amphibians/analysis/geographic-patterns>

Figura 4: Distribuição das espécies de anfíbios ameaçadas na Mata Atlântica (IUCN, 2013)

No entanto, poucos trabalhos relacionam o tegumento à fisiologia e comportamento dos anuros. A maioria trata de taxonomia, sistemática, comportamento e conservação (Morellato, 1992; Pombal-Jr e Haddad, 1992; Marques e Duleba, 2004; Feio e Ferreira, 2005; Juncá, 2006; Haddad *et al.*, 2008; Faivovich *et al.*, 2010).

2.2 Função e macroscopia do tegumento de anuros

O tegumento é a primeira barreira entre o animal e o ambiente, conferindo proteção mecânica bem como impedindo a entrada de patógenos. Este órgão é responsável por diversas funções morfofisiológicas essenciais para a sobrevivência dos anfíbios. Por ser altamente permeável à água, ele está envolvido na respiração, termorregulação, osmorregulação, além de participar da defesa mecânica, química e da percepção sensorial (Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2003; Hildebrand e Goslow, 2004; Kardong, 2006; Kardong, 2011). Outras funções do tegumento estão relacionadas à coloração, sendo um fator importante na escolha do parceiro sexual e nos casos de camuflagem e de sinalização de alerta para os predadores, como as colorações aposemáticas em Dendrobatídeos (Duellman e Trueb, 1994; Clarke, 1997; Pough *et al.*, 2003).

A superfície tegumentar apresenta grandes variações quanto à textura e rugosidade entre animais aquáticos, semiaquáticos e terrestres. Sabe-se que animais terrestres possuem maior complexidade na textura que os demais (Lillywhite *et al.*, 1997; Woehl e Woehl, 2008). Elias e Shapiro (1957) definiram uma terminologia complexa para a diversidade de projeções na superfície tegumentar de anuros. Para facilitar o entendimento sobre estas estruturas, Brito-Gitirana e Azevedo (2005) criaram uma nomenclatura resumida, na qual as

verrugas são morfológicamente caracterizadas como protuberâncias maiores e arredondadas, os tubérculos como estruturas cônicas e amarronzadas, e os espinhos como projeções menores de base circular. É importante ressaltar que cada uma dessas estruturas apresenta uma gama de subdivisões que levam em consideração as características histológicas, como o espessamento da camada queratinizada, ausência ou presença de glândulas, espessamento dérmico, aumento do volume de células epidérmicas, bem como a presença de espinhos sobre as verrugas ou tubérculos. Além disso, entre as três projeções citadas podem ser encontradas estrias primárias, secundárias e terciárias, cuja função seria a de distribuir água e substâncias produzidas pelo tegumento por toda a superfície corporal (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009).

As projeções tegumentares possuem importante papel no aumento da área de superfície e conseqüentemente no aumento da área vascularizada, otimizando o funcionamento deste órgão. Muitos autores mostraram que há uma grande variação nos tipos de projeções, entre as superfícies dorsal e ventral do tegumento de espécies como *Bufo ictericus* (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005), *Proceratophrys* e *Odontophrynus* (Felseburgh *et al.*, 2007), *Cicloramphus fuliginosus* (Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008) e *Rhinella ornata* (Felseburgh *et al.*, 2009).

2.3 Características microscópicas do tegumento de anuros

A estrutura básica do tegumento é similar para as três ordens de anfíbios (Lillywhite *et al.*, 1997; Pough *et al.*, 2003), sendo formado por uma camada mais externa, a epiderme, de origem ectodérmica, e uma camada mais interna, a derme,

derivada da mesoderme. Entre essas camadas é possível observar células pigmentadas, denominadas cromatóforos, originadas da crista neural (Hama, 1963; Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2003; Hildebrand e Goslow, 2004).

Em anuros, a epiderme é composta por três camadas, o estrato córneo, mais externo e geralmente formado por uma camada de células achatadas, podendo ou não ser queratinizado. Na espécie *Polypedates maculatus* esta camada apresenta tanto células nucleadas quanto anucleadas (Lillywhite *et al.*, 1997), enquanto que na espécie *Odontophrynus americanus* ela é somente anucleada (Felseburgh *et al.*, 2007). Abaixo do estrato córneo está o estrato intermediário, formado por várias camadas de células com formato que varia de colunar a achatado. O estrato basal, também chamado de estrato germinativo, é mais interno e possui uma camada de células colunares (Parakkal e Matoltsy, 1964; Duellman e Trueb, 1994; Hildebrand e Goslow, 2004; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Jared *et al.*, 2009).

As principais células da epiderme são os queratinócitos, cuja função primordial é a produção de queratina. Esta produção se inicia no estrato intermediário e termina no estrato córneo, com a formação de tonofilamentos e eliminação de diversas estruturas e organelas celulares (Parakkal e Matoltsy, 1964). Além dos queratinócitos, é possível observar células de Merkel e células em forma de moringa ou *Flask Cells*, com funções mecanorreceptoras e de trocas iônicas, respectivamente, além de células PAS (*Periodic Acid Schiff*) positivas (Parakkal e Matoltsy, 1964; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2009).

A lâmina basal é secretada por queratinócitos e separa a epiderme da derme (Duellman e Trueb, 1994; Kardong, 2006; Kardong, 2011). Esta última é

subdividida em dois estratos, o mais externo, o estrato esponjoso ou derme esponjosa, formada por tecido conjuntivo frouxo, com diferentes tipos celulares, como cromatóforos, mastócitos, fibroblastos, fibrócitos e glândulas exócrinas, sendo as mais comuns as glândulas mucosas e as granulares, também conhecidas como glândulas de veneno. Já o estrato compacto ou derme compacta é mais interna e formada por tecido conjuntivo denso não modelado, repleto de fibras colágenas arranjadas de maneira cruzada e alternada, sendo também encontradas na direção vertical. Em ambos os estratos é possível observar nervos e vasos sanguíneos (Shinagawa e Shinagawa, 1974; Duellman e Trueb, 1994; Hildebrand e Goslow, 2004; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Azevedo *et al.*, 2006; Kardong 2006; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Rigolo *et al.*, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009; Kardong, 2011).

Entre os estratos, algumas espécies como *Bufo ictericus* (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005), *Rana casteisbeiana* (Azevedo *et al.*, 2006), *Rhinella ornata* (Felseburgh *et al.*, 2007), *Cicloramphus fuliginosus* (Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008) e *Rhinella jimi* (Jared *et al.*, 2009), apresentam uma camada calcificada denominada Eberth-Katschenko (E-K). Esta camada pode ser contínua ou interrompida (Azevedo *et al.*, 2006). Em *Rhinella ornata*, ela está presente em todo o corpo do animal, exceto na região pélvica (Felseburgh *et al.*, 2009), enquanto que em *Rhinella jimi* sua localização é abaixo da epiderme que recobre as glândulas parotóides (Jared *et al.*, 2009). Percebe-se que a camada E-K é bem estudada em espécies terrestres, como Bufonídeos e aquáticas, como Leptodactilídeos e Ranídeos. Não foi encontrada na literatura a descrição desta estrutura em Hilídeos.

Na derme esponjosa, logo abaixo da lâmina basal, células pigmentadas se organizam tanto estrutural quanto fisiologicamente para estabelecer a coloração dos anuros (Bagnara *et al.*, 1968; Duellman e Trueb, 1994; Rigolo *et al.*, 2008). A interação e a diferente distribuição dessas células ao longo do corpo fornecem diferentes padrões de cor (Bagnara *et al.*, 1968; Pough *et al.*, 2003).

A coloração nos anuros é importante na camuflagem, no controle da temperatura, nos comportamentos social e sexual, bem como nas descrições taxonômicas desses indivíduos (Hildebrand e Goslow, 2004). Bagnara *et al.* (1968) desenvolveram o conceito de unidade cromatófora dermal, que possibilita a coloração e a rápida adaptação de cor dos anuros. As unidades cromatóforas são compostas principalmente por xantóforos, iridóforos e melanóforos, podendo não apresentar todas essas células. Lillywhite *et al.* (1997) observaram a ausência de xantóforos em *Polypedates maculatus*, sendo as unidades formadas apenas por melanóforos e iridóforos.

Os xantóforos são células com pigmentos amarelos, vermelhos ou laranjas, conhecidos como pteridinas e carotenoides, armazenados em organelas chamadas de pterinossomos (Hama, 1963; Bagnara *et al.*, 1968; Pough *et al.*, 2003; Hildebrand e Goslow, 2004). Estes se situam mais próximos da epiderme e são seguidos pelos iridóforos, que são células com pigmentos brancos ou pratas, compostos principalmente por purinas, como guanina, adenina e hipoxantina. Estes pigmentos ficam armazenados em plaquetas organizadas em pilhas e apresentam a capacidade de refletir determinados comprimentos de onda. Por último temos os melanóforos, com a cor variando de marrom a preto, cujo pigmento é denominado eumelanina e é armazenado em melanossomos. Os melanóforos possuem processos dendríticos que se estendem entre as outras

células da unidade cromatófora até chegarem à área em que se localizam os xantóforos (Bagnara *et al.*, 1968; Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2003; Hildebrand e Goslow, 2004; Kardong, 2006; Kardong, 2011).

Algumas variações podem ocorrer na organização das unidades cromatóforas. Estas podem estar em contato entre si ou possuir espaços preenchidos por fibras colágenas entre elas. Outra variação é a espessura e quantidade de projeções dos melanóforos que varia de espécie para espécie. Além disso, os iridóforos podem se organizar de várias formas. Eles podem ser envolvidos pelo mesmo melanóforo, pode haver um melanóforo para cada iridóforo ou podem existir vários melanóforos para um iridóforo (Bagnara *et al.*, 1968).

A combinação dos pigmentos, o arranjo e a quantidade dos mesmos dentro das organelas, bem como a reflexão de determinados comprimentos de onda são responsáveis pela cor nos Anura (Hama, 1963; Bagnara *et al.*, 1968; Duellman e Trueb, 1994; Hildebrand e Goslow, 2004; Kardong, 2006; Kardong, 2011).

Entretanto, sabe-se que os anuros podem modificar sua coloração em função do ambiente ou da idade. Mudanças rápidas na coloração, chamadas de mudanças fisiológicas, se devem à mobilização intracelular das organelas pigmentadas, resultado de estimulação hormonal ou luminosa, e envolvem a dispersão ou agregação destas, juntamente com a reflexão da luz. Estas mudanças podem requerer apenas segundos e geralmente duram poucos minutos. Já as mudanças morfológicas de coloração, são lentas e envolvem a acumulação ou redução da quantidade total de pigmentos e podem ser influenciadas pela sazonalidade e idade do animal, podendo assim durar meses (Hama, 1963;

Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2003; Hildebrand e Goslow, 2004; Kardong, 2006; Kardong, 2011).

2.4 Características morfofisiológicas das glândulas tegumentares

Estudos envolvendo a descrição do tegumento de anuros levam em consideração principalmente as projeções e glândulas tegumentares, uma vez que estão intimamente relacionadas às defesas mecânica e química, sendo associados a diversos processos comportamentais e fisiológicos (Lillywhite *et al.*, 1997; Delfino *et al.*, 1998; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Rigolo *et al.*, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009; Jared *et al.*, 2009). Acredita-se que as glândulas tegumentares, com suas respectivas secreções, foram as principais adaptações do tegumento para a ocupação do ambiente terrestre e posteriormente dos diferentes habitats (Duellman e Trueb, 1994; Clarke, 1997).

A presença de glândulas mucosas e granulares é uma característica sinapomórfica dos Lissamphibia, o que significa que todos os anfíbios atuais apresentam pelo menos estes dois tipos glandulares (Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2003). Entretanto, há uma variação na quantidade, na estrutura e nas moléculas secretadas de acordo com a espécie e com a região corporal (Duellman e Trueb, 1994; Clarke, 1997; Lillywhite *et al.*, 1997; Nosi *et al.*, 2002; Pough *et al.*, 2003; Jared *et al.*, 2009).

Morfologicamente, as glândulas tegumentares são formadas por uma unidade secretora alveolar, um trato intercalar e um ducto que se projeta, da derme para a epiderme na direção da superfície corporal. Ao compará-las, percebe-se que as glândulas mucosas são menores e restritas à derme esponjosa, enquanto que as

glândulas granulares são maiores e podem apresentar a base projetada a derme compacta (Dapson, 1969; Duellman e Trueb, 1994; Lillywhite *et al.*, 1997; Terreni *et al.*, 2003; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Siegel *et al.*, 2008).

Nas glândulas mucosas, a porção secretora é formada por uma camada de células cúbicas, sendo seu conteúdo lançado no lúmen e ejetado para o exterior. Já as glândulas granulares possuem unidades secretoras sinciciais, com citoplasma multinucleado, sendo o seu conteúdo armazenado no citoplasma do sincício. Neste tipo de glândula, ocorre uma grande variação quanto às características morfológicas e químicas de sua secreção. Em ambas as glândulas, o conteúdo fica armazenado até que o estímulo para ejeção seja recebido (Dapson, 1969; Delfino *et al.*, 1998; Nosi *et al.*, 2002; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Delfino *et al.*, 2006; Kardong, 2006; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Siegel *et al.*, 2008; Jared *et al.*, 2009; Kardong, 2011).

Há grandes variações ultraestruturais nas células secretoras das glândulas mucosas, do sincício que forma as glândulas granulares e dos respectivos produtos de secreção. A produção e maturação do conteúdo a ser secretado são altamente complexas e variam entre espécies (Duellman e Trueb, 1994; Terreni *et al.*, 2003). Estas variações envolvem tanto a forma do grânulo quanto a sua elétrondensidade, bem como a distribuição e a quantidade de organelas celulares presentes na porção secretora (Terreni *et al.*, 2003; Siegel *et al.*, 2008). Em células serosas, por exemplo, a proporção de organelas envolvidas na síntese de proteínas é maior do que em células mucosas. Além disso, os grânulos das glândulas granulares apresentam subestruturas que envolvem etapas de síntese e maturação com estágios pré e pós Golgi peculiares em cada espécie, o que permite seu uso

como um parâmetro importante em estudos taxonômicos e filogenéticos (Terreni *et al.*, 2003; Delfino *et al.*, 2002).

O modo de secreção também varia entre os tipos glandulares. Geralmente as glândulas mucosas apresentam modo de secreção merócrino, sendo liberado de forma contínua e espontânea. Já as glândulas granulares são apócrinas ou holócrinas, sendo o seu conteúdo liberado em massa e com a degeneração das organelas presentes no sincício, necessitando de um estímulo sináptico ou hormonal para realizar a ejeção (Duellman e Trueb, 1994; Delfino *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2008).

Grande parte dos trabalhos utilizam técnicas histoquímicas como *periodic acid Schiff* (PAS), *alcian blue* em diferentes pHs (0,5, 1,0 e 2,5), azul de bromofenol, *sudan black* e *oil red O* para determinar as características da secreção. Os resultados mostram que as glândulas mucosas secretam principalmente glicoproteínas e glicosaminoglicanas neutras ou ácidas, nas formas sulfatadas e carboxiladas. Estas secreções contribuem para a manutenção da umidade, essencial para a ocorrência dos eventos fisiológicos desempenhados pelo tegumento. Portanto, elas auxiliam na troca de moléculas e íons, na locomoção, por ser capaz de reduzir o atrito, na adesão de machos e fêmeas durante o amplexo, além de retardar a perda de água e agir como um bacteriostático, impedindo a reprodução e entrada de patógenos (Parakkal e Matoltsy, 1964; Dapson, 1969; Duellman e Trueb, 1994; Clarke, 1997; Pough *et al.*, 2003; Hildebrand e Goslow, 2004; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Kardong 2006; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Pough *et al.*, 2008; Sahin *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2008; Rigolo *et al.*, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009; Jared *et al.*, 2009; Kardong, 2011).

Já as glândulas granulares secretam substâncias nocivas e altamente tóxicas, compostas por aminas biogênicas, polipeptídeos ativos, alcaloides, esteroides e proteínas, sendo atualmente utilizadas como ferramenta para estudos taxonômicos, fisiológicos e farmacológicos (Duellman e Trueb, 1994; Toledo e Jared, 1995; Clarke, 1997; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Kardong 2006; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009; Jared *et al.*, 2009; Faivovich *et al.*, 2010; Kardong, 2011).

O tegumento úmido e exposto a ambientes quentes é propício para o crescimento de bactérias e fungos que podem causar diversos danos a esses animais. A estratégia de defesa mais importante contra esses patógenos é a produção e secreção de peptídeos antimicrobianos e antifúngicos, que impedem o crescimento e a entrada desses patógenos (Conlon, 2011), além de protegerem quimicamente o animal contra predadores e atuar na homeostase do tegumento (Clarke, 1997).

Muitos trabalhos têm demonstrado a ação destes compostos como agentes terapêuticos, devido às suas propriedades antimicrobianas (Bevier *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; Conlon, 2011; Brand *et al.*, 2013), antifúngicas (Tempone *et al.*, 2007), antiprotozoários (Leite *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2007; Brand *et al.*, 2013), anestésicas e analgésicas (Toledo e Jared, 1995), anti-inflamatórias (Clarke, 1997; Dornelles *et al.*, 2010), vasodilatadoras ou vasoconstritoras (Conceição *et al.*, 2009), cardiotoxícas, miotóxicas e neurotóxicas (Toledo e Jared, 1995; Clarke, 1997; Pough *et al.*, 2003; Pough *et al.*, 2008; Jared *et al.*, 2009). Entretanto, como estratégia de defesa, as secreções podem causar edemas, necroses, taquicardia e morte dos predadores (Conceição *et al.*, 2007). A produção de moléculas tóxicas, principalmente os alcaloides, está intimamente relacionada

ao tipo de alimento disponível, pois é através da dieta que essas moléculas são sequestradas e posteriormente transportadas para a pele. Assim, animais mantidos por muito tempo em laboratórios não produzem secreções tóxicas (Daly *et al.*, 1984; Daly, 1995; Clarke, 1997; Daly *et al.*, 1997; Pough *et al.*, 2003; Pough *et al.*, 2008).

A família Dendrobatidae é considerada a mais venenosa do mundo, sendo seus animais caracterizados pela coloração aposemática e secreção de alcaloides altamente tóxicos. Curiosamente, o animal mais venenoso do mundo é um anura de aproximadamente 4 cm chamado *Phyllobates terribilis*. Típico da Colômbia, esta espécie apresenta hábitos diurnos e terrestres, sendo a secreção tegumentar utilizado por tribos nativas em flechas durante a caça (Myers *et al.*, 1978).

Faivovich *et al.* (2010) sugerem que moléculas secretadas por glândulas granulares presentes em alguns membros de Phyllomedusinae possam ser consideradas sinapomorfias dos clados. Outros estudos envolvendo a relação entre moléculas secretadas e taxonomia têm sido realizados, como o de Maciel *et al.* (2006), que trata da filogenia de espécies do grupo *Bufo crucifer* com base nas proteínas secretadas. Conlon (2011) mostra que a produção de peptídeos antimicrobianos pode ser uma característica tanto inter como intraespecífica, sendo que cada espécie de anuro secreta moléculas contra patógenos aos quais estão habituados a serem expostos. Com isto é possível compreender que a introdução de espécies de microrganismos exóticas no habitat dos anuros torna-se um problema de sanidade, ao considerar que o indivíduo não estará apto à produzir antibióticos específicos a elas, o que pode levar à sua morte (Bevier *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005).

Outros tipos glandulares já foram descritos em diversas espécies de anuros como as glândulas lipídicas, presentes em indivíduos do grupo Phyllomedusinae (Blaylock *et al.*, 1976) e em outros hilídeos (Amey e Grigg, 1995; Barbeau e Lillywhite, 2005), cuja função seria impermeabilizar e proteger o animal contra dessecação e auxiliar na termorregulação. Glândulas reprodutivas podem ser encontradas em microhilídeos, como *Gastrophryne carolinensis*, auxiliando tanto na adesão dos machos e fêmeas durante o amplexo (Siegel *et al.*, 2008), como na adesão de ovos em espécies marsupiais (Pough *et al.*, 2003). Glândulas diferentes em machos e fêmeas da mesma espécie já foram descritas e são consideradas como um dimorfismo sexual (Pough *et al.*, 2003; Brizzi *et al.*, 2002). Além disso, podem existir agrupamentos de glândulas granulares, cujo veneno seria acumulado em determinadas regiões corporais e que são muitas vezes utilizados para definir grupos taxonômicos, como as parotoídes em bufonídeos (Pough *et al.*, 2003; Jared *et al.*, 2009), tibiais em miobatrâquios e bufonídeos, lombares e ilíacas em leptodactilídeos (Delfino *et al.*, 1999; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008) e dorsolaterais em ranídeos (Duellman e Trueb, 1994). Estes agrupamentos são estruturas permanentes e atuam como mecanismos de defesa contra predadores (Pough *et al.*, 2003; Pough *et al.*, 2008).

Com toda a diversidade e complexidade das glândulas tegumentares, tanto morfológica quanto molecular, somente a espécie *Rhaebo guttatus* é capaz de ejetar o veneno a longas distâncias (Jared *et al.*, 2011). As demais dependem do auxílio de um mioepitélio contrátil ao redor de todas as glândulas para auxiliar à ejeção das substâncias pelo ducto (Duellman e Trueb, 1994; Delfino *et al.*, 1998; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Delfino *et al.*, 2006; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Rigolo *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2008;

Felseburgh *et al.*, 2009). Este mioepitélio é formado por células longas e achatadas, com núcleo central, alongado e achatado, tendo finos miofilamentos em seu citoplasma (Delfino *et al.*, 2006).

Nosi *et al.* (2002) e Delfino *et al.* (2006), ao testarem o efeito da norepinefrina no tegumento de *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* e *Hyla regilla*, perceberam que apesar do mioepitélio ser estruturalmente semelhantes em todas as glândulas, eles respondem a diferentes estímulos. As glândulas granulares, por exemplo, são as mais afetadas pela norepinefrina. Portanto, cada tipo glandular possui um conjunto de fatores regulatórios envolvidos na contração das células secretoras e assim elas podem liberar o seu produto em momentos fisiológicos independentes (Nosi *et al.*, 2002; Delfino *et al.*, 2006).

Dessa forma, as diversas peculiaridades inerentes a cada espécie têm servido para reforçar que o estudo do tegumento de anuros é essencial para entender os mecanismos comportamentais e fisiológicos dessas espécies, possibilitando também a construção do conhecimento científico em diversas outras áreas.

2.5 Referências

- AMEY, A.P., GRIGG, G.C., 1995. Lipid-reduced evaporative water loss in two arboreal hylid frogs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111, 283-291.
- AZEVEDO, A.A., SANTANA, A.S.J., BRITO-GIRITANA, L., 2006. Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. *Micron* 37, 223-228.

- BAGNARA, J.T., TAYLOR, J.D., HADLEY, M.E., 1968. The dermal chromatophore unit. *The Journal of Cell Biology* 38, 67-79.
- BARBEAU, T.R., LILLYWHITE, H.B., 2005. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *The Journal of Experimental Biology* 208, 2147-2156.
- BEVIER, C.R., SONNEVEND, A., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., NIELSEN, P.F., CONLON, J.M., 2004. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the mink frog (*Rana septentrionalis*). *Comparative Biochemistry and physiology* 139, 31-38.
- BLAYLOCK, L.A., RUIBAL, R., PLATT-ALOIA, K., 1976. Skin structure and wiping behavior of phyllomedusinae frogs. *Copeia* 1976, 283-285.
- BRAND, G.D., SANTOS, R.C., ARAKE, L.M., SILVA, V.G., VERAS, L.M.C., COSTA, C., COSTA, C.H.N., KUCKELHAUS, S.S., ALEXANDRE, J.G., FEIO, M.J., LEITE, J.R.S.A., 2013. The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: a source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules* 18, 7058-7070.
- BRITO-GITIRANA, L., AZEVEDO, R.A., 2005. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). *Micron* 36, 532-538.
- BRIZZI, R., DELFINO, G., PELLEGRINI, R., 2002. Specialized mucous glands and their possible adaptative role in the males of some species of *Rana* (amphibia, Anura). *Journal of Morphology* 254, 328-341.

- CLARKE, B.T., 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biology Review* 72, 365-379.
- CONLON, J.M., 2011. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Research* 343, 201-212.
- CONCEIÇÃO, K., BRUNI, F.M., ANTONIAZZI, M.M., JARED, C., CAMARGO, A.C.M., LOPES-FERREIRA, M., PIMENTA, D.C., 2007. Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypocondrialis*. *Toxicon* 49, 1054-1062.
- CONCEIÇÃO, K., BRUNI, F.M., SCIANI, J.M., KONNO, K., MELO, R.L., ANTONIAZZI, M.M., JARED, C., LOPES-FERREIRA, M., PIMENTA, D.C., 2009. Identification of bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa nordestina* skin secretion using electrospray ionization tandem mass spectrometry after single-step liquid chromatography. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 15, 633-652.
- DALY, J.W., 1995. The Chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9-13.
- DALY, J.W., GARRAFFO, H.M., HALL, G.S.E., COVER, J.F., 1997. Absence of skin alkaloids in captive-raised Madagascan mantelline frogs (*Mantella*) and sequestration of dietary alkaloids. *Toxicon* 35, 1131-1135.
- DALY, J.W., HIGHET, R.J., MYERS, C.W., 1984. Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellinae). *Toxicon* 22, 905-919.

- DAPSON, R.W., 1969. Histochemistry of mucus in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *The Anatomical Record* 166, 615-626.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., ALVAREZ, B.B., GENTILI, M., 1999. Granular cutaneous glands in the frog *Physalemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): comparasion between ordinary serous and 'inguinal' glands. *Tissue and Cell* 31, 576-586.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., KRACKE-BERNDORFF, R., ALVAREZ, B., 1998. Serous gland dimorphism in the skin of *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). *Journal of Morphology* 237, 19-32.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., NOSI, D., TERRENI, A., 2002. Serous cutaneous glands in new world hylids frogs: na ultrastructural study on skin posons confirms phylogenetic relationships between *Osteopilus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. *Journal of Morphology* 253, 176-186.
- DELFINO, G., DREWES, R.C., MAGHERINI, S., MALENTACCHI, C., NOSI, D., TERRENI, A., 2006. Serous cutaneous glands of the pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura, Hylidae): patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. *Tissue and Cell* 38, 65-77.
- DORNELLES, M.F., MARQUES, M.G.B., RENNER, M.F., 2010. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. *Ciência em Movimento* 24, 103-117.
- DUELLMAN, W.R., TRUEB, L., 1994. Biology of amphibians. 2 ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- ELIAS, H., SHAPIRO, J., 1957. Histology of the skin of some toads and frogs. *American Museum of Natural History* 1819, 1-27.

- FAIVOVICH, J., HADDAD, C.F.B., BAÊTA, D., JUNGFER, K.H., ÁLVARES, F.R., BRANDÃO, R.A., SHEIL, C., BARRIENTOS, L.S., BARRIO-AMORÓS, C.L., CRUZ, C.A.G., WHEELER, W.C., 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistic* 26, 227-261.
- FEIO, R.N., FERREIRA, P.L., 2005. Anfíbios de dois fragmentos de Mata Atlântica no município de Rio Novo, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zoociências* 7, 121-128.
- FELSEMBURGH, F.A., ALMEIDA, P.G., CARVALHO-E-SILVA, S.P., BRITO-GITIRANA, L., 2009. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron* 40, 198-205.
- FELSEMBURGH, F.A., CARVALHO-E-SILVA, S.P., BRITO-GIRITANA, L., 2007. Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron* 38, 439-445.
- FROST, D.R., 2013. Amphibians species of the world: an online reference. Disponível em <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>. Acessado em 15 de dezembro de 2013.
- GONÇALVES, V.F., BRITO-GITIRANA, L., 2008. Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *Micron* 39, 32-39.
- HADDAD, C. F.B., TOLEDO, L.F., PRADO, C.P.A., 2008. Anfíbios da Mata Atlântica: guia dos anfíbios anuros da Mata Atlântica. Neotropica, São Paulo.

- HAMA, T., 1963. The relation between the chromatophores and pterin compounds. *Annals New York Academy of Sciences* 100, 977-986.
- HILDEBRAND, M., GOSLOW, G., 2004. Análise da estrutura dos vertebrados. 2.ed. Atheneu, São Paulo.
- IUCN, 2013. Espécies de anfíbios ameaçados de extinção. Disponível em http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2010_4RL_Stats_Table_1.pdf. Acessado em 12 de setembro de 2013.
- JARED C., ANTONIAZZI, M.M., VERDADE, V.K., TOLEDO, L.F., RODRIGUES, M.T., 2011. The Amazonian toad *Rhaebo guttatus* is able to voluntarily squirt poison from the paratoid macroglands. *Amphibia-Reptilia* 32, 546-549.
- JARED, C., ANTONIAZZI, M.M., JORDÃO, A.E.C., SILVA, J.R.M.C., GREVEN, H., RODRIGUES M.T., 2009. Paratoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. *Toxicon* 54, 197-207.
- JUNCÁ, F.A., 2006. Diversidade e uso de habitat por anfíbios anuros em duas localidades de Mata Atlântica, no norte do estado da Bahia. *Biota Neotropica* 6, 1-17.
- KARDONG, K.V., 2006. Vertebrates- Comparative Anatomy, function, evolution. 4ed. The McGraw-Hill, New York.
- KARDONG, K.V., 2011. Vertebrados- Anatomia comparada, função e evolução. 5ed. Rocca, São Paulo.

- LEITE, J.R.S.A., SILVA, L.P., RODRIGUES, M.I.S., PRATES, M.V., BRAND, G.D., LACAVA, B.M., AZEVEDO, R.B., BOCCA, A.L., ALBUQUERQUE, S., BLOCH, C.J., 2005. Phylloseptin: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from *Phyllomedusa* genus. *Peptides* 26, 565-573.
- LILLYWHITE, H.B., MITTAL, A.K., GARG, T.K., AGRAWAL, N., 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behavior in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of zoology, London* 243, 675-687.
- MACIEL, N.M., SCHWARTZ, C.A., COLLI, G.R., CASTRO, M.S., FONTES W., SCHWARTZ, E.N.F., 2006. A Phylogenetic analysis of species in the *Bufo crucifer* group (Anura: Bufonidae), based on indolealkylamines and proteins from skin secretions. *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 457-466.
- MANGIONE, S., GARCIA, G., CARDOZO, O.M., 2011. The Eberth-Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). *Acta Zoologica* 92, 21-26.
- MARQUES, O.A.V., DULEBA, W., 2004. Estação ecológica Juréia – Itatins. Ambiente físico, flora e fauna. 1ed. Holos, Ribeirão Preto.
- MORELLATO, P.C., 1992. Historia Natural da Serra do Japi- ecologia e preservação de uma área florestal do sudeste do Brasil. 1ed. Unicamp/Fapesp, Campinas.
- MYERS, C.W., DALY, J.W., MALKIN, B., 1978. A dangerously toxic new frog *Phyllobates* used by Emberá Indians of Western Colombia, with discussion of

- blowgun fabrication and dart poisoning. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 161, 307-366.
- NOSI, D., TERRENI, A., ALVAREZ, B.B., DELFINO, G., 2002. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hipocondrialis* azurea (Anura, Hylidae): response by different gland types to norepinephrine stimulation. *Zoomorphology* 121, 139-148.
- PARAKKAL, P.F., MATOLTSY, A.G., 1964. A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens*. *The Journal of Cell Biology* 20, 85-94.
- PELLI, A.D., CINELLI, L.P., MOURÃO, A.D.S., BRITO-GITIRANA, L., 2010. Glycosaminoglycans and glycoconjugates in the adult anuran integument (*Lithobates catesbeianus*). *Micron* 41, 660-665.
- POMBAL-JR, J.P., HADDAD, C.F.B., 1992. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 52, 217-229.
- POUGH, F. H., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITSKY, A.H., WELLS, K.D., 2003. Herpetology. 3ed. Person Prentice Hall, Saddle River.
- POUGH, F. H., JANIS, C.M., HEISER, J.B., 2008. A vida dos Vertebrados. 4ed. Atheneu. São Paulo.
- REDFORD, K.H., COPPOLLO, P., SANDERSON, E.W., DA FONSECA, G.A.B., DINERSTEIN, E., GROVES, C., MACE, G., MAGINNIS, S., MITTERMEIER, R.A., NOSS, R., OLSON, D., ROBINSON, J.G.,

- VEDDER, A., WRIGTH, M., 2003. Mapping the conservation landscape. *Conservation Biology* 17, 116-131.
- RIGOLO, J.R., ALMEIDA, J.A., ANANIAS, F., 2008. Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus* aff. *venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae). *Micron* 39, 56-60.
- SAHIN, M., GUMUS, A., BALCAN, E., 2008. Glycoconjugate histochemistry of mucous glands in the skin of metamorphosing *Bufo viridis*. *Biologia* 63, 444-449.
- SBH, 2013. Espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/checklist_brasil.asp. Acessado em 16 de outubro de 2013.
- SHINAGAWA, Y., SHINAGAWA, Y., 1974. Studies on the collagen fibrils in amphibian skin by means of thin sectioning and densitometric method. *Journal of Electron Microscopy* 23, 161-165.
- SIEGEL, D.S., SEVER, D.M., SCHRIEVER, T.A., CHABARRIA, R.E., 2008. Ultrastructure and histochemistry of the adhesive breeding glands in male *Gastrophryne carolinensis* (Amphibia: Anura: Mycrohylidae). *Copeia* 4, 877-881.
- TEMPONE, A.G., MELHEM, M.S.C., PRADO, F.O., MOTOIEL, G., HIRAMOTO, R.M., ANTONIAZZI, M.M., HADDAD, C.F.B., JARED, C., 2007. Amphibian secretions for drug discovery studies: A search for new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design and Discovery* 4, 67-73.

- TERRENI, A., NOSI, D., GREEVEN, H., DELFINO, G., 2003. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation comparison with larval glands in specimens of other families. *Tissue and Cell* 35, 274-287.
- TOLEDO, R.C., JARED, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A, 1 - 29.
- WOEHL, G., WOEHL, E.N., 2008. Anfíbios da Mata Atlântica. Instituto Rã-Bugio. disponível em http://www.ra-bugio.org.br/anfibios_pererecas.php. Acessado em 01 de setembro de 2013.

3. Capítulo I

Características do tegumento de *Phyllomedusa burmeisteri* e *Hypsiboas semilineatus* e sua relação com o habitat e o comportamento animal

3.1 Introdução

A família Hylidae é a maior e a mais diversificada dentro dos anfíbios anuros do mundo, com 355 espécies viventes no Brasil. As espécies *Phyllomedusa burmeisteri* e *Hypsiboas semilineatus*, pertencentes a essa família, estão distribuídas principalmente em regiões de Mata Atlântica, podendo a primeira ser também encontrada em ambientes de cerrado (Amphibiaweb, 2013; IUCN 2013; SBH, 2013).

O tegumento dos anuros apresenta características únicas que permitem a sobrevivência desses animais em condições ambientais diversas (Pough *et al.*, 2003, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009). Este órgão é responsável por vários processos metabólicos essenciais, como a troca gasosa e iônica, a termorregulação, a defesa mecânica e química e a percepção sensorial (Duellman e Trueb, 1994; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009; Pelli *et al.*, 2010; Mangione *et al.*, 2011).

Sabe-se que o comportamento dos anuros é intimamente influenciado pela morfologia e pela função do tegumento (Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Jared *et al.*, 2009). Características macroscópicas desse órgão, como a presença de verrugas, tubérculos e espinhos, têm sido descritas e relacionadas ao habitat de algumas espécies, tendendo a ser espécie-específica (Elias e Shapiro, 1957; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009). Foi encontrado apenas um trabalho que documentou a presença dessas projeções em membros da família Hylidae (Elias e Shapiro, 1957). Porém, neste não foi feita qualquer relação entre dados morfológicos e funcionais do tegumento com a biologia desses animais.

A estrutura básica do tegumento dos anuros é composta por uma epiderme com epitélio estratificado formado por três camadas: a córnea, mais externa, a intermediária e a basal, mais interna. Nestas é possível identificar diferentes tipos celulares, como queratinócitos, células de Merkel e células em forma de moringa (*Flask Cell*). Abaixo da epiderme está localizada a derme, dividida em derme esponjosa, composta por tecido conjuntivo frouxo, células cromatóforas, mastócitos, fibroblastos, fibrócitos e glândulas mucosas e granulares, e em derme compacta, formada por tecido conjuntivo denso não modelado contendo essencialmente fibras colágenas, vasos sanguíneos e nervos (Parakkal e Matoltsy, 1964; Duellman e Trueb, 1994; Hildebrand e Goslow, 2004; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Rigolo *et al.*, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009; Jared *et al.*, 2009). Em algumas espécies, como *Bufo ictericus* (Azevedo *et al.*, 2005) e *Rana casteisbeiana* (Azevedo *et al.*, 2006), entre as dermes é possível observar uma camada calcificada denominada Eberth-Katschenko (E-K), que auxilia na retenção de água no tegumento (Azevedo *et al.*, 2005; Mangione, 2011). No entanto, não foram encontrados trabalhos avaliando a presença desta camada em hilídeos.

As glândulas tegumentares, mucosas e granulares, participam ativamente das funções do tegumento a partir da produção e secreção de substâncias. Geralmente as glândulas mucosas são menores e formadas por células cúbicas na porção secretora, sendo produtoras de moléculas que umidificam a pele e favorecem as trocas gasosas e iônicas (Els e Henneberg, 1990; Brito-Gitirana *et al.*, 2007; Sahin *et al.*, 2008; Pelli *et al.*, 2010). Já as glândulas granulares são grandes e sinciciais, capazes de armazenar a secreção em grânulos dispersos no citoplasma. Estes grânulos contêm moléculas que participam da defesa química,

protegendo-os de predadores e impedindo o desenvolvimento e a entrada de patógenos pelo tegumento (Duellman e Trueb, 1994; Toledo e Jared, 1995; Dornelles *et al.*, 2010; Conlon, 2011). A forma, a intensidade de coloração e o tamanho desses grânulos podem variar entre espécies (Duellman e Trueb, 1994; Schumacher *et al.*, 1994; Toledo e Jared, 1995; Delfino *et al.*, 1998; Brizzi *et al.*, 2002).

Já foram descritas diferenças entre tegumentos de anuros quanto à quantidade de glândulas em relação à região corporal (Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008) e a presença de diferentes tipos glandulares (Delfino *et al.*, 1998; Delfino *et al.*, 1999), como glândulas lipídicas (Amey e Grigg, 1995; Nosi *et al.*, 2002; Barbeau e Lillywhite, 2005), seromucosas (Rigolo *et al.*, 2008) e macroglândulas como as parotoides (Jared *et al.*, 2009), além da presença de glândulas relacionadas ao sexo (Brizzi *et al.*, 2002). Apesar da semelhança morfológica entre elas, apresentando ducto e porção secretora alveolar, o produto de secreção é muito variado (Duellman e Trueb, 1994; Toledo e Jared, 1995; Brizzi *et al.*, 2002; Jared *et al.*, 2009).

A estereomicroscopia, associada à microscopia eletrônica de varredura e transmissão e a microscopia de luz, tem auxiliado no entendimento da morfologia do tegumento (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009), contribuindo na ampliação dos conhecimentos sobre a biologia de diversas espécies. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos histológicos, histoquímicos e ultraestruturais do tegumento, em três regiões corporais de *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) e *Phyllomedusa burmeisteri* (Boulenger, 1882), encontradas em um fragmento de Mata Atlântica, relacionando-os ao comportamento e micro-habitat desses indivíduos.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Captura dos animais

Quatro exemplares machos de cada uma das espécies, *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) e *Phyllomedusa burmeisteri* (Boulenger, 1882), foram coletados durante o período chuvoso na Lagoa da Mata da Biologia, localizada no Campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa/MG (20°45'27,5"S e 42°51'38,7"W), sob a licença do IBAMA número 10504-1. As coletas foram realizadas por meio de procura ativa e visualização direta, com a utilização de lanternas, entre 18 h e 23 h. Após a captura, os animais foram colocados em sacos plásticos contendo um pouco de água e ar e transportados vivos para o Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, onde permaneceram até o momento da eutanásia.

3.2.2 Biometria corporal, eutanásia e obtenção do tegumento

Os animais foram medidos quanto ao seu comprimento rostro-cloacal e pesados, utilizando-se paquímetro de metal e balança de precisão de 0,001g (Bel Engineering® 210A), respectivamente. Em seguida, realizou-se a eutanásia aplicando-se xilazina (10 mg/kg/IM) e quetamina (150 mg/kg/IM), para sedação e anestesia, e posterior decapitação, conforme as normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária - Resolução N° 1000 de 11 de maio de 2012 (CFMV, 2013) sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV (processo 067/2012).

Três regiões corporais, cabeça, tronco dorsal e tronco ventral, foram dissecadas, com auxílio de bisturi e tesoura, para obtenção de fragmentos do

tegumento. Cada uma foi identificada quanto ao número do animal e região do corpo. As amostras foram fixadas por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h, para análise em microscopia de luz, e em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Souza, 2007), para a avaliação em microscopia eletrônica de varredura, transmissão e espectroscopia de raios X.

3.2.3 Avaliação do tegumento sob microscopia de luz

3.2.3.1 Processamento histológico

Amostras do tegumento de cada região corporal e de cada espécie foram processadas histologicamente para inclusão em parafina e resina. Para o primeiro meio de inclusão, as amostras fixadas foram desidratadas em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e absoluto), com banhos de 1 h em cada concentração, sendo realizado três banhos em álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol, fazendo-se três passagens de 1 h em cada banho, e embebidas em parafina, também em três banhos, por 1 h cada. As amostras do tegumento emblocadas em parafina foram levadas ao micrótomo (Leica, RM2155) para a obtenção de secções de 5 µm de espessura, utilizando-se navalhas de aço.

Já as amostras para inclusão em glicol metacrilato (Historesina, Leica[®]) foram desidratadas seguindo a mesma série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e absoluto), sendo que os banhos foram de 30 min em cada solução. Na sequência, o material passou por infiltração em historesina usada, por 24 h, e em historesina nova por 2 h, quando foi emblocado em resina com polimerizador. Foram obtidos

cortes histológicos do tegumento com 3 µm de espessura em micrótomo (Leica, RM2155), utilizando navalhas de vidro.

Os cortes histológicos incluídos em parafina e resina foram montados, entre lâmina e lamínula após as colorações, utilizando-se resina de montagem (Entellan[®]).

3.2.3.2 Colorações histológicas e histoquímicas

Todas as colorações utilizadas foram feitas em cortes histológicos incluídos em parafina e historesina. A exceção ocorreu na histoquímica para a detecção de lipídeos, cujo material foi fixado em paraformaldeído 4% tamponado e diretamente infiltrado por 24 h, e emblocado em resina, sem desidratação prévia.

A descrição histológica do tegumento foi realizada utilizando-se as seguintes colorações: hematoxilina-eosina (HE), para avaliação da arquitetura do órgão e afinidade ácido-básica dos seus constituintes (Tolosa *et al.*, 2003) e azul de toluidina, para evidenciar a presença de células e estruturas metacromáticas (Tolosa *et al.*, 2003).

Já as avaliações histoquímicas foram feitas utilizando as técnicas de *periodic acid schiff* (PAS), que identifica polissacarídeos neutros e glicoproteínas (Bancroft e Cook, 1994), *alcian blue* pH 2.5, que marca polissacarídeos ácidos nas formas sulfatadas e carboxiladas (Pearse, 1968), mercúrio de bromofenol, que evidencia a presença de proteínas totais (Pearse, 1968), e *oil red O*, utilizado para marcar lipídeos (Bancroft e Stevens, 1996). Os protocolos utilizados para cada coloração estão descritos nos anexos I a VI.

3.2.3.3 Avaliação dos tipos de fibras colágenas em microscopia de polarização

Utilizou-se a coloração de *picrosirius red* (anexo VII) para caracterizar as fibras colágenas existentes no tegumento (Junqueira *et al.*, 1979). Após a coloração, as lâminas histológicas foram visualizadas em microscópio de luz (Olympus BX-53), equipado com lente polarizadora e filtro que permitem a visualização das fibras colágenas do tipo I em vermelho e III em tons que variam de amarelo a verde.

3.2.3.4 Histomorfometria do tegumento

Análises histomorfométricas do tegumento foram feitas utilizando-se cortes histológicos incluídos em resina e corados em HE. Foram fotografados, aleatoriamente, 10 campos histológicos por região e por animal em fotomicroscópio (Olympus BX-53), pertencente ao Laboratório de Sistemática Molecular da UFV.

Utilizando-se o programa *Image ProPlus*, pertencente ao Laboratório de Biologia Vegetal da UFV, foram feitas as seguintes mensurações: espessura da epiderme, derme esponjosa e derme compacta, número de glândulas por área, altura e largura das mesmas.

3.2.3.5 Análise estatística

Os resultados histomorfométricos obtidos para as regiões corporais dentro da mesma espécie foram avaliados através da comparação entre as médias. Quando se fez a comparação entre espécies para cada parâmetro analisado, em cada região, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e

teste de Tukey a 5% de significância. Para isso, utilizou-se o programa Genes, pertencente à UFV. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

3.2.4 Avaliação do tegumento sob estereomicroscopia

Cinco exemplares de cada espécie provenientes da coleção herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen da UFV, *Campus* Viçosa, foram analisados quanto à morfologia da superfície tegumentar da cabeça, tronco dorsal e ventral. Estes animais foram fixados em formol 10% e mantidos em álcool 70%. As superfícies corporais foram visualizadas e fotografadas utilizando-se estereomicroscópio *Zeiss V20* e software *AxionVision*, pertencentes ao Laboratório de Ortopterologia da UFV.

3.2.5 Avaliação do tegumento em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras das três regiões tegumentares foram fixadas por 2 h em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 para análise da sua superfície. Em seguida, as amostras foram lavadas (2x) em tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 2 h. Depois de novamente lavadas em tampão, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcool etílico, durante 15 min em cada concentração (70, 80, 90, 95 e 100%), e submetidas ao ponto crítico utilizando CO₂. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro e observadas ao microscópio de varredura LEO VP1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.2.6 Avaliação do tegumento sob espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS)

A presença da camada E-K foi avaliada a partir da análise de distribuição de elementos químicos no tecido: carbono, sódio, magnésio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio e zinco. Para isto, amostras do tegumento das três regiões corporais foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, as amostras foram lavadas (2x) em tampão e embebidas em solução de glicerina 30% por 3 h, seguida por criofratura com nitrogênio líquido e desidratada em série alcoólica crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), durante 10 min em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao ponto crítico utilizando CO₂ e cobertas com carbono. O material processado foi fixado no suporte para visualização das camadas do tegumento. As análises por EDS foram feitas em microscópio eletrônico de varredura LEOVP 1430, com aumento de 800X e com 20Kv de tensão de voltagem, utilizando o *software Iridium Ultra*, pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.2.7 Avaliação do tegumento em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para avaliação da ultraestrutura dos componentes tegumentares, amostras foram fixadas por 2 h em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Em seguida, elas foram lavadas (2x) em tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 2 h. Após duas lavagens no tampão cacodilato de sódio, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 95%), por 20 min para cada concentração e transferido para três banhos em álcool absoluto. Posteriormente, o material permaneceu por 15 min em mistura de álcool: resina

Spurr na proporção de 3:1, 15 min em álcool: resina Spurr na proporção de 1:1, 30 min em álcool: resina Spurr na proporção de 1:3 e, por último, permaneceram 48 h em resina pura. As amostras foram polimerizadas com resina Spurr (Spurr, 1969) a 60 °C durante três dias.

Secções semi-finas com 0,5 µm de espessura foram obtidas em ultramicrótomo (*Sorvall MT-2B ultra microtome*) e, posteriormente, coradas com azul de toluidina 1% a 60 °C. Secções ultrafinas (80 nm) foram obtidas com o auxílio de navalha de vidro e colocadas em grade de cobre, contrastadas por 15 min em acetato de uranila aquosa 1% e 10 min em citrato de chumbo (Reynolds, 1963). Por fim, as imagens foram capturadas no microscópio eletrônico de transmissão *Zeiss EM 109* do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.3 Resultados

3.3.1 Biometria corporal de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*

Com relação à biometria corporal, os espécimes *P. burmeisteri* (Fig. 1A) pesaram em média 15,03 g ± 4,07 e apresentaram comprimento rostro-cloacal médio de 6,9 cm ± 0,83, enquanto que os animais da espécie *H. semilineatus* (Fig. 1E) apresentaram, respectivamente, médias de 3,45 g ± 0,66 e 4,1 cm ± 0,38.

3.3.2 Morfologia e histoquímica do tegumento nas três regiões corporais de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*

As análises morfológicas da superfície tegumentar de *P. burmeisteri* mostraram pequenas verrugas na região da cabeça (Fig. 1B) e tronco dorsal (Fig. 1C), sendo nesta última mais planas, e grandes verrugas no tronco ventral (Fig.

1D), com algumas projeções no ápice e separadas por estrias profundas (Fig. 2C). Na cabeça, as verrugas se mostraram mais altas, arredondadas e com espaços maiores entre elas (Fig. 2A), enquanto que no tronco dorsal elas são mais baixas, com ápice plano, e mais próximas umas das outras (Fig. 2B).

Em *H. semilineatus*, a região da cabeça e tronco dorsal apresentaram verrugas menores que as de *P. burmeisteri* (Fig. 1F, G e 2D). Já o tegumento do tronco ventral possui grandes verrugas, porém mais baixas que as descritas para *P. burmeisteri*, com estrias rasas separando-as (Fig. 1H e 2F).

Não foram visualizados tubérculos e espinhos no tegumento das duas espécies. Abertura de ductos glandulares, de formato elíptico ou triângular foram encontrados nas duas espécies e nas três regiões estudadas (Fig. 2E).

Em todo o tegumento das duas espécies, a epiderme apresentou epitélio estratificado pavimentoso com aproximadamente cinco camadas celulares, sendo a mais externa, o estrato córneo, pouco queratinizado e composto por uma camada de células achatadas com núcleos alongados (Fig. 3A). Logo abaixo, observou-se o estrato intermediário, composto por células achatadas a cúbicas, com núcleo oval e central (Fig. 3B). Grande quantidade de desmossomos, unindo as membranas celulares, foram visualizados nesta região (Fig. 3C). Por último, o estrato basal, composto por uma camada de células com formato variando de cúbico a colunar e núcleo central (Fig. 3B). Células de Merkel, identificadas pelo citoplasma claro e núcleo oval (Fig. 3D), e células em forma de moringa, também chamadas de *Flask Cell*, alongadas e com núcleo basal, estavam presentes no estrato intermediário (Fig. 3E).

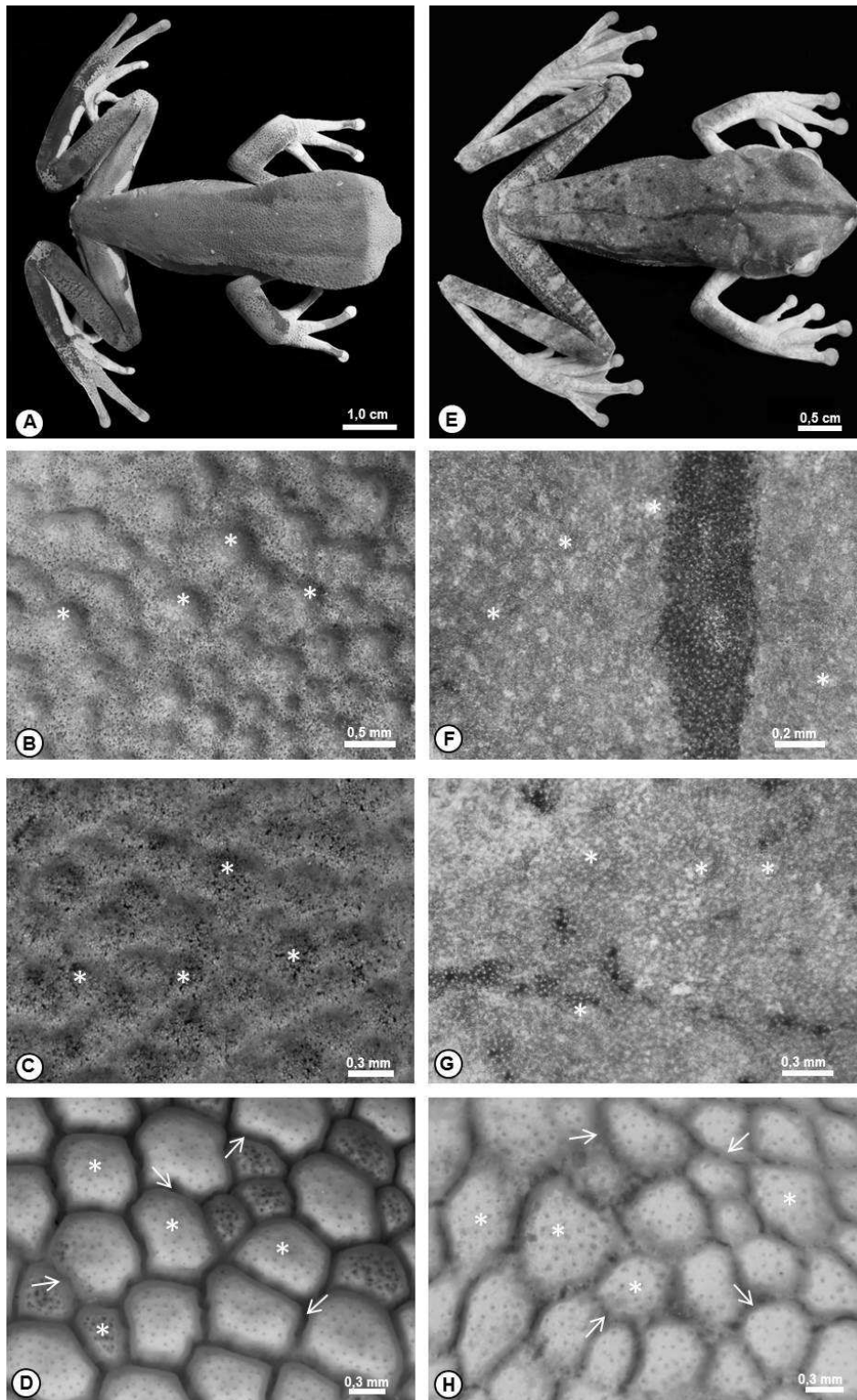


Figura 1: As figuras A-D correspondem à espécie *P. burmeisteri* e as figuras E-H correspondem à espécie *H. semilineatus*. A e E- Fotografia de um exemplar macho de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, respectivamente. As Figuras B-D e H são imagens obtidas em estereomicroscopia, já F e G são fotografias do tegumento que mostram: B e F- Região da cabeça evidenciando a presença de verrugas (*); C e G- Região do tronco dorsal mostrando verrugas (*); D e H- Região do tronco ventral mostrando a presença de verrugas (*) e estrias (seta). As fotografias A, B, F e G foram feitas por José Lino Neto.

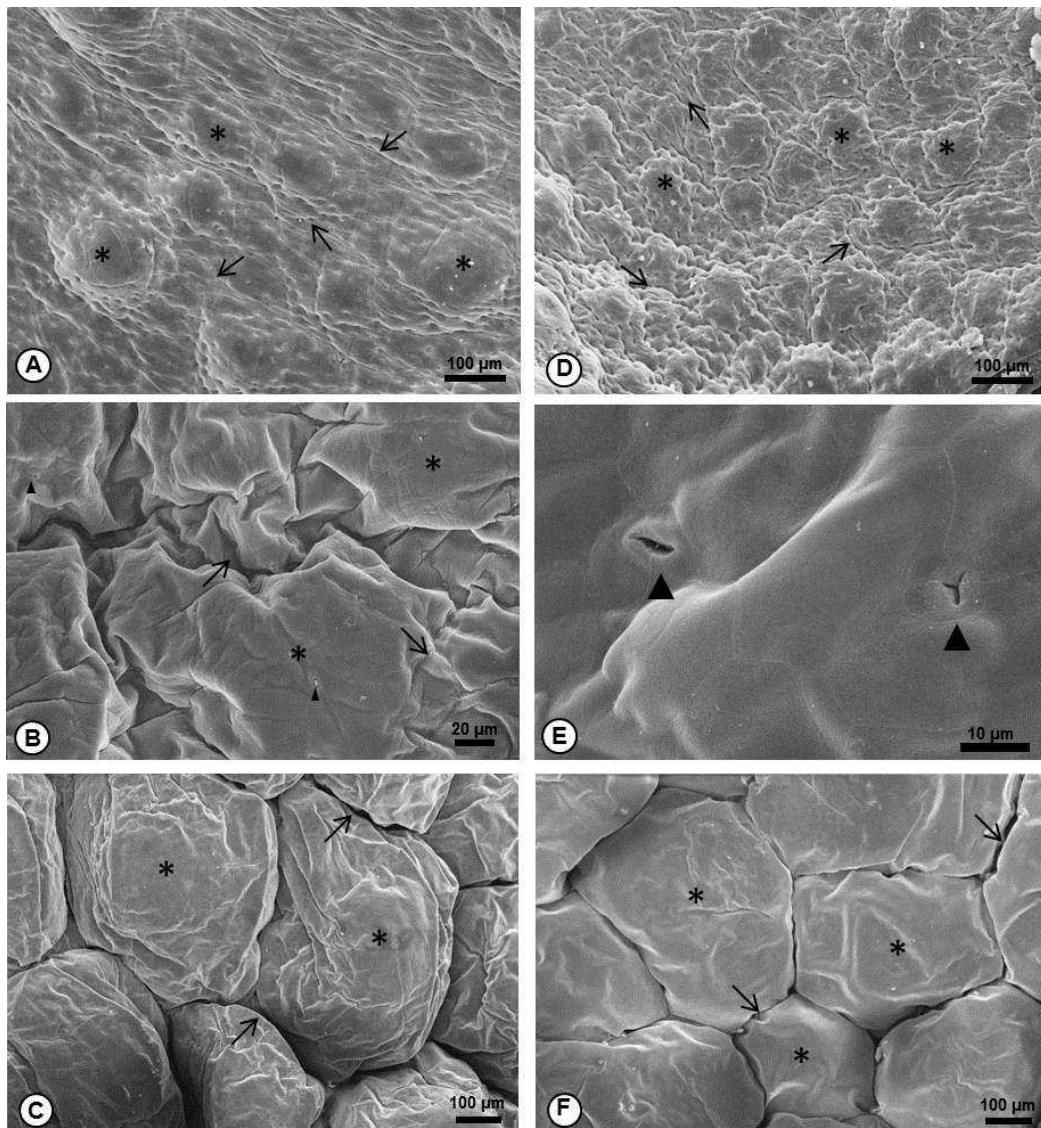


Figura 2: Fotomicrografias eletrônicas de varredura de *P. burmeisteri* (A-C) e *H. semilineatus* (D-F) mostrando o tegumento das regiões corporais da cabeça (A e D), tronco dorsal (B) e tronco ventral (C e F) com verrugas (*), estrias (setas) e abertura das glândulas (cabeça de seta). E- Região do tronco dorsal evidenciando as diferentes formas da abertura dos ductos das glândulas tegumentares (cabeça de seta).

Os resultados histoquímicos mostraram células PAS positivas no estrato intermediário da epiderme (Fig. 3F). Além disso, a lâmina basal, que separa a epiderme da derme também foi positiva para esta técnica (Fig. 4A).

Abaixo da lâmina basal, nas três regiões corporais e nas duas espécies, está a derme esponjosa, formada por tecido conjuntivo frouxo (Fig. 4A), levemente alcianofílico (Fig. 4B), com fibrócitos (Fig. 4A), células metacromáticas, como mastócitos (Fig. 4C), glândulas exócrinas (Fig. 3F e 4B), nervos e vasos sanguíneos. Fibras colágenas do tipo I e III foram identificadas pela coloração vermelha e amarelo-esverdeado, respectivamente (Fig. 4D).

Abaixo da lâmina basal, na derme esponjosa, estão as unidades cromatóforas. No tegumento da cabeça e do tronco dorsal de *P. burmeisteri*, esta unidade é composta por três tipos celulares: os xantóforos, mais superficiais, com formato globular, núcleo redondo e central, seguidos dos iridóforos, células amareladas de formato alongado e núcleo basal, e por fim, os melanóforos, contendo grânulos de melanina circular e cor escura. Estas células possuem prolongamentos dendríticos que se estenderam em direção aos xantóforos (Fig. 5A). Já em *H. semilineatus* não foi observada uma unidade cromatófora tão organizada nestas regiões, quanto ao observado em *P. burmeisteri*. Os iridóforos estão organizados em duas a três camadas celulares e circundados por melanóforos, dispostos de maneira aleatória, mais amarronzados e com grânulos não tão evidentes quanto os de *P. burmeisteri*. Não foi observada a presença de xantóforos (Fig. 5B).

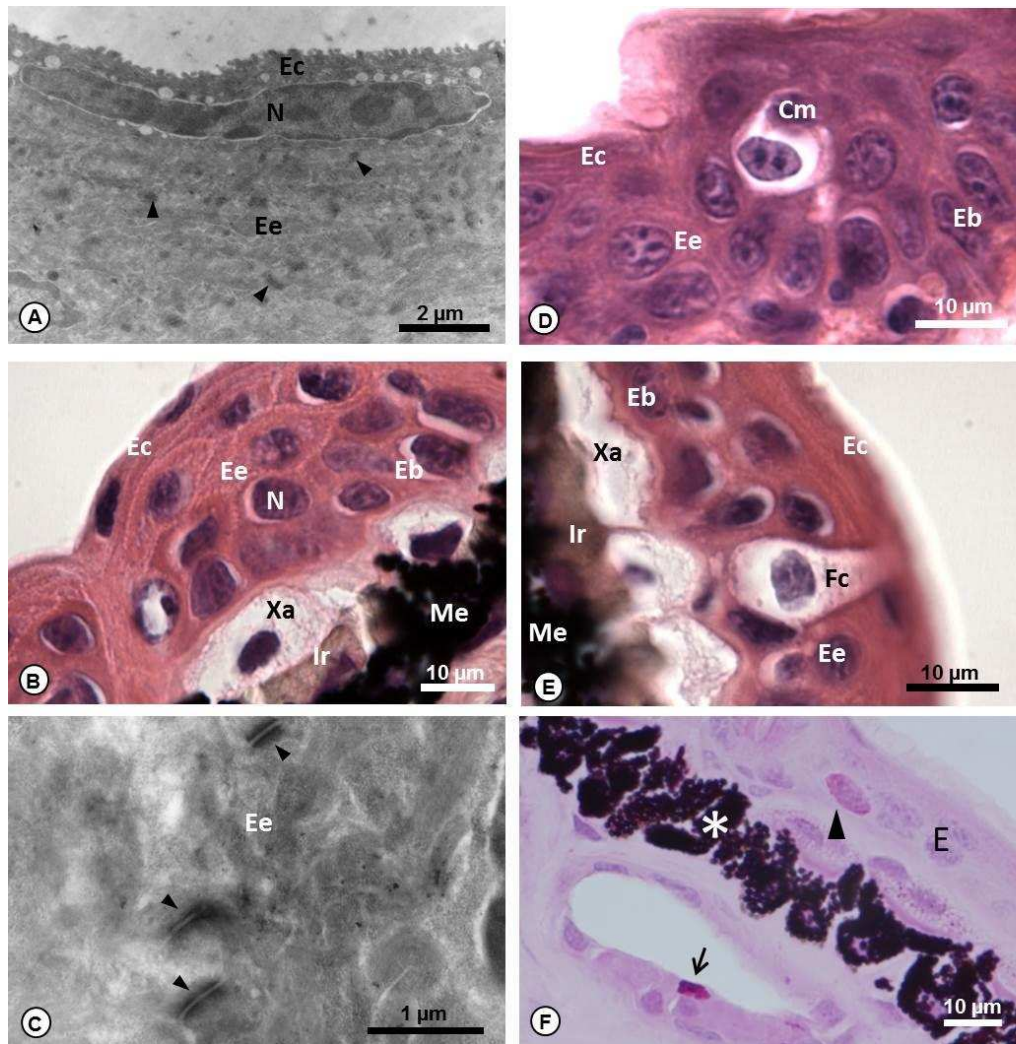


Figura 3: **A-** Secção transversal da epiderme de *H. semilineatus*, evidenciando o estrato córneo (Ec) com células nucleadas (N) e estrato espinhoso (Ee) com diversos desmossomos (cabeça de seta) (MET). **B-** Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri*, mostrando-a formada por um estrato córneo (Ec), espinhoso (Ee) e basal (Eb), todos nucleados (N). Logo abaixo, observa-se as unidades cromatóforas formadas por xantóforos (Xa), iridóforos (Ir) e melanóforos (Me). Coloração: HE. **C-** Secção transversal da epiderme de *H. semilineatus* evidenciando desmossomos (cabeça de seta) no estrato espinhoso (Ee) (MET). **D-** Secção transversal da epiderme de *H. semilineatus*, mostrando os estratos córneo (Ec), espinhoso (Ee) e basal (Eb), além de células de Merkel (Cm). Coloração: HE. **E-** Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri*, mostrando o estrato córneo (Ec), espinhoso (Ee) e basal (Eb), Flask Cell (Fc) e unidades cromatóforas, formadas por xantóforos (Xa), iridóforos (Ir) e melanóforos (Me). Coloração: HE. **F-** Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri*, mostrando unidades cromatóforas (*), células PAS positivas (cabeça de seta) na epiderme (E) e nas glândulas seromucosas (seta). Coloração: PAS.

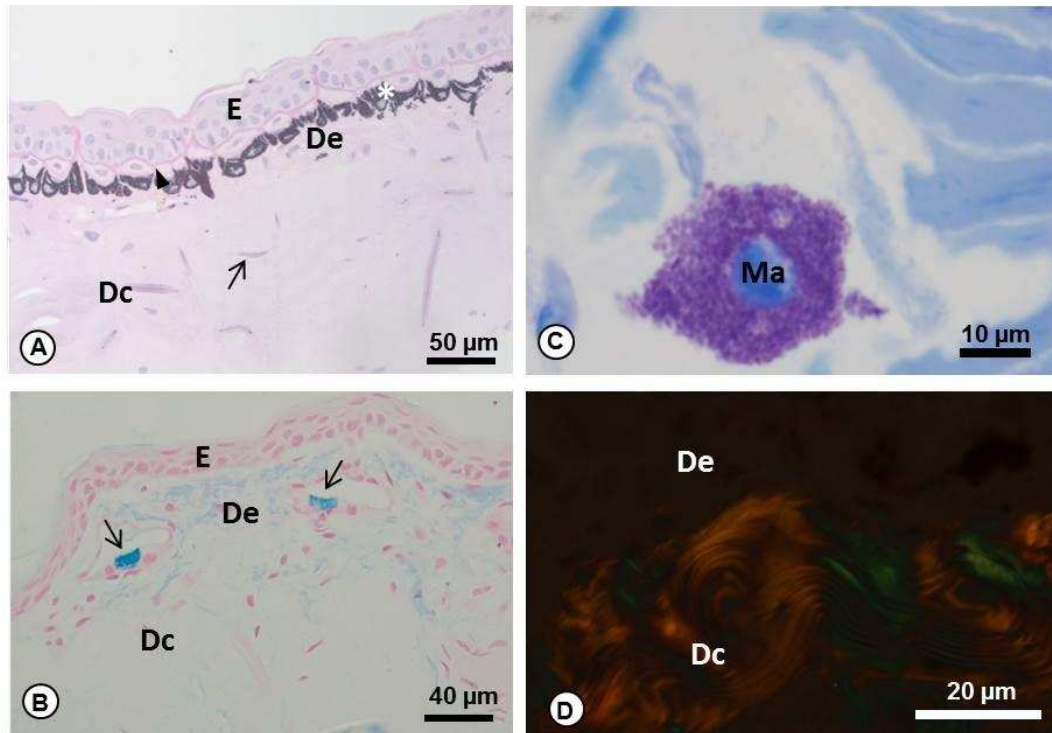


Figura 4: **A-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), derme esponjosa (De) e compacta (Dc), unidades cromatóforas (*), fibrócitos (seta) e lâmina basal PAS positiva (cabeça de seta). Coloração: PAS. **B-** Secção transversal do tegumento de *H. semilineatus*, mostrando a epiderme (E), derme esponjosa (De) e compacta (Dc), além de células das glândulas seromucosas AB⁺ (seta). Coloração: Alcian Blue pH 2,5. **C-** Secção transversal do tegumento de *H. semilineatus* mostrando mastócitos metacromáticos. Coloração: azul de toluidina. **D-** Secção transversal do tegumento de *H. semilineatus* mostrando derme esponjosa (De), derme compacta (Dc) com fibras em vermelho (tipo I) e verde (tipo III). Coloração: Picrosirius Red.

No tronco ventral das duas espécies, notou-se a ausência de unidades cromatóforas, entretanto foi possível encontrar iridóforos e melanóforos dispostos aleatoriamente no tecido (Fig. 5C).

Em *P. burmeisteri*, as análises ultraestruturais revelaram organelas pigmentadas e redondas em todo o citoplasma dos xantóforos, plaquetas refletoras de luz nos iridóforos e melanossomos pigmentados nos melanóforos (Fig. 5D). Além disso, os prolongamentos dos melanóforos entremearam as outras células da unidade, separando-as (Fig. 5D).

Em *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, nas três regiões corporais a camada mais profunda do tegumento, denominada derme compacta, é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, contendo basicamente fibrócitos mergulhados em uma extensa matriz extracelular (Fig. 4A). As fibras colágenas estão orientadas em camadas transversais e longitudinais (Fig. 6A), sendo estas intercaladas. Além disso, em intervalos recorrentes, fibras colágenas verticais se estendem desde a região mais profunda da derme compacta até a derme esponjosa (Fig. 6B e C). Sob polarização, estas foram identificadas como fibras colágenas do tipo I e III, com predomínio de fibras do tipo I (Fig. 4D). Abaixo da derme compacta há vasos sanguíneos, nervos. No tronco ventral das duas espécies, abaixo da derme compacta há uma camada de iridóforos (Fig. 5C).

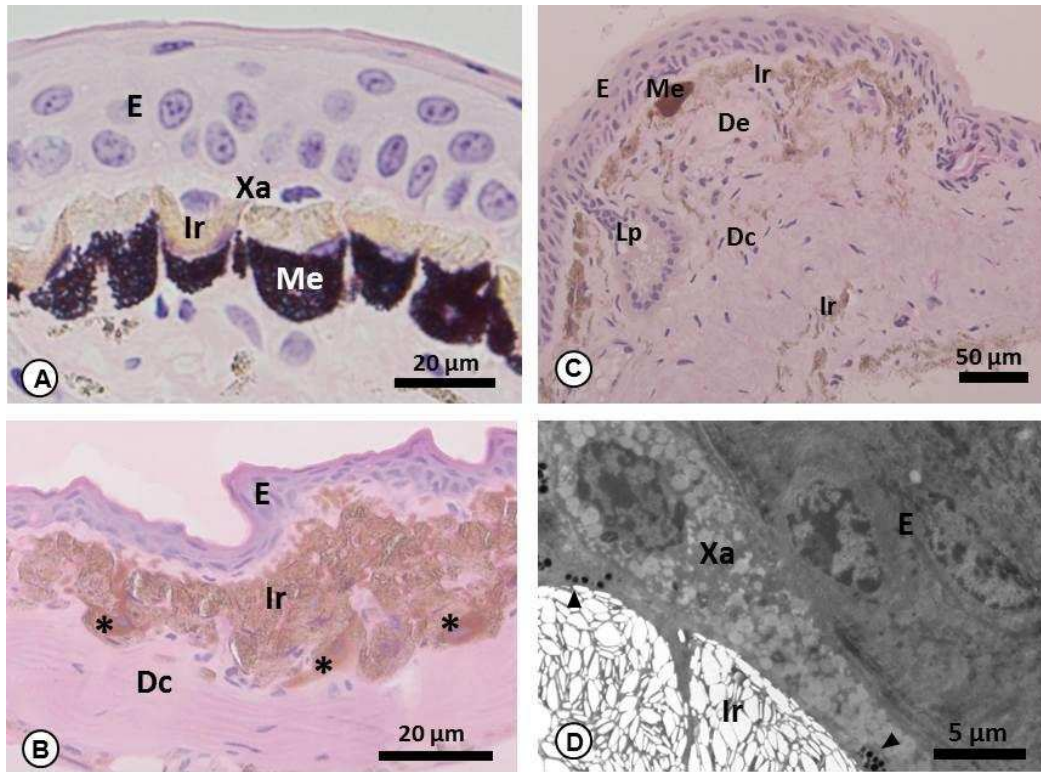


Figura 5: **A-** Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E) e unidades cromatóforas formadas por xantóforos (Xa), iridóforos (Ir) e melanóforos (Me). Coloração: HE. **B-** Secção transversal da epiderme de *H. semilineatus* mostrando a epiderme, iridóforos (Ir), melanóforos (*) e derme compacta (Dc). Coloração: HE. **C-** Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme, iridóforos (Ir), melanóforos (Me), derme esponjosa (De) e compacta (Dc), além de glândulas lipídicas (Lp). Coloração: HE. **D-** Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri* (MET) mostrando a epiderme (E) e uma unidade cromatófora formada por xantóforos (Xa), iridóforos (Ir) e grânulos dos melanóforos (cabeça de seta) entremendo as duas células subjacentes.

As duas espécies não apresentaram a camada Eberth-Katschenko (E-K), quando analisadas em microscopia de luz sob corantes histológicos e histoquímicos. Os resultados obtidos pela técnica de EDS confirmou este achado, ao mostrar a distribuição homogênea de elementos químicos no tegumento. Apenas foi verificada a acumulação de fósforo no núcleo de células (Fig. 7).

3.3.3 Histomorfometria do tegumento de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*

Os resultados histomorfométricos mostraram que o tegumento do tronco ventral das duas espécies possui maior espessura de epiderme que as demais regiões. Em *H. semilineatus*, na região da cabeça a média foi menor para este parâmetro. Ainda nas duas espécies, a espessura da derme esponjosa no tronco ventral foi maior que as médias observadas para o tronco dorsal e cabeça. Em *P. burmeisteri*, a derme compacta apresentou maior espessura na região da cabeça, seguida das médias para o tronco ventral e dorsal, enquanto que em *H. semilineatus* os valores obtidos para as espessuras da cabeça e tronco dorsal foram semelhantes entre si e menores do que o valor observado para o tronco ventral.

A comparação dos resultados histomorfométricos entre as espécies, nas três regiões corporais (Tab. 1) mostrou que *P. burmeisteri* possui as maiores médias para a espessura dos três componentes tegumentares ($P < 0,05$).

3.3.4 Histologia, histoquímica e histomorfometria das glândulas tegumentares de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*

Com relação às glândulas tegumentares, foi observado em *P. burmeisteri* quatro tipos de glândulas e em *H. semilineatus* dois tipos, sendo que estas se fizeram presentes nas três regiões corporais avaliadas. Uma vez que as glândulas

granulares possuem características histológicas diferentes quanto ao seu conteúdo, estas foram descritas separadamente e denominadas glândulas granulares A e B.

Tabela 1: Espessura média da epiderme, derme esponjosa e derme compacta em *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, considerando três regiões corporais.

	Epiderme (μm)	Derme esponjosa (μm)	Derme compacta (μm)
CABEÇA			
<i>P. burmeisteri</i>	38,46 \pm 10,59 ^a	96,51 \pm 25,62a	198,58 \pm 39,90 ^a
<i>H. semilineatus</i>	19,77 \pm 5,85b	41,08 \pm 15,67b	78,59 \pm 18,14b
TRONCO DORSAL			
<i>P. burmeisteri</i>	38,61 \pm 10,61 ^a	111,26 \pm 32,09a	142,37 \pm 38,89 ^a
<i>H. semilineatus</i>	22,35 \pm 5,68b	48,54 \pm 17,33b	79,71 \pm 26,73b
TRONCO VENTRAL			
<i>P. burmeisteri</i>	51,47 \pm 15,57 ^a	137,67 \pm 39,74a	171,02 \pm 43,37 ^a
<i>H. semilineatus</i>	26,62 \pm 8,67b	62,32 \pm 20,78b	113,45 \pm 27,95b

Média \pm desvio-padrão; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey, considerando a região corporal.

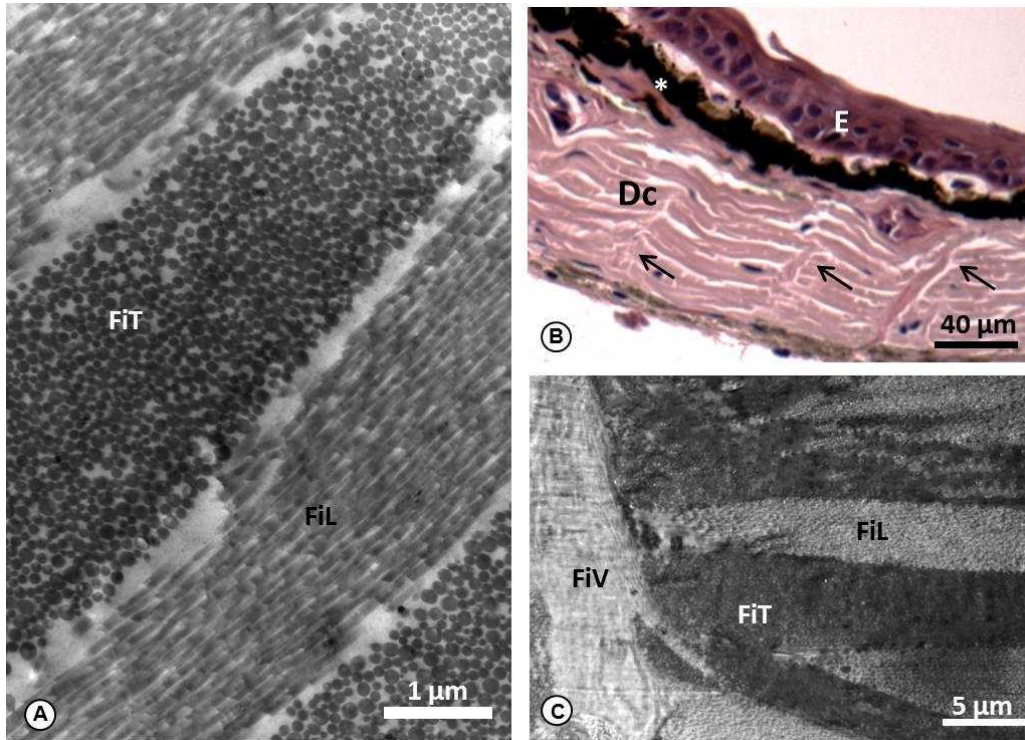


Figura 6: A- Secção transversal da epiderme de *H. semilineatus* mostrando as fibras colágenas em corte transversal (FiT) e longitudinal (FiL; MET). B- Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), cromatóforos (*), derme compacta (Dc) e fibras colágenas verticais (seta). Coloração: HE. C- Secção transversal da epiderme de *P. burmeisteri* mostrando fibras colágenas em corte transversal (FiT), longitudinal (FiL) e verticais (FiV; MET).

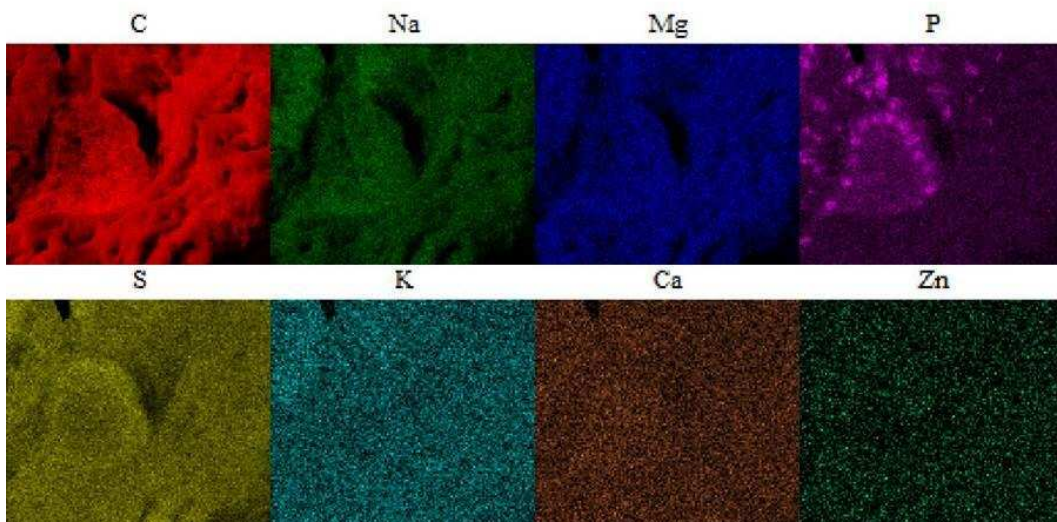


Figura 7: Mapa da distribuição dos elementos químicos obtida por EDS. Cada figura está indicando um elemento químico definido na porção superior das mesmas.

Nas duas espécies foram observadas glândulas seromucosas e granulares do tipo A. Histologicamente, nas seromucosas a porção secretora é formada por células cúbicas com núcleo basal a oval, lúmen amplo e sem secreção no seu interior. Algumas células se apresentaram basófilas outras acidófilas, ao serem coradas por HE (Fig. 8A). Já nas glândulas granulares A, a porção secretora é sincicial, com núcleos basais alongados e citoplasma basal com uma fina faixa basofílica, sendo o restante acidófilo, com grânulos pequenos, esféricos, densos e bem delimitados (Fig. 8B).

Em *P. burmeisteri* observou-se mais dois tipos de glândulas, identificadas como granulares B e lipídicas. As glândulas granulares B apresentaram características histológicas semelhantes às granulares A, com exceção da morfologia dos grânulos, que são grandes, arredondados e heterogêneos quanto à forma e a coloração (Fig. 8C). Já nas glândulas lipídicas o citoplasma basal é eosinofílico, os núcleos arredondados e grandes gotículas lipídicas foram visualizadas no citoplasma sincicial (Fig. 8D). Ao redor de todas as glândulas, observou-se um mioepitélio formado por células alongadas e achatadas com núcleos alongados (Fig. 8A - C).

Comparando-se a quantidade de cada glândula nas regiões corporais de cada espécie, percebe-se que as glândulas seromucosas foram as mais numerosas nas duas espécies e nas três regiões, sendo o tronco ventral o local de maior ocorrência. Em *H. semilineatus*, as glândulas granulares A foram mais abundantes no tronco ventral, seguido da cabeça e do tronco dorsal. Já em *P. burmeisteri*, estas glândulas estavam em maior quantidade no tronco ventral, seguida pelo tronco dorsal e cabeça. As glândulas granulares B e lipídicas se apresentaram em

maior quantidade no tronco dorsal que nas regiões do tronco ventral e cabeça de *P. burmeisteri*.

Os resultados obtidos da comparação entre as espécies quanto à quantidade de glândulas nas três regiões corporais estão mostrados na tabela 2. O tegumento da cabeça e do tronco ventral não apresentou diferença entre as espécies quanto a quantidade de glândulas ($P > 0,05$). Entretanto, o tegumento do tronco dorsal de *H. semilineatus* apresentou mais glândulas seromucosas que *P. burmeisteri*, ocorrendo o inverso para as glândulas granulares A ($P < 0,05$).

Com relação ao tamanho, os resultados mostraram que as glândulas granulares A e B são maiores que as glândulas lipídicas e seromucosas em *P. burmeisteri*. As glândulas granulares A são maiores na região do tronco dorsal, enquanto que as glândulas granulares B são maiores no tronco ventral. As glândulas granulares A de *H. semilineatus* são mais altas e mais largas do que as glândulas seromucosas, sendo os tamanhos das mesmas semelhantes nas três regiões. Comparando-se as espécies, glândulas granulares e seromucosas do tegumento de *P. burmeisteri* foram maiores em tamanho que as glândulas de *H. semilineatus* (Tab. 3).

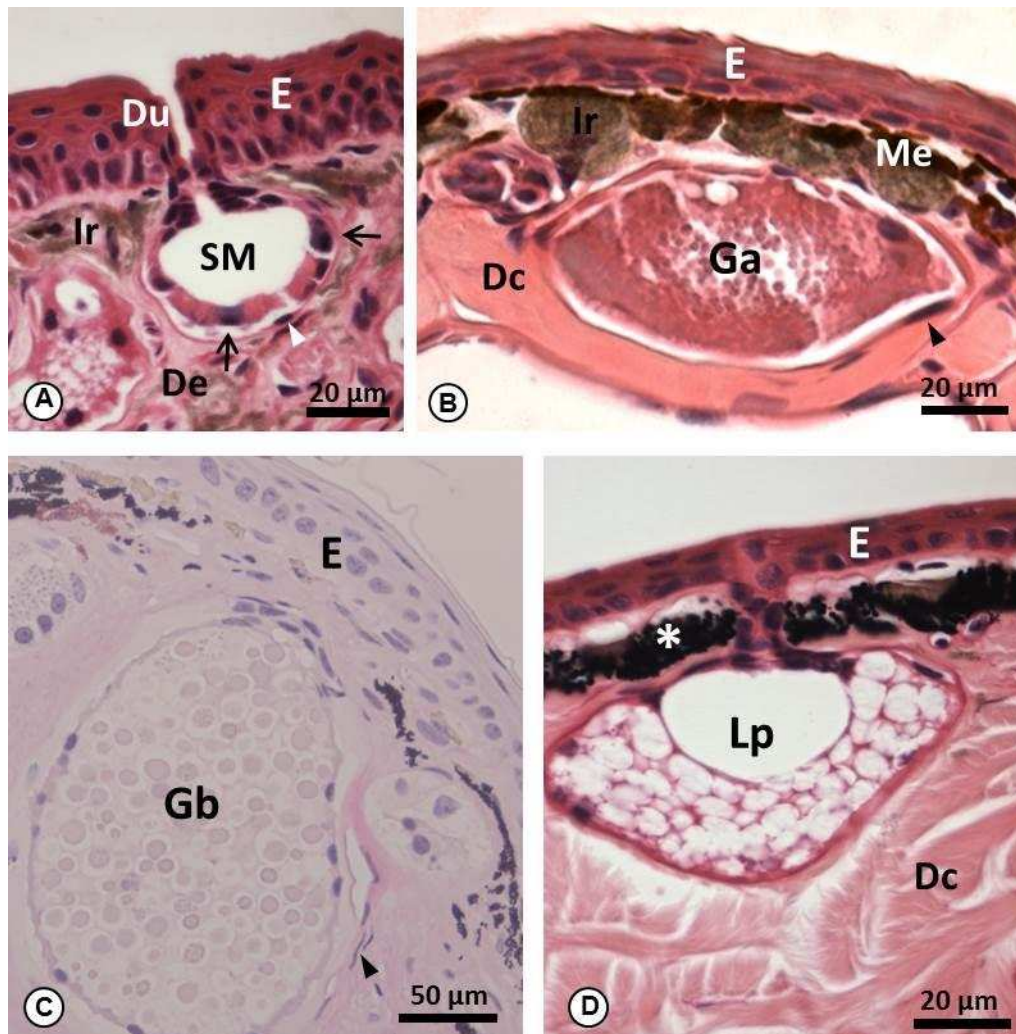


Figura 8: **A-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), iridóforos (Ir), derme esponjosa (De), glândulas seromucosas (SM) com células basófilas (setas), células mioepiteliais (cabeça de seta) e ducto (Du) Coloração: HE. **B-** Secção transversal do tegumento de *H. semilineatus* mostrando a epiderme (E), iridóforos (Ir), melanóforos (Me), derme compacta (Dc), glândula granular A (Ga) e células mioepiteliais (cabeça de seta). Coloração: HE. **C-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), glândula granular B (Gb) e células mioepiteliais (cabeça de seta). Coloração: HE. **D-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), cromatóforos (*), derme compacta (Dc), glândula lipídica (Lp). Coloração: HE.

Tabela 2: Quantidade de glândulas seromucosas, granulares A e B e lipídicas no tegumento de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, considerando três regiões corporais por 0,1mm².

	Seromucosa	Granular A	Granular B	Lipídica
CABEÇA				
<i>P. burmeisteri</i>	1,37 ± 0,89a	0,15 ± 0,36a	0,17 ± 0,38	0,62 ± 0,66
<i>H. semilineatus</i>	1,25 ± 0,92a	0,20 ± 0,40a	-	-
TRONCO DORSAL				
<i>P. burmeisteri</i>	1,00 ± 0,84a	0,20 ± 0,40a	0,37 ± 0,74	0,95 ± 0,90
<i>H. semilineatus</i>	1,57 ± 1,19b	0,05 ± 0,22b	-	-
TRONCO VENTRAL				
<i>P. burmeisteri</i>	1,75 ± 1,25a	0,50 ± 0,55a	0,20 ± 0,40	0,85 ± 0,76
<i>H. semilineatus</i>	1,67 ± 1,30a	0,60 ± 0,92a	-	-

Média ± desvio-padrão; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente (P < 0,05) pelo teste de Tukey, considerando cada região separadamente.

A análise histoquímica não apresentou diferença entre as colorações feitas em resina e parafina. As glândulas se coram da mesma forma para as duas técnicas nas três regiões corporais de ambas as espécies. As glândulas seromucosas foram positivas para PAS (Fig. 9A), *alcian blue* pH 2,5 (Fig. 9B) e mercúrio de bromofenol (Fig. 9C). Nas células secretoras a marcação positiva estava localizada na porção apical.

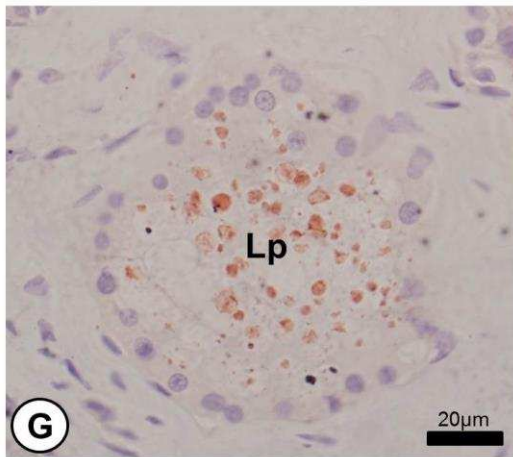
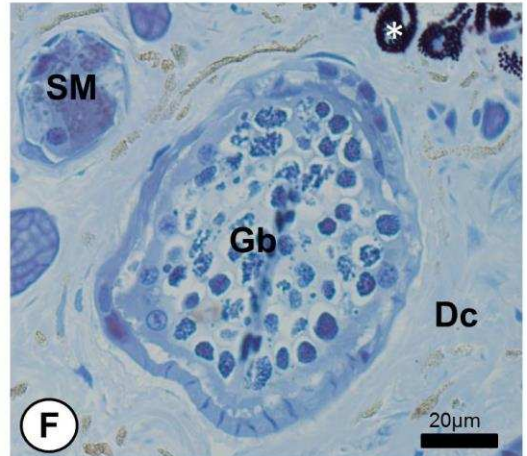
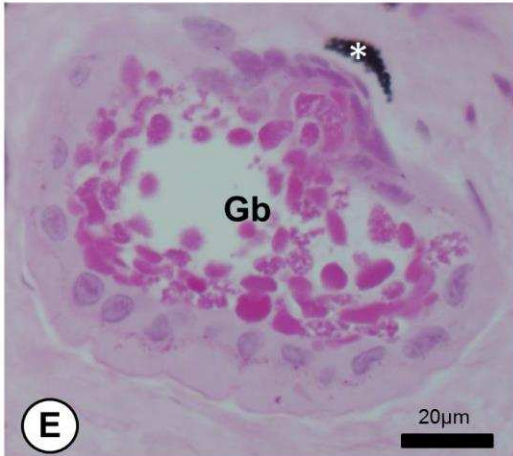
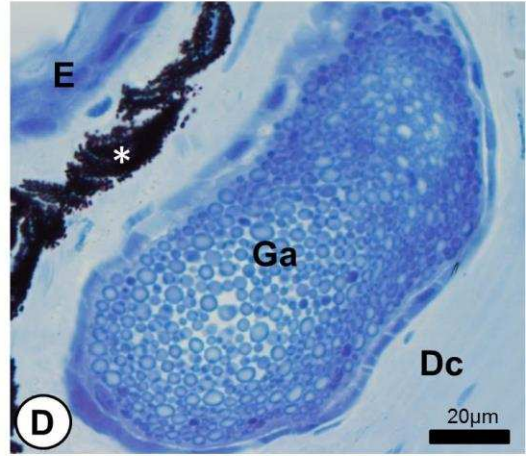
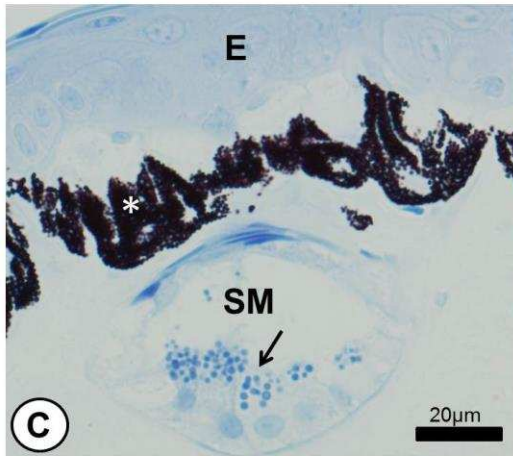
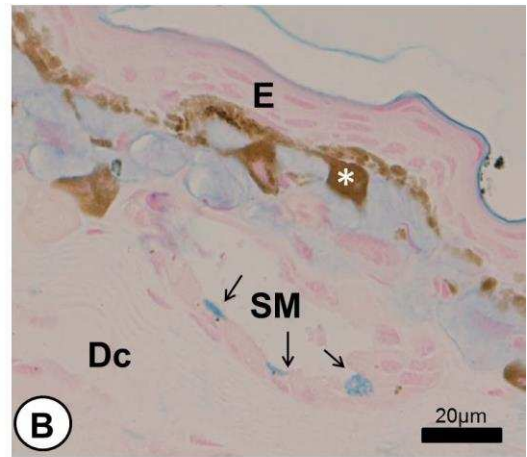
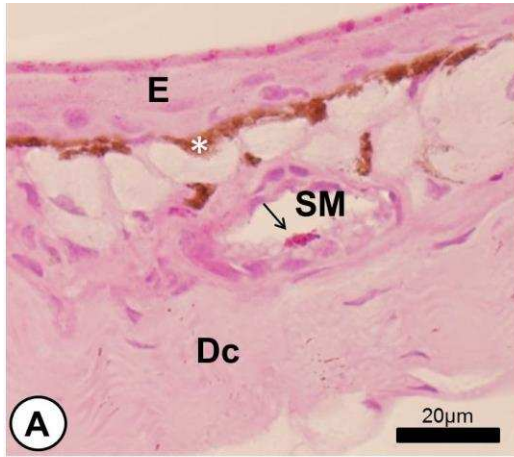
Nas duas espécies, glândulas granulares A marcaram-se positivamente pelo mercúrio de bromofenol nos grânulos presentes no sincício da porção secretora (Fig. 9D). Já nas glândulas granulares B, os grânulos citoplasmáticos foram positivos tanto para PAS (Fig. 9E) quanto para mercúrio de bromofenol (Fig. 9F). As glândulas lipídicas foram positivas para a coloração *oil red O* nas gotículas da porção sincicial da glândula (Fig. 9G).

Tabela 3: Valores médios da altura (μm) e largura (μm) das glândulas seromucosas, granulares A e B e lipídicas do tegumento de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, considerando três regiões corporais.

		Seromucosa	Granular A	Granular B	Lipídica
CABEÇA					
<i>P. burmeisteri</i>	ALTURA	51,22 \pm 12,34a	62,98 \pm 21,93a	89,81 \pm 45,27	58,11 \pm 16,86
<i>H. semilineatus</i>		27,02 \pm 6,68b	31,73 \pm 12,09b	-	-
<i>P. burmeisteri</i>	LARGURA	71,15 \pm 19,85a	94,424 \pm 49,18b	101,60 \pm 29,39	85,70 \pm 19,84
<i>H. semilineatus</i>		51,47 \pm 13,92b	72,20 \pm 14,71b	-	-
TRONCO DORSAL					
<i>P. burmeisteri</i>	ALTURA	54,32 \pm 14,14a	98,25 \pm 36,48a	89,12 \pm 24,16	62,44 \pm 13,17
<i>H. semilineatus</i>		36,64 \pm 15,11a	49,21 \pm 13,49a	-	-
<i>P. burmeisteri</i>	LARGURA	62,91 \pm 19,73a	132,60 \pm 32,03a	118,24 \pm 21,11	80,08 \pm 24,24
<i>H. semilineatus</i>		52,51 \pm 16,14b	57,58 \pm 31,26b	-	-
TRONCO VENTRAL					
<i>P. burmeisteri</i>	ALTURA	55,26 \pm 14,57a	82,72 \pm 30,45a	100,14 \pm 15,27	77,14 \pm 26,56
<i>H. semilineatus</i>		39,02 \pm 14,46b	42,73 \pm 14,38b	-	-
<i>P. burmeisteri</i>	LARGURA	66,93 \pm 17,34a	111,44 \pm 49,70a	128,29 \pm 23,78	93,68 \pm 25,57
<i>H. semilineatus</i>		61,52 \pm 19,06a	61,30 \pm 16,05b	-	-

Média \pm desvio-padrão; ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey, considerando-se cada região e cada variável separadamente.

Figura 9: **A-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), derme compacta (Dc), glândulas seromucosa (SM), com células PAS positivas (seta) e cromatóforos (*). Coloração: PAS. **B-** Secção transversal do tegumento de *H. semilineatus* mostrando a epiderme (E), cromatóforos (*), derme compacta (Dc) e glândula seromucosa com células AB⁺ (seta). Coloração: alcian blue pH 2,5. **C-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), cromatóforos (*) e glândulas seromucosas com grânulos de proteínas em células MB⁺ (seta). Coloração: mercúrio de bromofenol. **D-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando a epiderme (E), cromatóforos (*) e glândulas granulares A com grânulos de proteínas. Coloração: mercúrio de bromofenol. **E-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando cromatóforos (*) e glândula granular B (Gb) com grânulos PAS⁺. Coloração: PAS. **F-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando cromatóforos (*), glândulas seromucosas e glândula granular B (Gb) com grânulos MB⁺ e derme compacta (Dc). Coloração: mercúrio de bromofenol. **G-** Secção transversal do tegumento de *P. burmeisteri* mostrando uma glândula lipídica (Lp). Coloração: Oil Red O.



3.4 Discussão

Os resultados mostraram que o tegumento de *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, apesar de possuir a mesma estrutura básica, apresenta algumas peculiaridades entre as espécies e entre as regiões corporais estudadas. Essas características podem ser relacionadas ao comportamento e ao micro-habitat de cada espécie.

Das duas espécies, *P. burmeisteri* foi a única que apresentou glândulas lipídicas. O achado histoquímico para esta glândula foi semelhante ao descrito por Waburg *et al.* (2000), para a espécie *Litoria caerulea*, Nosi *et al.* (2002), para *P. hypochondrialis azurea*, e Barbeau e Lillywhite (2005), em *Hyla andersonii*, *P. hypochondrialis* e *Rana utricularia*. Sabe-se que a secreção lipídica cria um microambiente apolar que reduz a perda de água e sua evaporação na superfície do tegumento, protegendo-o contra a dessecação durante os períodos mais quentes do dia (Duellman e Trueb, 1994). Este fato é importante nesta espécie, ao considerar que ela apresenta hábitos noturnos e diurnos, quando geralmente é encontrada pendurada em galhos, em vegetação rasteira marginal, com altura superior a 1,5m e arbustiva marginal (Dayrell, 2007). Ao dia, elas são vistas em ambientes ensolarados e disposta na posição fetal. Essa posição fetal reduz a área de perda de água, contribuindo para evitar o dessecação (Wells, 2007).

Já *H. semilineatus*, de hábito noturno, são encontradas em vegetação emergente, rasteira marginal e arbustiva marginal, geralmente sobre folhagem úmida (Dayrell, 2007), o que revela serem mais dependentes de ambientes aquosos e com temperatura mais baixa.

Os resultados obtidos para as duas espécies mostram que no tronco ventral o tegumento é mais desenvolvido, ao apresentar grandes verrugas, estrias, maior

quantidade dos tipos glandulares e maior espessura das camadas tegumentares. A maior espessura epidérmica no tronco ventral sugere um papel protetor contra o atrito constante do ventre com o substrato. Já as estrias solucionam o problema de acúmulo e retenção de produtos de secreção em regiões onde há maior concentração de glândulas, ao distribuí-los ao longo da superfície tegumentar por capilaridade (Brito Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009). Vários trabalhos (Elias e Shapiro, 1957; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009) sugerem que as verrugas aumentam a área do tegumento, o que o torna capaz de alocar maior quantidade de glândulas (Duellman e Trueb, 1994). Este fato foi confirmado pelos nossos resultados que revelaram uma maior quantidade e tamanho das glândulas seromucosas presentes na espessa derme esponjosa desta região, em ambas as espécies.

Sabe-se que o tegumento do tronco ventral é altamente vascularizado e, conseqüentemente, funciona como um grande reservatório de água, principalmente na região pélvica (Duellman e Trueb, 1994; Wells, 2007). A alta concentração de glândulas seromucosas nessa região funciona como um mecanismo de atração de moléculas de água, já que o produto de sua secreção, glicoproteínas, polissacarídeos neutros e ácidos, são altamente hidrofílicos e facilitam o acúmulo, a entrada e o armazenamento de água. Essas moléculas formam uma cobertura aquosa na superfície, evitando o superaquecimento e a desidratação do animal e contribuem para a termorregulação e as trocas gasosas e iônicas (Els e Henneberg, 1990; Brito-Gitirana *et al.*, 2007). Além disso, Brito-Gitirana *et al.* (2007) sugerem que esse tipo de secreção contribua para a

sobrevivência dos anuros, ao diminuir o atrito e tornar o animal escorregadio, auxiliando na fuga quando estes são capturados por predadores.

A epiderme estratificada em todas as regiões e nas duas espécies, com estrato córneo nucleado, pouco queratinizado e úmido, confere ao tegumento proteção mecânica sem impedir que ocorram as trocas gasosas e iônicas (Duellman e Trueb, 1994). De acordo com Parakkal e Matoltsy (1964) e Lillywhite *et al.* (1997), as células PAS positivas, encontradas na epiderme, sintetizam, armazenam e secretam muco, auxiliando na proteção contra desidratação e na respiração cutânea. Os inúmeros desmossomos no estrato intermediário nos leva a afirmar que se trata de um típico estrato espinhoso, discordando de alguns autores que o tratam apenas como estrato intermediário (Parakkal e Matoltsy, 1964; Felseburgh *et al.*, 2007; Felseburgh *et al.*, 2009). A grande quantidade de desmossomos, observados sob MET, ajuda na distribuição da força de tensão, impedindo que as células se rompam (Junqueira e Carneiro, 2008). As células em forma de moringa (*Flask Cells*) e as células de Merkel foram encontradas no estrato intermediário, diferente do descrito por Duellman e Trueb (1994), que descreveram a localização dessas células no estrato basal. As células de Merkel são mecanoreceptoras e podem assessorar no reconhecimento do ambiente (Junqueira e Carneiro, 2008). Já as células em forma de moringa estão relacionadas ao transporte de íons, sendo importantes na osmorregulação (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005).

Apesar das glândulas granulares A terem sido encontradas em maior quantidade na região ventral, seu maior tamanho foi visto na porção dorsal. Este resultado também foi observado para as glândulas granulares B e lipídicas em *P. burmeisteri*. A secreção proteica, identificada na glândula granular A,

provavelmente está mais relacionada com a defesa química do que propriamente com características do habitat, ao considerar que as duas espécies em questão apresentaram este tipo glandular. Glândulas produtoras de toxinas em um tegumento úmido é uma característica sinapomórfica de anfíbios (Duellman e Trueb, 1994), podendo variar quanto ao conteúdo e grau de toxicidade (Tempone *et al.*, 2007). Aminas biogênicas, alcaloides, cardiotoxinas, neurotoxinas, alucinógenos e anestésicos têm sido identificados nos anuros, sendo relacionados ao comportamento inter e intra-específico e à defesa contra microrganismos patogênicos, por isso, têm sido alvo de empresas farmacêuticas que os utilizam no tratamento de doenças causadas por bactérias e protozoários (Duellman e Trueb, 1994; Daly, 1995; Toledo e Jared, 1995; Clarke, 1997; Conlon, 2011; Fernandes-Pedrosa, 2013).

Nossos resultados mostram que as glândulas granulares B são capazes de produzir glicoproteínas, provavelmente envolvidas na defesa química como as glândulas granulares A. Este resultado foi diferente do observado por Felseburgh *et al.* (2007) que, ao avaliarem glândulas granulares de *Odontophrynus americanus*, com morfologia semelhante à das glândulas granulares B de *P. burmeisteri*, verificaram que o sincício produz apenas substâncias proteicas. A heterogeneidade visualizada neste trabalho para esta glândula, tanto para a forma quanto para a coloração do grânulo, provavelmente se deve aos diferentes estágios de maturação dos mesmos ou à heterogeneidade da secreção, como descrito em *Scinax nasica* (Terreni *et al.*, 2003) e *Hyla regilla* (Delfino *et al.*, 2006).

A camada E-K, ausente em ambas as espécies, permite longos períodos de exposição ao ambiente sem riscos de dessecação (Jared *et al.*, 2009).

Possivelmente, a ausência desta camada está sendo suprida, por unidades cromatóforas altamente complexas, derme esponjosa capaz de atuar como reservatório de água e diferentes tipos de glândulas exócrinas.

As células cromatóforas formam uma barreira de proteção térmica, refletindo a radiação solar, controlando a dessecação e a temperatura desses animais (Duellman e Trueb, 1994). A termorregulação está envolvida tanto na determinação da temperatura corporal ótima, para que as vias metabólicas atuem eficientemente, quanto na definição da taxa de evaporação da água, uma vez que quanto maior a temperatura corporal maior a taxa de dessecação (Wells, 2007). Este fato explica as diferentes organizações das unidades cromatóforas observadas no dorso e ventre das duas espécies. Locais mais expostos à radiação, como o dorso, apresentaram células cromatóforas formando camadas contínuas. Áreas onde a exposição à radiação é menor, como o tronco ventral, essas unidades estão mais espaçadas ou em menor quantidade. Segundo Lillywhite *et al.* (1997), animais xéricos tendem a aumentar o número de camadas de células cromatóforas, o que reduz a evaporação de água (Duellman e Trueb, 1994). Em *H. semilineatus*, observou-se a ausência de xantóforos, assim como em *Polypedates maculatus* (Lillywhite *et al.*, 1997). Nós supomos que a ausência dos xantóforos seja suprida pelas várias camadas de iridóforos encontradas nesta espécie.

Outro importante papel das unidades cromatóforas é a manifestação da cor do tegumento desses animais, que além de estar envolvida no comportamento social e sexual, também está relacionada ao balanço hídrico e termorregulação. Como os cromatóforos são sensíveis a mudanças luminosas e temperatura, cores mais claras para períodos diurnos podem retardar o aquecimento e reduzir a perda de água (Duellman e Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2003, 2008). Mudanças de

coloração foram observadas em campo, durante os períodos de coleta, para *P. burmeisteri* e *H. semilineatus*, cujas colorações mostraram-se mais claras durante o dia e escuras à noite.

As análises morfológicas mostraram que as dermes esponjosa e compacta são formadas basicamente por fibras colágenas. A organização destas fibras e a presença de grande quantidade de substância fundamental amorfa faz com que a derme esponjosa sirva como reservatório de água, enquanto que a derme compacta estaria envolvida na resistência a tensão e sustentação (Azevedo *et al.*, 2006; Junqueira e Carneiro, 2008). A marcação *alcian blue* positiva na derme esponjosa, corresponde à presença de mucopolissacarídeos, observada principalmente no tronco ventral das duas espécies, além disso, Azevedo *et al.* (2007) constataram a presença de ácido hialurônico apenas na derme esponjosa de *Bufo ictericus* confirmando que esta funcionaria como reservatório de água.

Já na derme compacta, a grande concentração de fibras colágenas do tipo I conferem resistência e sustentação ao tegumento, considerando que estas se mostraram arrançadas em diferentes direções: longitudinais, transversais e verticais (Duellman e Trueb, 1994; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Junqueira e Carneiro, 2008). Os feixes de fibras colágenas verticais, provavelmente auxiliam na sustentação desta rede, funcionando como apoio, além de servirem como guia de migração para as células, como descrito por Greeven *et al.* (1995) em *Xenopus Laevis*. Estas células migratórias podem ser mastócitos que, no presente trabalho, foram observados nas dermes.

Portanto, as diferenças na morfologia do tegumento podem justificar sua influência sobre o comportamento e a escolha do habitat e micro-habitat de cada espécie. Essas diferenças incluem mensurações dos componentes do tegumento

entre as regiões corporais e o tipo de arranjo das unidades cromatóforas no dorso e ventre. Além disso, a presença de diferentes tipos de glândulas e, conseqüentemente, a composição de substâncias por elas secretadas permitem o estabelecimento de mecanismos de proteção mecânica e química importantes para a sobrevivência destas espécies.

3.5 Referências

AMEY, A.P., GRIGG, G.C., 1995. Lipid-reduced evaporative water loss in two arboreal hylid frogs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111, 283-291.

AMPHIBIAWEB, 2013. Search the database. <http://amphibiaweb.org/index.html>. Acessado em 10 de outubro de 2013.

AZEVEDO, A.A., SANTANA, A.S.J., BRITO-GIRITANA, L., 2006. Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. *Micron* 37, 223-228.

AZEVEDO, R.A., CARVALHO, H.F., BRITO-GITIRANA, L., 2007. Hyaluron in the epidermal and dermal extracellular matrix: Its role cutaneous hydric balance and integrity of anuran integument. *Micron* 38, 607-610.

AZEVEDO, R.A., PELLI, A.A., PEREIRA, A.F., SANTANA, A.S.J., FELSEMBURGH, F., BRITO GITIRANA, L., 2005. Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical

- characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Amphibian, Bufonidae). *Micron* 36, 61-65
- BANCROFT, J.D., COOK, H.C., 1994. Manual of Histological techniques and their diagnostic application. Churchill Livingstone, New York.
- BANCROFT, J.D., STEVENS, A., 1996. Theory and practice of histological techniques. 4ed, Churchill livingstone, New York.
- BARBEAU, T.R., LILLYWHITE, H.B., 2005. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *The Journal of Experimental Biology* 208, 2147-2156.
- BRITO-GITIRANA, L., AZEVEDO, R.A., 2005. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). *Micron* 36, 532-538.
- BRITO-GITIRANA, L.; AZEVEDO, R.A.; PELLI, A.A., 2007. Expression pattern of glycoconjugates in the integument of *Bufo ictericus* (Anuran, Bufonidae): Biochemical and histochemical (lectin) profiles. *Tissue and Cell*: 39: 415-421.
- BRIZZI, R., DELFINO, G., PELLEGRINI, R., 2002. Specialized mucous glands and their possible adaptative role in the males of some species of *Rana* (amphibia, Anura). *Journal of Morphology* 254, 328-341.
- CFMV, 2013. Métodos de Eutanásia em Animais. http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf. Acessado em 09 de outubro de 2013.

- CLARKE, B.T., 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biology Review* 72, 365-379.
- CONLON, J.M., 2011. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Research* 343, 201-212.
- DALY, J.W., 1995. The Chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9-13.
- DAYRELL, J.S., 2007. Distribuição Sazonal e espacial de anfíbios anuros no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa*.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., ALVAREZ, B.B., GENTILI, M., 1999. Granular cutaneous glands in the frog *Physalemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): comparasion between ordinary serous and 'inguinal' glands. *Tissue and Cell* 31, 576-586.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., KRACKE-BERNDORFF, R., ALVAREZ, B., 1998. Serous gland dimorphism in the skin of *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). *Journal of Morphology* 237, 19-32.
- DELFINO, G., DREWES, R.C., MAGHERINI, S., MALENTACCHI, C., NOSI, D., TERRENI, A., 2006. Serous cutaneous glands of the pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura, Hylidae): patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. *Tissue and Cell* 38, 65-77.

- DORNELLES, M.F., MARQUES, M.G.B., RENNER, M.F., 2010. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. *Ciência em Movimento* 24, 103-117.
- DUELLMAN, W.R., TRUEB, L., 1994. Biology of amphibians. 2 ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- ELIAS, H., SHAPIRO, J., 1957. Histology of the skin of some toads and frogs. *American Museum of Natural History* 1819, 1-27.
- ELS, W.J., HENNEBERG, R., 1990. Histological features and histochemistry of the mucous glands in ventral skin of the frog (*Rana fuscigula*). *Histology and Histopathology* 5, 343-348.
- FELSEMBURGH, F.A., ALMEIDA, P.G., CARVALHO-E-SILVA, S.P., BRITO-GITIRANA, L., 2009. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron* 40, 198-205.
- FELSEMBURGH, F.A., CARVALHO-E-SILVA, S.P., BRITO-GIRITANA, L., 2007. Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron* 38, 439-445.
- FERNANDES-PEDROSA, M.F., FELIX-SILVA, J., MENEZES, Y.A.S., 2013. Toxins from Venomous Animals: Gene Cloning: An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical. Chapter 2: Toxins from Venomous Animals: Gene Cloning, Protein Expression and Biotechnological Applications. Creative Commons.

- GONÇALVES, V.F., BRITO-GITIRANA, L., 2008. Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *Micron* 39, 32-39.
- GREEVEN, H., ZANGER, K., SCHWINGER, G., 1995. Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura: Amphibia). *Journal of Morphology* 224, 15-22.
- HILDEBRAND, M., GOSLOW, G., 2004. Análise da estrutura dos vertebrados. 2.ed. Atheneu, São Paulo.
- IUCN, 2013. Espécies de anfíbios ameaçados de extinção. Disponível em http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2010_4RL_Stats_Table_1.pdf. Acessado em 12 de setembro de 2013.
- JARED, C., ANTONIAZZI, M.M., JORDÃO, A.E.C., SILVA, J.R.M.C., GREVEN, H., RODRIGUES M.T., 2009. Paratoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. *Toxicon* 54, 197-207.
- JUNQUEIRA L.C.U., BIGNOLAS, G., BRENTANI R.R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *The Histochemical Journal* 11, 447-455.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J., 2008. Histologia Básica. 10ed. Guanabara Koogan, São Paulo.
- KARVOVSKY, M.J., 1965. A formaldehydo-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27, 137A.

- LILLYWHITE, H.B., MITTAL, A.K., GARG, T.K., AGRAWAL, N., 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behavior in the common Indian tree frog, *Polypedates maculates*. *Journal of zoology, London* 243, 675-687.
- MANGIONE, S., GARCIA, G., CARDOZO, O.M., 2011. The Eberth-Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). *Acta Zoologica* 92, 21-26.
- NOSI, D., TERRENI, A., ALVAREZ, B.B., DELFINO, G., 2002. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hipocondrialis* azurea (Anura, Hylidae): response by different gland types to norepinephrine stimulation. *Zoomorphology* 121, 139-148.
- PARAKKAL, P.F., MATOLTSY, A.G., 1964. A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens*. *The Journal of Cell Biology* 20, 85-94.
- PEARSE, A.G.E., 1968. Histochemistry theoretical and applied. 2ed William and Wilkins, Baltimore.
- PELLI, A.D., CINELLI, L.P., MOURÃO, A.D.S., BRITO-GITIRANA, L., 2010. Glycosaminoglycans and glycoconjugates in the adult anuran integument (*Lithobates catesbeianus*). *Micron* 41, 660-665.
- POUGH, F. H., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITSKY, A.H., WELLS, K.D., 2004. Herpetology. 3ed. Person Prentice Hall, Saddle River.
- POUGH, F. H., JANIS, C.M., HEISER, J.B., 2008. A vida dos Vertebrados. 4ed. Atheneu. São Paulo.

- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 20, 85-94.
- RIGOLO, J.R., ALMEIDA, J.A., ANANIAS, F., 2008. Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus* aff. *venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae). *Micron* 39, 56-60.
- SAHIN, M., GUMUS, A., BALCAN, E., 2008. Glycoconjugate histochemistry of mucous glands in the skin of metamorphosing *Bufo viridis*. *Biologia* 63, 444-449.
- SBH, 2013. Espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/checklist_brasil.asp. Acessado em 16 de outubro de 2013.
- SCHUMACHER, U., ADAM, E., HAUSER, F., PROBST, J.C., HOFFMANN, W., 1994. Molecular anatomy of a skin gland: histochemical and biochemical investigations on the mucous glands of *Xenopus Laevis*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42, 57-65.
- SOUZA, W., 2007. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro.
- SPURR, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26, 31-43.
- TEMPONE, A.G., MELHEM, M.S.C., PRADO, F.O., MOTOIEL, G., HIRAMOTO, R.M., ANTONIAZZI, M.M., HADDAD, C.F.B., JARED, C., 2007. Amphibian secretions for drug discovery studies: A search for new

- antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design and Discovery* 4, 67-73.
- TERRENI, A., NOSI, D., GREEVEN, H., DELFINO, G., 2003. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation comparison with larval glands in specimens of other families. *Tissue and Cell* 35, 274-287.
- TOLEDO, R.C., JARED, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A, 1 - 29.
- TOLOSA, E.M.C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O.A., NETO, A.G.F., 2003. Manual de Técnicas para histologia normal e patológica. Manole, Rio de Janeiro.
- WARBURG, M.R., ROSENBERG, M., ROBERTS, J.R., HEATWOLE, H., 2000. Cutaneous glands in the Australian hylid *Litoria caerulea* (Amphibia, Hylidae). *Anatomy and Embryology* 201, 341-348.
- WELLS, K.D., 2007. The Ecology and behavior of amphibians. 1ed The university of Chicago Press, Chicago and London.

4. Capítulo II

Morfologia do tegumento de duas espécies do gênero *Dendropsophus* viventes na Mata Atlântica

4.1 Introdução

A taxonomia de anfíbios tem sido alvo de muitas discussões entre os pesquisadores, principalmente quando se confronta a taxonomia tradicional, baseada em análises morfológicas, e a taxonomia moderna, que considera achados moleculares (Faivovich *et al.*, 2005; Rossa-Feres e Nomura, 2005; Prado e Pombal-Jr, 2008; Faivovich *et al.*, 2010). Diferentes aspectos morfológicos (Mercês e Juncá, 2010), osteológicos (Prado e Pombal-Jr, 2008) e comportamentais (Silva e Benmamam, 2008) têm sido considerados a fim de se obter um diagnóstico mais real da taxonomia do grupo.

Apesar de morfológicamente semelhante, o tegumento dos anfíbios apresenta um alto grau de plasticidade, podendo ser considerado espécie-específico. As variações podem ocorrer quanto às características morfológicas, como espessura de suas camadas, quantidade e distribuição de cromatóforos, tipo e distribuição de glândulas (Toledo e Jared, 1995; Lillywhite *et al.*, 1997; Delfino *et al.*, 1999; Delfino *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2006; Felseburgh *et al.*, 2007; Melzer *et al.*, 2011; Prates *et al.*, 2012), bem como o produto de secreção (Daly *et al.*, 1995; Clarke, 1997; Vanhoye *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2007; Conceição *et al.*, 2009; Brand *et al.*, 2013).

A principal característica relacionada à diversidade do tegumento está ligada à morfologia de suas glândulas e ao produto de secreção, sendo as mais comuns as glândulas mucosas, responsáveis pela umidificação do tegumento (Dapson, 1969; Brito-Gitirana *et al.*, 2007; Rigolo *et al.*, 2008; Sahin *et al.*, 2008), e as glândulas granulares, responsáveis pela produção de substâncias tóxicas que protegem o animal contra predadores e patógenos (Delfino *et al.*, 2001; Nosi *et al.*, 2002; Terreni *et al.*, 2003; Gonçalves e Brito-Gitirana, 2008).

No entanto, outros aspectos morfológicos podem auxiliar na taxonomia de Anuros. Análises da superfície externa do tegumento revelam grandes diferenças entre as regiões dorsal e ventral do corpo. A presença de verrugas, tubérculos e espinhos foram descritas para várias espécies (Elias e Shapiro, 1957; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; 2009), sendo que apenas Elias e Shapiro (1957) descrevem a presença desta em membros da família Hylidae. A presença da camada de Eberth-Katschenko (E-K) tem sido documentada em algumas espécies (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Mangione *et al.*, 2011), não havendo relatos na literatura acerca da sua presença em hílídeos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever e comparar a morfologia do tegumento de duas espécies do mesmo gênero, *Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824) e *D. minutus* (Peters, 1872), avaliando possíveis características espécie-específicas.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Captura dos animais

Quatro exemplares machos de cada espécie, *Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824) e *D. minutus* (Peters, 1872), foram coletados por meio de procura ativa e visualização direta na lagoa da Mata da Biologia, localizada no *Campus* Viçosa da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa/MG (20°45'27,5"S e 42°51'38,7"W), durante os meses de setembro de 2012 a março de 2013, sob licença do IBAMA número 10504-1. Após a captura, os animais foram colocados em sacos plásticos contendo um pouco de água e ar e transportados vivos para o Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, onde permaneceram até o momento da eutanásia.

4.2.2 Biometria corporal, eutanásia e obtenção do tegumento

O comprimento rostro-cloacal e o peso dos animais foram avaliados utilizando-se paquímetro de metal e balança de precisão de 0,001g (Bel Engineering® 210A), respectivamente. Em seguida, os animais foram eutanasiados aplicando-se xilazina (10 mg/kg/IM) e quetamina (150 mg/kg/IM), para sedação e anestesia, e posterior decapitação, conforme as normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária - Resolução N° 1000 de 11 de maio de 2012 (CFMV, 2013) e sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV (processo 067/2012).

Amostras do tegumento de três regiões corporais, cabeça, tronco dorsal e tronco ventral, foram retiradas com auxílio de bisturi e tesoura. Após a dissecação, as amostras foram fixadas por imersão em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h, para análise em microscopia de luz, e em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (Souza, 2007), para a avaliação em microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X.

4.2.3 Avaliação do tegumento sob microscopia de luz

4.2.3.1 Processamento histológico

Todas as amostras do tegumento foram processadas histologicamente para inclusão em parafina e resina. Para o primeiro meio de inclusão, as amostras fixadas foram desidratadas em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e absoluto), com banhos de 1 h em cada concentração, sendo realizado três banhos no álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol, fazendo-se três passagens de 1 h em cada banho, e embebidas em parafina,

também em três banhos, por 1 h cada. As amostras do tegumento emblocadas em parafina foram levadas ao micrótomo (Leica, RM2155) para a obtenção de secções de 5 µm de espessura, utilizando-se navalhas de aço.

Já as amostras para inclusão em glicol metacrilato (Historesina, Leica®) foram desidratadas seguindo a mesma série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e absoluto), sendo que os banhos foram de 30 min em cada solução. Na sequência, o material passou por infiltração em historesina usada, por 24 h, e em historesina nova por 2 h, quando foi emblocado em resina com polimerizador. Foram obtidos cortes histológicos do tegumento com 3 µm de espessura em micrótomo (Leica, RM2155), utilizando navalhas de vidro.

Os cortes histológicos incluídos em parafina e resina foram montados entre lâmina e lamínula após as colorações, utilizando-se resina de montagem (Entellan®).

4.2.3.2 Colorações histológicas e histoquímicas

Todas as colorações utilizadas foram feitas em cortes histológicos incluídos em parafina e historesina. A exceção ocorreu no caso da técnica histoquímica para a detecção de lipídeos, cujo material foi fixado em paraformaldeído 4% tamponado e diretamente infiltrado, por 24 h, e emblocado em resina, sem desidratação prévia.

A descrição histológica do tegumento foi realizada utilizando-se as seguintes colorações: hematoxilina-eosina (HE), para avaliação da arquitetura do órgão e afinidade ácido-básica dos seus constituintes (Tolosa *et al.*, 2003) e azul de toluidina, para evidenciar a presença de células e estruturas metacromáticas (Tolosa *et al.*, 2003).

Já as avaliações histoquímicas foram feitas utilizando as técnicas de *periodic acid schiff* (PAS), que identifica polissacarídeos neutros e glicoproteínas (Bancroft e Cook, 1994), *alcian blue* pH 2,5, que marca polissacarídeos ácidos nas formas sulfatadas e carboxiladas (Pearse, 1968), mercúrio de bromofenol, que evidencia a presença de proteínas totais (Pearse, 1968), e *oil red O*, utilizado para marcar lipídeos (Bancroft e Stevens, 1996). Os protocolos utilizados para cada coloração estão descritos nos anexos I a VI.

4.2.3.3 Avaliação dos tipos de fibras colágenas em microscopia de polarização

Utilizou-se a coloração de *picrosirius red* (anexo VII) para caracterizar as fibras colágenas existentes no tegumento (Junqueira *et al.*, 1979). Após a coloração, as lâminas histológicas foram visualizadas em microscópio de luz (Olympus BX-53), equipado com lente polarizadora e filtro que permitem a visualização das fibras colágenas do tipo I em vermelho e III em amarelo-esverdeado.

4.2.3.4 Histomorfometria do tegumento

Análises morfométricas do tegumento foram feitas utilizando-se cortes histológicos incluídos em resina e corados em HE. Foram fotografados, aleatoriamente, 10 campos histológicos por região e por animal em fotomicroscópio (Olympus BX-53), pertencente ao Laboratório de Sistemática Molecular da UFV.

Utilizando-se o programa *Image ProPlus*, pertencente ao Laboratório de Biologia Vegetal da UFV, foram feitas as seguintes mensurações: espessura da epiderme, derme esponjosa e derme compacta.

4.2.3.5 Análise estatística

Os resultados histomorfométricos obtidos para as regiões corporais dentro da mesma espécie foram avaliados descritivamente, através da comparação entre as médias. Quando fez-se a comparação entre espécies para cada parâmetro analisado, em cada região, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância. Para isso, utilizou-se o programa Genes, pertencente à UFV. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

4.2.4 Avaliação do tegumento sob estereomicroscopia

Cinco exemplares de cada espécie provenientes da coleção herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen da UFV, *Campus* Viçosa, foram analisados quanto à morfologia da superfície tegumentar da cabeça, tronco dorsal e ventral. Estes animais foram fixados em formol 10% e mantidos em álcool 70%. As superfícies corporais foram visualizadas e fotografadas utilizando-se estereomicroscópio *Zeiss V20* e *software AxionVision*, pertencentes ao Laboratório de Ortopterologia da UFV.

4.2.5 Avaliação do tegumento em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras das três regiões tegumentares foram fixadas por 2 h em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 para análise da

sua superfície. Em seguida, as amostras foram lavadas (2x) em tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 2 h. Depois de novamente lavadas em tampão, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de álcool etílico, durante 15 min em cada concentração (70, 80, 90, 95 e 100%), e submetidas ao ponto crítico utilizando CO₂. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro e observadas ao microscópio de varredura LEO VP1430 do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

4.2.6 Avaliação do tegumento sob espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS)

A presença da camada E-K foi avaliada a partir da análise de distribuição de elementos químicos no tecido: carbono, sódio, magnésio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio e zinco. Para isto, amostras do tegumento das três regiões corporais foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, as amostras foram lavadas (2x) em tampão e embebidas em solução de glicerina 30% por 3 h, seguida por criofratura com nitrogênio líquido e desidratada em série alcoólica crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), durante 10 min em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao ponto crítico utilizando CO₂ e cobertas com carbono. O material processado foi fixado no suporte para visualização das camadas do tegumento. As análises por EDS foram feitas em microscópio eletrônico de varredura LEOVP 1430, com aumento de 800X e com 20Kv de tensão de voltagem, utilizando o *software Iridium Ultra*, pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

4.3 Resultados

A espécie *D. elegans* (Fig. 1A) apresentou peso corporal de $1,24 \text{ g} \pm 0,13$ e comprimento rostro-cloacal de $2,46 \text{ cm} \pm 0,20$, enquanto que *D. minutus* (Fig. 1D) pesou, em média, $2,82 \text{ g} \pm 0,63$ e mediu $2,04 \text{ cm} \pm 0,19$. As principais diferenças entre elas estão resumidas na tabela 2.

Superficialmente, sob MEV e estereomicroscopia, observou-se na epiderme de *D. elegans* algumas projeções na cabeça e no tronco dorsal semelhantes a verrugas, com ápice achatado (Fig. 1B). Em *D. minutus* apenas a epiderme se projeta, formando pequenas barreiras para a formação de poços em toda a extensão dorsal (Fig. 1E). Já na região ventral das duas espécies nota-se grandes verrugas (Fig. 1C e F). Em todas as regiões, tanto em *D. elegans* quanto *D. minutus*, as projeções foram separadas por estrias.

O tegumento desses anuros é constituído por epiderme, com epitélio estratificado pavimentoso formado pelo estrato córneo, mais superficial, com uma camada de células alongadas, achatadas e pouco queratinizadas, contendo núcleos acompanhando a forma da célula, pelo estrato espinhoso, formado por células menos achatadas que o estrato córneo e com núcleos centrais e ovalados, e pelo estrato germinativo, mais basal, com células cúbicas contendo núcleo central e oval (Fig. 2A). As duas espécies apresentaram poucas células em forma de moringa, cujo formato se mostrou alongado e com núcleo basal (Fig. 2B), e células de Merkel, ovais, com citoplasma claro e núcleo arredondado e central, nas regiões da cabeça e do tronco dorsal (Fig. 2C). Já no ventre, essas células se mostraram abundantes. Percebeu-se que a quantidade dessas células nesta região se mostrou maior em *D. minutus* que em *D. elegans*.

Abaixo da epiderme das duas espécies, observou-se a derme esponjosa formada por tecido conjuntivo frouxo contendo células cromatóforas, glândulas exócrinas envoltas por células mioepiteliais e vasos sanguíneos, sendo estes mais numerosos em *D. minutus*. Logo abaixo está a derme compacta, formada basicamente por fibroblastos e fibrócitos mergulhados em uma extensa matriz extracelular (Fig. 2D). Nesta, as fibras colágenas se posicionaram na horizontal, na maior parte da camada, intercaladas por fibras verticais (Fig. 2H). Em ambas as espécies e em todas as regiões, abaixo da derme compacta, observou-se alguns vasos sanguíneos e nervos. O corante *picrosirius red*, quando analisado sob polarização, evidenciou a presença de fibras colágenas do tipo I e III nas duas dermes, sendo que na derme compacta houve predomínio de fibras do tipo I (Fig. 2E).

Nas duas espécies, as células cromatóforas, xantóforos, iridóforos e melanóforos, não se arranjaram em unidades bem definidas. Elas estavam sozinhas, dispostas em faixas contínuas ou formando aglomerados celulares. Em geral, na cabeça e no tronco dorsal as células formavam uma faixa contínua de iridóforos com 2 a 3 camadas em *D. elegans* e uma camada em *D. minutus*, estas células apresentam-se arredondadas com núcleo redondo e central. Abaixo dos iridóforos observou-se melanóforos dispostos aleatoriamente, apresentando prolongamentos finos que se direcionam para os iridóforos formando uma camada logo abaixo da epiderme em *D. elegans* (Fig. 2F). Os melanóforos de *D. minutus* se apresentaram bem maiores que em *D. elegans* (Fig. 2G). Nessas espécies poucos xantóforos foram visualizados. No tronco ventral de ambas, os iridóforos foram encontrados abaixo da derme compacta e não foram observados melanóforos e xantóforos (Fig. 2H).

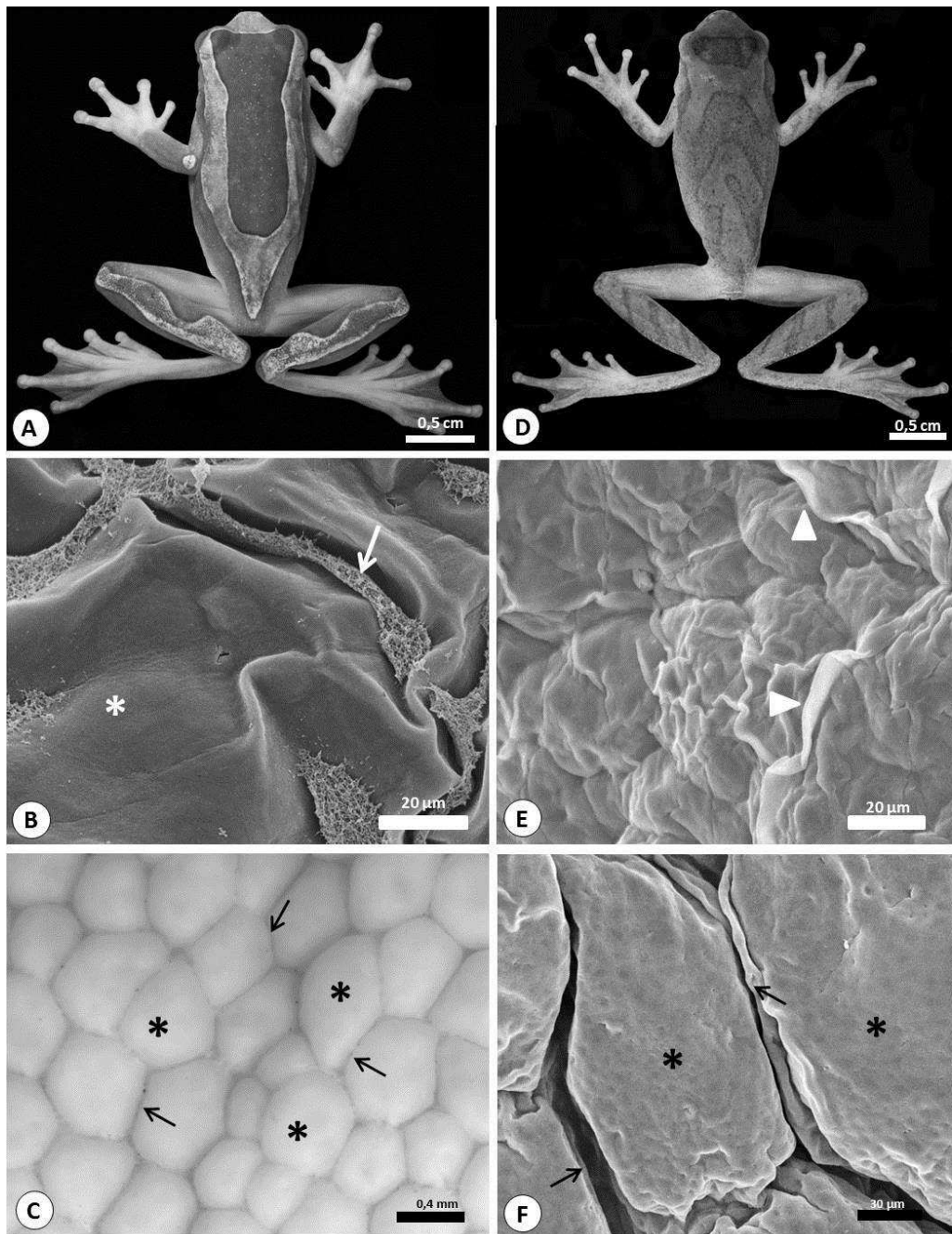
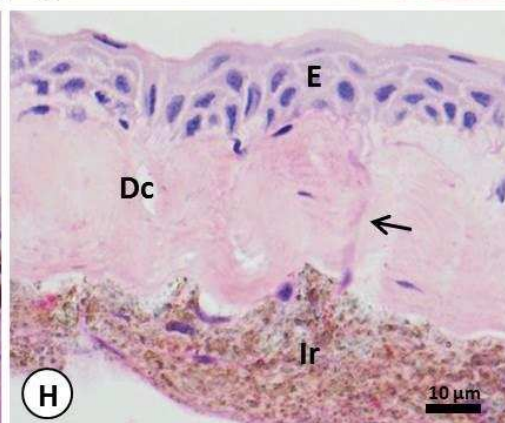
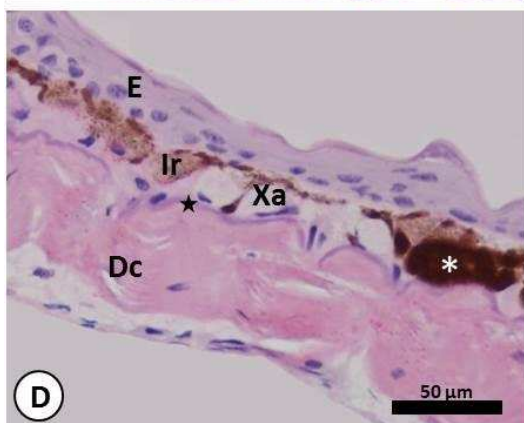
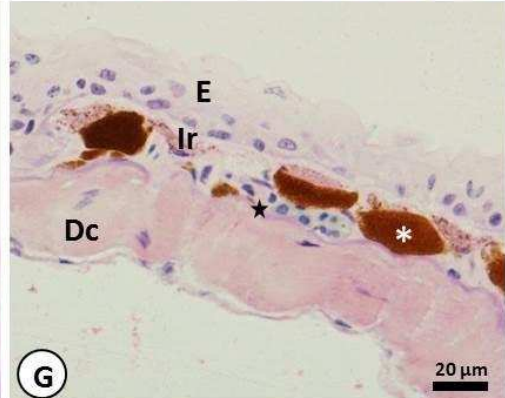
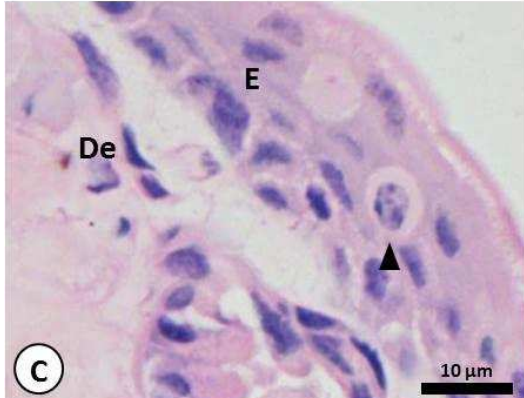
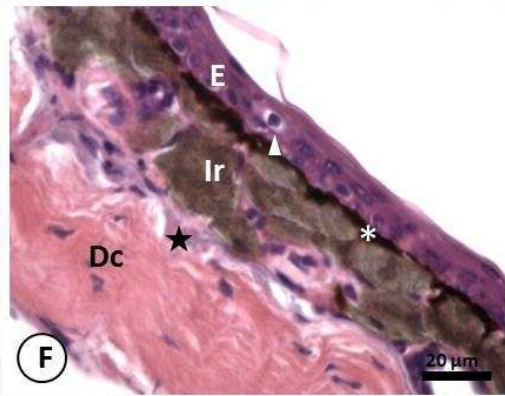
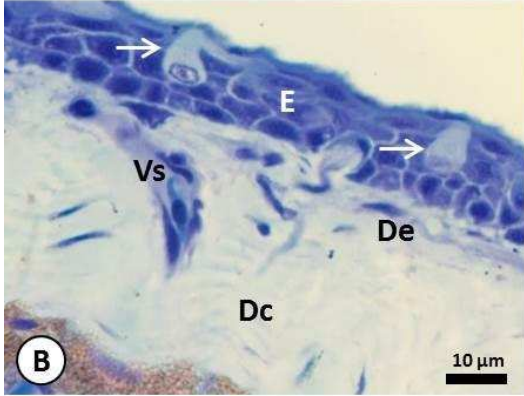
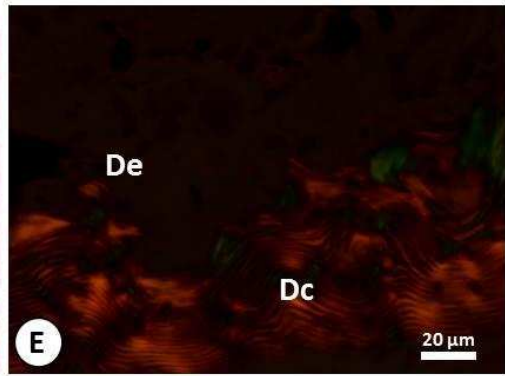
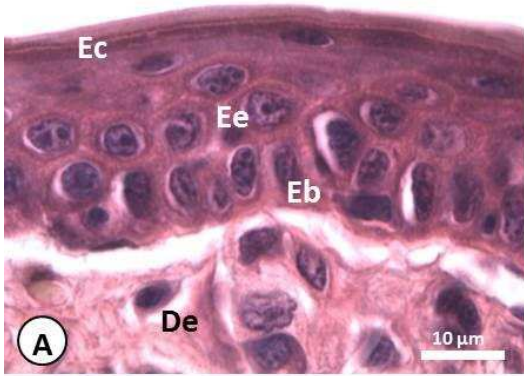


Figura 1: As figuras A-C correspondem à espécie *D. elegans* e as figuras D-F correspondem à espécie *D. minutus*. A e D- Fotografia de um exemplar macho de *D. elegans* e *D. minutus*, respectivamente. A Figura C é uma imagem obtida em estereomicroscopia, já B, E e F são micrografias Sob MEV. As imagens mostram: B e E - Região da tronco dorsal evidenciando a presença de verrugas (*), estrias (setas) e elevações epidérmicas (cabeça de seta); C e F- Região do tronco ventral mostrando verrugas (*) e estrias (setas). As fotografias A e D foram feitas por José Lino Neto.

Entre a derme esponjosa e a derme compacta há uma camada basófila (Fig. 3A) e metacromática (Fig. 3B), conhecida como camada Eberth-Katschenko (E-K), visualizada apenas na cabeça e no tronco dorsal de ambas as espécies. Em *D. minutus* esta camada se mostrou mais espessa. Através das análises por EDS foi possível identificar cálcio (Fig. 3E), fósforo (Fig. 3F) e sódio (Fig. 3G) em maiores concentrações e zinco (Fig. 3H) e potássio (Fig. 3I) em menores, formando esta camada. Em *D. minutus* foram observadas células envolvidas pela camada E-K, apresentando núcleos minúsculos e citoplasma claro (Fig. 3A). Em *D. elegans* essas células raramente foram observadas. A análise histoquímica da camada E-K mostrou uma leve alcianofilia, quando corada por *Alcian Blue* pH 2,5, nas regiões em que esteve presente (Fig. 3C).

Com relação às glândulas exócrinas, as duas espécies apresentaram, nas três regiões tegumentares, glândulas seromucosas e glândulas granulares do tipo A. Apenas a espécie *D. elegans* apresentou glândulas granulares do tipo B. As glândulas seromucosas são formadas por uma camada de células cúbicas, basófilas ou acidófilas, com núcleo basal e oval compondo a porção secretora, (Fig. 4A), além de lúmen amplo. Já as glândulas granulares A e B apresentaram células com núcleo basal e alongado, citoplasma basal com uma fina faixa basófila e porção secretora sincicial. Neste sincício foram encontrados grânulos grandes e ovais na glândula granular A de *D. elegans* (Fig. 4B) e pequenos e ovais em *D. minutus* (Fig. 4C). Na glândula granular B foram observadas grandes vesículas redondas e translúcidas (Fig. 4D). Em *D. minutus* as glândulas granulares foram encontradas em pouca quantidade.

Figura 2: **A-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme com seus estratos córneo (Ec), espinhoso (Ee) e basal (Eb), além da derme esponjosa (De). Coloração: HE. **B-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a epiderme (E) com células em forma de moringa (setas), derme esponjosa (De), derme compacta (Dc) e vasos sanguíneos (Vs). Coloração: Azul de toluidina. **C-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a epiderme (E) com células de Merckel (cabeça de seta) e derme esponjosa (De). Coloração: HE. **D-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), iridóforos (Ir), xantóforos (Xa), melanóforos (*) e derme compacta (Dc). Coloração: HE. **E-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando as fibras colágenas em vermelho (Tipo I) e verde (Tipo III), formando as dermes esponjosa (De) e compacta (Dc). Coloração: *Picrosirius red*. **F-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E) com células de Merckel (cabeça de seta), prolongamentos de melanóforos (*), iridóforos (Ir), camada E-K (estrela) e derme compacta (Dc). Coloração: HE. **G-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a epiderme (E), melanóforos (*), iridóforos (Ir), camada E-K (estrela) e derme compacta (Dc). Coloração: HE. **H-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E) e derme compacta (Dc) com fibras verticais (seta). Coloração: HE.



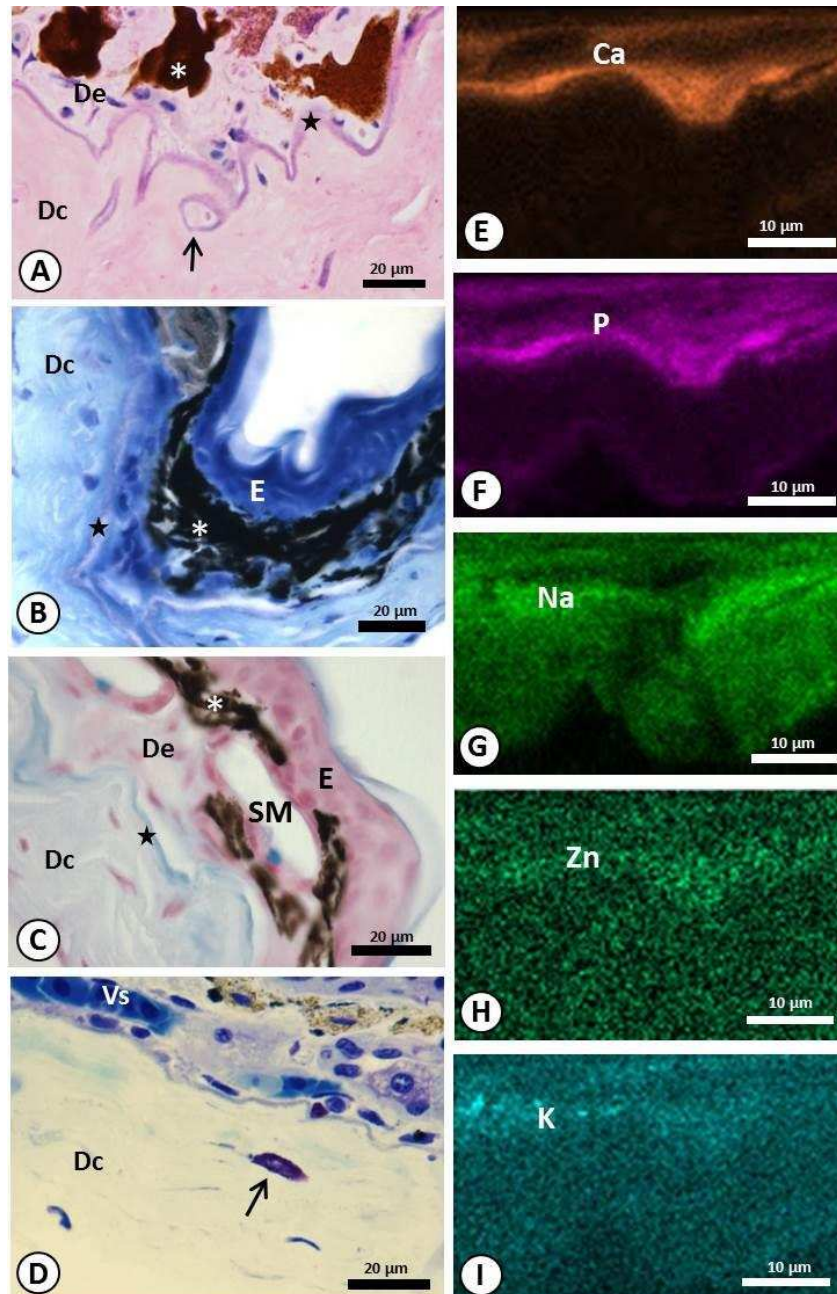


Figura 3: **A-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a derme esponjosa (De) e compacta (Dc), melanóforos (*), camada E-K (estrela) com pequenas células por ela envolvida (seta). Coloração: HE. **B-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), melanóforos (*), derme compacta (Dc), e camada E-K metacromática (estrela). Coloração: Azul de toluidina. **C-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), melanóforos (*), camada E-K alcianofílica (estrela), derme esponjosa (De) e compacta (Dc), além de glândulas seromucosas (SM). Coloração: Alcian blue pH 2,5. **D-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando vasos sanguíneos (Vs), derme compacta (Dc) e mastócitos metacromáticos (seta). Figuras **E-I-** Fotomicrografias sob EDS, evidenciando os elementos químicos que formam a camada E-K, sendo a figura **E-** Cálcio (Ca), **F-** Fósforo (P), **G-** Sódio (Na), **H-** Zinco (Zn) e **I-** Potássio (K).

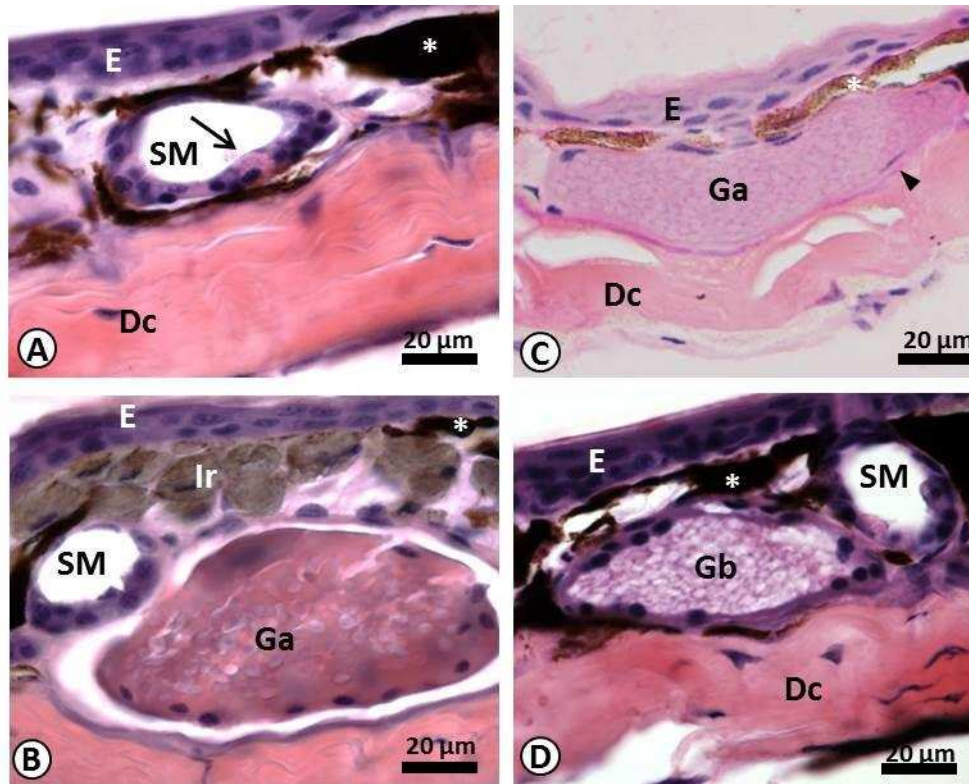


Figura 4: **A-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), derme compacta (Dc), melanóforos (*) e glândulas seromucosas (SM) com células eosinofílicas (seta). Coloração: HE. **B-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), melanóforos (*), iridóforos (Ir) glândulas seromucosas (SM) e glandular A (Ga). Coloração: HE. **C-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a epiderme (E), melanóforos (*), derme compacta (Dc) além de glândulas granulares A (Ga), com células mioepiteliais (cabeça de seta). Coloração: HE. **D-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), melanóforos (*), derme compacta (Dc), glândulas seromucosas (SM) e glandulares B (Gb). Coloração: HE.

Não houve diferenças histoquímicas entre as regiões e as espécies estudadas. As glândulas seromucosas foram positivas para PAS (Fig. 5A), AB (Fig. 5B) e MB (Fig. 5C) na superfície apical. As glândulas granulares A apresentaram o citoplasmática MB positivo (Fig. 5D). Já seus grânulos apresentaram suas delimitações MB positivos, com o interior pouco corado. As glândulas granulares B foram positivas para o *Alcian blue* pH 2,5 no citoplasmática (Fig. 5E). Alguns grânulos das glândulas granulares A apresentaram diferentes intensidades de roxo quando corados pelo azul de toluidina (Fig. 5F). A metacromasia também foi observada em células das porções superior e inferior das dermes, sendo provavelmente mastócitos (Fig. 3D). Todo o tegumento apresentou-se negativo para a detecção de lipídeos por *Oil red O*.

Analisando cada espécie separadamente, viu-se que a epiderme em *D. elegans* foi mais espessa no tronco ventral, enquanto que em *D. minutus* as espessuras foram similares nas três regiões corporais. A derme esponjosa se mostrou mais espessa na cabeça em *D. minutus* e no tronco ventral em *D. elegans*, enquanto que a derme compacta foi mais espessa no tronco ventral das duas espécies.

Comparando-se as espessuras da epiderme das duas espécies por região, observou-se que *D. elegans* apresentou maior espessura apenas no tronco ventral, quando comparada com *D. minutus*. Com relação à derme esponjosa e derme compacta, *D. elegans* apresentou maiores espessuras que *D. minutus*, para todas as regiões (Tab. 1).

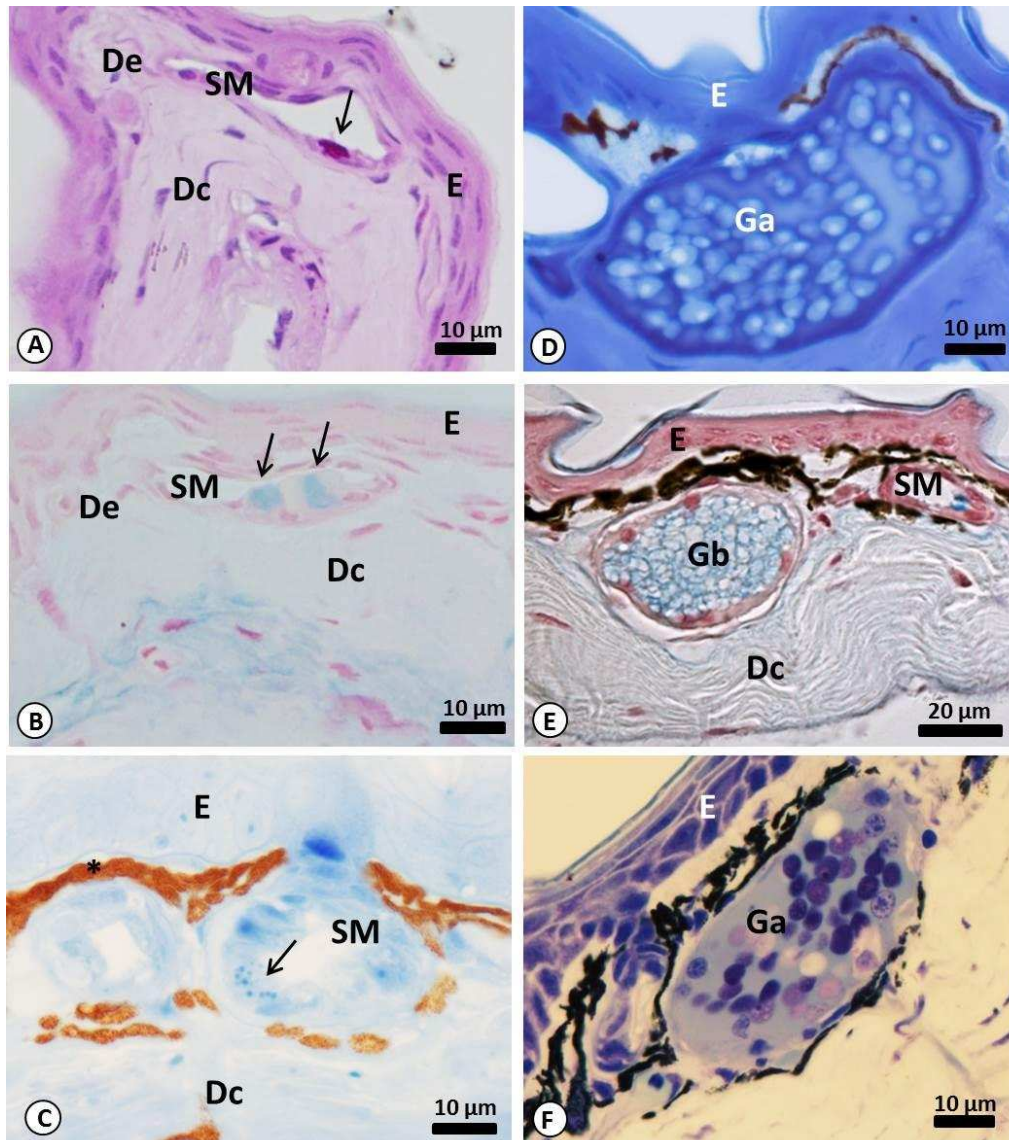


Figura 5: **A-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), derme esponjosa (De) e compacta (Dc) além de glândulas seromucosa (SM), com células PAS positivas (seta). Coloração: PAS. **B-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a epiderme (E), derme esponjosa (De) e compacta (Dc), além de glândula seromucosa com células AB⁺ (seta). Coloração: Alcian blue pH 2,5. **C-** Secção transversal do tegumento de *D. minutus* mostrando a epiderme (E), cromatóforos (*), derme compacta (Dc) e glândulas seromucosas com grânulos de proteínas em células MB⁺ (seta). Coloração: Mercúrio de bromofenol. **D-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E) e glândulas granulares A (Ga) com grânulos de proteínas. Coloração: Mercúrio de bromofenol. **E-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E), derme compacta (Dc), glândula seromucosa (SM) e granular B (Gb) alcian blue positiva. Coloração: Alcian blue pH 2,5. **F-** Secção transversal do tegumento de *D. elegans* mostrando a epiderme (E) e glândula granular A com alguns grânulos metacromáticos (Ga). Coloração: Azul de toluidina.

Tabela 1: Espessura média da epiderme, derme esponjosa e derme compacta de *D. elegans* e *D. minutus*, nas três regiões do corpo.

	Epiderme (μm)	Derme Esponjosa (μm)	Derme Compacta (μm)
CABEÇA			
<i>D. elegans</i>	25,41 \pm 7,27a	49,40 \pm 17,31a	68,97 \pm 20,80 ^a
<i>D. minutus</i>	26,93 \pm 6,27a	31,87 \pm 10,39b	56,29 \pm 15,20b
TRONCO DORSAL			
<i>D. elegans</i>	25,40 \pm 8,38a	42,09 \pm 15,21a	57,57 \pm 16,78a
<i>D. minutus</i>	24,36 \pm 5,32a	28,46 \pm 9,02b	51,66 \pm 13,44b
TRONCO VENTRAL			
<i>D. elegans</i>	30,60 \pm 9,36a	55,18 \pm 20,41a	93,84 \pm 26,52 ^a
<i>D. minutus</i>	25,13 \pm 7,93b	30,10 \pm 7,98b	67,49 \pm 17,54b

Média \pm Desvio Padrão; ^{ab}Letras diferentes na mesma coluna são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey, considerando cada região separadamente.

Tabela 2: Principais diferenças do tegumento de *D. elegans* e *D. minutus*

Espécies	Região	EPIDERME		DERME ESPONJOSA								Projeções superficiais
		Flask Cells	Células de Merkel	Cromatóforos			GLÂNDULAS			Camada E-K		
				Xantóforos	Iridóforos	Melanóforos	Seromucosas	Granular A	Granular B	Espessura	Células envoltas pela E-K	
<i>D. elegans</i>	Cabeça	+	+	+	+++ Dispostos em 2-3 camadas	++	++	++	++	+	+	Verrugas achatadas
	Tronco dorsal	+	+	+	+++ Dispostos em 2-3 camadas	++	++	++	++	+	+	Verrugas achatadas
	Tronco ventral	++	++	-	++	-	+++	++	+++	-	-	Verrugas grandes
<i>D. minutus</i>	Cabeça	+	+	+	++ Disposto em 1 camada	++ grandes	++	+	-	++	++	Projeções epidérmicas
	Tronco dorsal	+	+	+	++ Disposto em 1 camada	++ grandes	++	+	-	++	++	Projeções epidérmicas
	Tronco ventral	+++	+++	-	++	-	+++	+	-	-	-	Verrugas grandes

Os sinais indicam: (+++) abundante; (++) quantidade moderada; (+) rara; (-) não visualizado.

4.4 Discussão

Os resultados obtidos mostraram que o tegumento de *D. elegans* e *D. minutus* apresenta diferenças morfológicas que permitem uma diferenciação entre as espécies.

As características morfológicas de maior discrepância entre as duas espécies foram observadas nos grânulos das glândulas granulares A, sendo grandes em *D. elegans* e pequenos em *D. minutus*, e a presença de um terceiro tipo glandular em *D. elegans*, sendo denominadas granulares B. As glândulas tegumentares participam tanto da defesa mecânica quanto da manutenção da umidade tegumento. Isto porque elas produzem secreções mucosas contendo glicoproteínas, glicosaminoglicanas ácidas sulfatadas e carboxiladas e polissacarídeos neutros, cuja hidrofília auxilia durante a fuga, diminuindo o atrito, e contra a dessecação (Els e Henneberg, 1990; Duellman e Trueb, 1994; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Wells, 2007). Em *D. elegans* essa secreção é liberada tanto pelas glândulas seromucosas quanto pelas granulares B, enquanto que em *D. minutus* apenas as seromucosas fazem este papel. As granulares A de ambas as espécies apresentaram secreção de natureza proteica, cuja função está relacionada principalmente à defesa química, sendo geralmente tóxica para predadores e microrganismos patogênicos (Daly, 1995; Toledo e Jared, 1995; Conlon, 2011).

As projeções epidérmicas observadas em *D. minutus* formam uma barreira de retenção de água e de substâncias secretadas pelas glândulas tegumentares, e provavelmente permitem a formação de pequenos poços para acúmulo das mesmas. Este fato pode ter contribuído para a adaptação desses animais a diferentes ambientes e climas. Em *D. elegans*, as projeções são semelhantes a verrugas aumentando assim a área de superfície, otimizando o desempenho das

funções realizadas pelo tegumento. Nesta espécie, a umidificação, ao invés de reter grandes quantidades de água através da formação de poços, é intensificada pela presença de glândulas granulares produtoras de polissacarídeos, que atraem moléculas de água e impedem a dessecação (Els e Henneberg, 1990).

Além das projeções epidérmicas, outras características morfológicas foram identificadas como diferencial entre as espécies. O número de células em forma de moringa e de células de Merkel foi maior na superfície ventral de ambas as espécies, mas *D. minutus* apresentou maior quantidade delas que *D. elegans*. Considerando que as células de Merkel participam no reconhecimento do ambiente e as células em forma de moringa têm a capacidade de realizar o transporte de íons (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Junqueira e Carneiro, 2008), sugere-se que a região ventral em *D. minutus* tenha um papel maior na osmorregulação e na mecanorrecepção. Yorio e Bentley (1977), ao testarem o efeito de hormônios e resistência elétrica tanto na região dorsal quanto na ventral de *Agalychnis dacnicolor*, provaram que esta última possui maior permeabilidade a água e íons. Como as células em forma de moringa participam da osmorregulação, nós supomos que sua presença em maior quantidade nesta região seja essencial para a ocorrência do transporte de íons. Além disso, a alta vascularização desta região pode auxiliar na distribuição de água e íons absorvidos (Duellman e Trueb, 1994).

Apesar da espessura das regiões do tegumento ter mostrado diferenças entre as espécies, com *D. elegans* apresentando as maiores medidas no tronco ventral, a região da derme esponjosa destaca-se por revelar características espécie-específicas marcantes: o tamanho dos melanóforos, a espessura da camada E-K e a quantidade de células envolvidas por esta camada. Estes parâmetros se

mostraram maiores em *D. minutus*, quando comparado com *D. elegans*. Possivelmente, as pequenas células envolvidas pela camada E-K estão relacionadas com a formação desta camada. Por isso, como em *D. minutus* a camada E-K é mais espessa, essas células são facilmente visualizadas. As características histoquímicas da camada E-K foram semelhantes ao descrito por Azevedo *et al.* (2006) para *Bufo ictericus* e Mangione *et al.* (2011) para *Ceratophryines* sp., apresentando metacromasia, alcianofilia e cálcio. Nossos resultados mostraram que, além dessas características, esta camada contém fósforo, sódio, zinco e potássio. Sabe-se que a camada E-K é formada por fibras colágenas e elásticas, onde minerais como cálcio e fosfato são depositados (Azevedo *et al.*, 2005; Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Azevedo *et al.*, 2006; Felseburgh *et al.*, 2009; Mangione *et al.*, 2011). Muitos trabalhos propõem que a função desta camada seja de barreira contra dessecação ou proteção mecânica (Els e Henneberg, 1990; Duellman e Trueb, 1994; Wells, 2007), nós supomos que esta seja também um local de reserva de minerais importantes para o processo de osmorregulação desses animais, pois a ocorrência da homeostasia no tegumento exige um equilíbrio de íons entre o ambiente interno e o externo (Wells, 2007).

A família Hylidae possui taxonomia controversa e complexa (Faivovich *et al.*, 2005), sendo um fator de divergências entre morfologistas e biólogos moleculares (Frost, 2013). *D. elegans* foi removida da sinonímia de *Hyla leucophyllata* (Caramaschi e Jim, 1982), sendo posteriormente classificada como *Hyla elegans* e em seguida *Dendropsophus elegans* (Faivovich *et al.*, 2005). Já a espécie *D. minutus*, era inicialmente chamada *Hyla minuta* (Frost, 2013). Suas características morfológicas, tanto do adulto quanto das larvas, permitiram que *D. minutus* desse o nome a um grupo, contendo aproximadamente sete espécies

(Kaplan, 1994). Poucos trabalhos utilizam o tegumento de anfíbios para validar dados taxonômicos, embora nenhum compare espécies do mesmo gênero, nem trate de hylideos (Brito-Gitirana e Azevedo, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007; Rigolo *et al.*, 2008; Felseburgh *et al.*, 2009). Esses achados mostram que ferramentas que auxiliem na taxonomia de anuros são de grande importância, pois criam mais uma alternativa na determinação taxonômica de diversas espécies, estabelecendo possíveis relações filogenéticas.

Portanto, as características da superfície tegumentar, a presença de glândulas, a organização de células cromatóforas e da camada E-K, bem como a espessura de camadas indicam uma possível utilização da análise morfológica do tegumento como ferramenta para diferenciação de espécies da família Hylidae.

4.5 Referências

- AZEVEDO, A.A., SANTANA, A.S.J., BRITO-GIRITANA, L., 2006. Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. *Micron* 37, 223-228.
- AZEVEDO, R.A., PELLI, A.A., PEREIRA, A.F., SANTANA, A.S.J., FELSEBURGH, F., BRITO GITIRANA, L., 2005. Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of the cutaneous calcium (Amphibian, Bufonidae). *Micron* 36, 61-65
- BANCROFT, J.D., COOK, H.C., 1994. Manual of Histological techniques and their diagnostic application. Churchill Livingstone, New York.

- BANCROFT, J.D., STEVENS, A., 1996. Theory and practice of histological techniques. 4ed, Churchill livingstone, New York.
- BRAND, G.D., SANTOS, R.C., ARAKE, L.M., SILVA, V.G., VERAS, L.M.C., COSTA, C., COSTA, C.H.N., KUCKELHAUS, S.S., ALEXANDRE, J.G., FEIO, M.J., LEITE, J.R.S.A., 2013. The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: a source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules* 18, 7058-7070.
- BRITO-GITIRANA, L., AZEVEDO, R.A., 2005. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). *Micron* 36, 532-538.
- BRITO-GITIRANA, L.; AZEVEDO, R.A.; PELLI, A.A., 2007. Expression pattern of glycoconjugates in the integument of *Bufo ictericus* (Anuran, Bufonidae): Biochemical and histochemical (lectin) profiles. *Tissue and Cell*: 39: 415-421.
- CARAMASCHI, U., JIM, J., 1982. Revalidação de *Hyla elegans* Wied, 1824. *Ciência e Cultura* 7:848.
- CFMV, 2013. Métodos de Eutanásia em Animais. http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf. Acessado em 09 de outubro de 2013.
- CLARKE, B.T., 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biology Review* 72, 365-379.
- CONCEIÇÃO, K., BRUNI, F.M., SCIANI, J.M., KONNO, K., MELO, R.L., ANTONIAZZI, M.M., JARED, C., LOPES-FERREIRA, M., PIMENTA, D.C., 2009. Identification of bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa nordestina* skin secretion using electrospray ionization tandem mass

- spectrometry after single-step liquid chromatography. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 15, 633-652.
- CONLON, J.M., 2011. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Research* 343, 201-212.
- DALY, J.W., 1995. The Chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9-13.
- DAPSON, R.W., 1969. Histochemistry of mucus in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *The Anatomical Record* 166, 615-626.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., ALVAREZ, B.B., GENTILI, M., 1999. Granular cutaneous glands in the frog *Physalemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): comparison between ordinary serous and 'inguinal' glands. *Tissue and Cell* 31, 576-586.
- DELFINO, G., BRIZZI, R., NOSI, D., TERRENI, A., 2002. Serous cutaneous glands in new world hylid frogs: an ultrastructural study on skin poisons confirms phylogenetic relationships between *Osteopilus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. *Journal of Morphology* 253, 176-186.
- DELFINO, G., NOSI, D., GIACHI, F., 2001. Secretory granule-cytoplasm relationship in serous glands of anurans: ultrastructural evidence and possible functional role. *Toxicon* 39, 1161-1171.
- DUELLMAN, W.R., TRUEB, L., 1994. Biology of amphibians. 2 ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- ELIAS, H., SHAPIRO, J., 1957. Histology of the skin of some toads and frogs. *American Museum of Natural History* 1819, 1-27.

- ELS, W.J., HENNEBERG, R., 1990. Histological features and histochemistry of the mucous glands in ventral skin of the frog (*Rana fuscigula*). *Histology and Histopathology* 5, 343-348.
- FAIVOVICH J., HADDAD, C.F.B., GARCIA, P.C.A., FROST, D.R., CAMPBELL, W.C. WHEELER, W.C., 2005. Systematic review of the frog family hylidae, with special reference to hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294, 1-240.
- FAIVOVICH, J., HADDAD, C.F.B., BAËTA, D., JUNGFER, K.H., ÁLVARES, F.R., BRANDÃO, R.A., SHEIL, C., BARRIENTOS, L.S., BARRIO-AMORÓS, C.L., CRUZ, C.A.G., WHEELER, W.C., 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistic* 26, 227-261.
- FELSEMBURGH, F.A., ALMEIDA, P.G., CARVALHO-E-SILVA, S.P., BRITO-GITIRANA, L., 2009. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron* 40, 198-205.
- FELSEMBURGH, F.A., CARVALHO-E-SILVA, S.P., BRITO-GIRITANA, L., 2007. Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron* 38, 439-445.
- FROST, D.R., 2013. Amphibians species of the world: an online reference. Disponível em <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>. Acessado em 15 de dezembro de 2013.

- GONÇALVES, V.F., BRITO-GITIRANA, L., 2008. Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *Micron* 39, 32-39.
- JUNQUEIRA L.C.U., BIGNOLAS, G., BRENTANI R.R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *The Histochemical Journal* 11, 447-455.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J., 2008. Histologia Básica. 10ed. Guanabara Koogan, São Paulo.
- KAPLAN, M., 1994. A new species of frog of the genus *Hyla* from the Cordillera Oriental in northern Colombia with comments on the taxonomy of *Hyla minuta*. *Journal of Herpetology* 28, 79-87.
- KARVOVSKY, M.J., 1965. A formaldehydo-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27, 137A.
- LEITE, J.R.S.A., SILVA, L.P., RODRIGUES, M.I.S., PRATES, M.V., BRAND, G.D., LACAVA, B.M., AZEVEDO, R.B., BOCCA, A.L., ALBUQUERQUE, S., BLOCH, C.J., 2005. Phylloseptin: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from *Phyllomedusa* genus. *Peptides* 26, 565-573.
- LILLYWHITE, H.B., MITTAL, A.K., GARG, T.K., AGRAWAL, N., 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behavior in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of Zoology, London* 243, 675-687.

- MANGIONE, S., GARCIA, G., CARDOZO, O.M., 2011. The Eberth-Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). *Acta Zoologica* 92, 21-26.
- MELZER, S., CLERENS, S., BISHOP, P.J., 2011. Differential polymorphism in cutaneous glands of archaic *Leiopelma* specie. *Journal of Morphology* 272, 1116-1130.
- MERCÊS, E.A., JUNCÁ, F.A., 2010. Girinos de três espécies de *Aplastodiscus lutz*, 1950 (Anura - Hylidae) ocorrentes no Estado da Bahia, Brasil. *Biota Neotropica* 10, 167-172.
- NOSI, D., TERRENI, A., ALVAREZ, B.B., DELFINO, G., 2002. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hipocondrialis* azurea (Anura, Hylidae): response by different gland types to norepinephrine stimulation. *Zoomorphology* 121, 139-148.
- PEARSE, A.G.E., 1968. Histochemistry theoretical and applied. 2ed William and Wilkins, Baltimore.
- PRADO, G.M., POMBAL-JR, J.P., 2008. Espécies de *Proceratophrys* Miranda Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura: Cycloramphidae). *Arquivos de Zoologia* 39, 1-85.
- PRATES, I., ANTONIAZZI, M.M., SCIANI, J.M., PIMENTA, D.C., TOLEDO, L.F., HADDAD, C.F.B., JARED, C., 2012. Skin glands, poison and mimicry in Dendrobatid and Leptodactylid amphibians. *Journal of Morphology* 273: 279-290.
- RIGOLO, J.R., ALMEIDA, J.A., ANANIAS, F., 2008. Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus* aff. *venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae). *Micron* 39, 56-60.

- ROSSA-FERES, D.C., NOMURA, F., 2005. Characterization and taxonomic Key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/abstract?identification-key+bn00706012006>. Acessado em 11 de dezembro de 2013.
- SAHIN, M., GUMUS, A., BALCAN, E., 2008. Glycoconjugate histochemistry of mucous glands in the skin of metamorphosing *Bufo viridis*. *Biologia* 63, 444-449.
- SILVA, H.R., BENMAMAN, P., 2008. Uma nova espécie de *Hylodes* Fitzinger da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil (Anura: Hylodidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 25, 89-99.
- SOUZA, W., 2007. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro.
- TEMPONE, A.G., MELHEM, M.S.C., PRADO, F.O., MOTOIEL, G., HIRAMOTO, R.M., ANTONIAZZI, M.M., HADDAD, C.F.B., JARED, C., 2007. Amphibian secretions for drug discovery studies: A search for new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design and Discovery* 4, 67-73.
- TERRENI, A., NOSI, D., GREEVEN, H., DELFINO, G., 2003. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation comparison with larval glands in specimens of other families. *Tissue and Cell* 35, 274-287.
- TOLEDO, R.C., JARED, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A, 1 - 29.

TOLOSA, E.M.C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O.A., NETO, A.G.F., 2003.

Manual de Técnicas para histologia normal e patológica. Manole, Rio de Janeiro.

VANHOYE, D., BRUSTON, F., NICOLAS, P., AMICHE, M., 2003.

Antimicrobial peptides from hylid and ranid frogs originated from 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry* 270, 2068-2081.

WELLS, K.D., 2007. The Ecology and behavior of amphibians. 1ed The university of Chicago Press, Chicago and London.

YORIO, T., BENTLEY, P.J., 1977. Asymmetrical permeability of the integument of tree frogs (Hylidae). *Journal of Experimental Biology* 67, 197-204.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Superficialmente, as espécies *Hypsiboas semilineatus*, *Phyllomedusa burmeisteri* e *Dendropsophus elegans* apresentaram projeções tegumentares semelhantes a verrugas na porção da cabeça e tronco dorsal. Já em *D. minutus* observou-se apenas elevações epidérmicas. Na região ventral de todas as espécies notou-se a presença de grandes verrugas separadas por estrias.
- 2- O tegumento das espécies avaliadas é formado por uma epiderme estratificada, formada pelas camadas córnea, com células nucleadas e pouco queratinizadas, espinhosa, com inúmeros desmossomos, e basal. Os principais tipos celulares encontrados foram os queratinócitos, as de células de Merckel e células em forma de moringa.
- 3- Abaixo da epiderme visualizou-se a derme esponjosa, onde observamos cromatóforos formando camadas contínuas na região da cabeça e tronco dorsal e dispostos aleatoriamente no tronco ventral, além de glândulas exócrinas diferenciadas para cada espécie, e derme compacta formada principalmente por fibras colágenas do tipo I e III, dispostas de forma horizontal, cruzada e alternada, além de fibras verticais, vasos sanguíneos e nervos.
- 4- Em *D. minutus* e *D. elegans* observamos entre as dermes, da região da cabeça e tronco dorsal, uma terceira camada, denominada E-K. Nesta foi possível identificar a presença de glicosaminoglicanas ácidas sulfatadas e carboxiladas, além de cálcio, fósforo, sódio, zinco e magnésio. No ventre esta camada está ausente.

- 5- Cada espécie apresentou um conjunto de glândulas. *Hypsiboas semilineatus* e *D. minutus* apresentaram glândulas seromucosas e granulares A. Apesar de possuírem o mesmo conjunto de glândulas, a morfologia das granulares A apresentou-se diferente entre elas. *Phyllomedusa burmeisteri* apresentou glândulas granulares A e B, glândulas seromucosas e lipídicas. *Dendropsophus elegans* apresentou glândulas granulares A e B, além de seromucosas;
- 6- Glândulas seromucosas foram positivas para PAS, *alcian blue* pH 2,5 e mercúrio de bromofenol. As glândulas granulares A apresentaram marcações positivas para mercúrio de bromofenol, enquanto que as granulares B de *P. burmeisteri* foram positivas tanto para PAS quanto para mercúrio de bromofenol. Já as granulares B de *D. elegans* apresentaram marcações positivas para *alcian blue* pH 2,5. As glândulas lipídicas foram positivas para *oil red O*.
- 7- As características histomorfométricas mostraram que cada espécie apresenta diferentes espessuras dos componentes tegumentares, quantidades e tamanhos de glândulas para suas regiões. Neste contexto, a região ventral apresentou características espécie-específicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de espécies, tanto endêmicas de Mata Atlântica, quanto espécies que habitam outros biomas, reforça a importância da condução de pesquisas que visem contribuir no desenvolvimento de metas cujo objetivo principal seja auxiliar nas questões de preservação dessas espécies e do ambiente em que elas habitam. Neste sentido, o tegumento dos anuros pode nos fornecer informações importantes quanto à fisiologia e comportamento do animal, além de apoiar pesquisas quanto à taxonomia das espécies, elucidando aspectos evolutivos e filogenéticos e até mesmo validar e revelar dados de história natural, sendo estes tão escassos na literatura.

7 ANEXOS

7.1 Anexo I: Coloração por hematoxilina e eosina

Parafina

1. Desparafinizar as lâminas histológicas;
2. Encubar durante 1 min em hematoxilina;
3. Lavar em água corrente por 2 min;
4. Encubar durante 40 segundos em eosina;
5. Lavar em água corrente durante 1 min;
6. Desidratar, diafanizar e montar com lamínula.

Resina

1. Encubar as lâmina histológicas em hematoxilina durante 10 min;
2. Lavar por 3 min em água corrente;
3. Encubar durante 30 s em eosina;
4. Lavar por 2 min em água corrente;
5. Secar e montar com lamínula.

7.2 Anexo II: Coloração por azul de toluidina

Parafina

1. Desparafinizar as lâminas histológicas;
2. Encubar durante 1 min em azul de toluidina 1% com borato de sódio 0,5%;
3. Lavar em água corrente por 2 min;
4. Desidratar, diafanizar e montar com lamínula.

Resina

1. Encubar as lâminas histológicas durante 1 min em azul de toluidina 1% com borato de sódio 0,5%;
2. Lavar por 3 min em água corrente.
3. Secar e montar com lamínula.

7.3 Anexo III: Coloração por *Oil Red O*

Resina

1. Encubar durante 1 h à 60 °C em solução de *Oil Red O* 0,3% em isopropanol 60%;
2. Lavar rapidamente em água corrente;
3. Secar e montar com lamínula.

7.4 Anexo IV: Coloração *Periodic Acid Schiff* (PAS)

Parafina

1. Desparafinizar as lâminas histológicas;
2. Encubar em solução de ácido periódico 1% por 20 min;
3. Lavar em água corrente por 2 min;
4. Encubar em Reativo de Schiff por 25 min no escuro;
5. Lavar em água corrente durante 1 min;
6. Contra corar com hematoxilina por 1 min;
7. Lavar rapidamente em água corrente;
8. Desidratar, diafanizar e montar com lamínula.

Resina

1. Encubar em solução de ácido periódico 1% por 25 min;
2. Lavar em água corrente por 2 min;
3. Encubar em Reativo de Schiff por 30 min no escuro;
4. Lavar em água corrente durante 1 min;
5. Contra corar com hematoxilina por 2 min;
6. Lavar rapidamente em água corrente;
7. Secar e montar com lamínula.

7.5 Anexo V: Coloração por *Alcian Blue* pH 2.5

Parafina

1. Desparafinizar as lâminas histológicas;
2. Encubar em solução de ácido acético glacial 3% por 5 min;
3. Encubar diretamente em solução de *Alcian Blue* 1%, pH 2.5 em solução de ácido acético glacial 3% durante 40 min a 60°C;
4. Lavar em água destilada durante 1 min;
5. Contra corar solução de *fast red* 0,5% por 2 min;
6. Lavar rapidamente em água destilada;
7. Desidratar, diafanizar e montar com lamínula.

Resina

1. Encubar em solução de ácido acético glacial 3% durante 5 min;
2. Encubar em solução de *Alcian Blue* 1% pH 2.5 em solução de ácido acético glacial 3% durante 2 h à 60 °C;
3. Lavar na mesma solução de ácido acético 3%;
4. Contra corar com solução de *fast red* 0,5% por 2 min;
5. Lavar rapidamente em água destilada;
6. Secar e montar com lamínula.

7.6 Anexo VI: Coloração por mercúrio de bromofenol

Parafina

1. Desparafinizar as lâminas histológicas;
2. Encubar durante 30 min solução de azul de bromofenol 0,5% com cloreto de mercúrio 1,5% em ácido acético 2%;
3. Lavar 3x, durante 10 min cada, em solução de ácido acético 0,5%;
4. Lavar em água corrente até que os cortes histológicos mudem da cor verde para azul;
5. Desidratar, diafanizar e montar com lamínula.

Resina

1. Encubar durante 2h solução de azul de bromofenol 0,5% com cloreto de mercúrio 1,5% em ácido acético 2%;
2. Lavar rapidamente em água corrente;
3. Lavar 3x, durante 10 min cada, em solução de ácido acético 0,5%;
4. Lavar em água corrente até que os cortes histológicos mudem da cor verde para azul;
5. Secar e montar com lamínula.

7.7 Anexo VII: Coloração por *picrosirius red*

Parafina

1. Desparafinizar as lâminas histológicas;
2. Encubar em solução de *Sirius Red F₃BA* 0,1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico durante 1 hora;
3. Lavar em água corrente por 2 min;
4. Encubar em HCl 0,01N durante 2 min.;
5. Lavar em água corrente durante 1 min;
6. Contra corar com hematoxilina de Harrys por 2 min;
7. Lavar rapidamente em água corrente;
8. Desidratar, diafanizar e montar com lamínula.

Resina

1. Encubar as lâmina histológicas em solução de *Sirius Red F₃BA* 0,1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico durante 48 horas;
2. Encubar em HCl 0,01N durante 2 min;
3. Lavar por 2 min em água corrente;
4. Contra corar com hematoxilina de Harrys por 2 min;
5. Lavar rapidamente em água corrente;
6. Secar e montar com lamínula.