

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Laura Virginio Vieira da Silva

A atividade secretória cutânea em pererecas: uma abordagem morfológica

São Paulo

2020

Laura Virginio Vieira da Silva

A atividade secretória cutânea em pererecas: uma abordagem morfológica

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Animais de Interesse em Saúde.

Orientador (a): Marta Maria Antoniazzi

Coorientador (a): Pedro Luiz Mailho Fontana

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira-da-Silva, Laura Virginio

A atividade secretória cutânea em pererecas: uma abordagem morfológica / Laura Virginio Vieira da Silva; orientador Marta Maria Antoniazzi. – São Paulo, 2020.

49 f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Animais de Interesse em Saúde.

1. Anura. 2. Pele. 3. Glândulas cutâneas. I. Vieira-da-Silva, Laura Virginio. II. Instituto Butantan. III. Especialização em Animais de Interesse em Saúde. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Laura Virginio Vieira da Silva, aluna do curso Animais de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

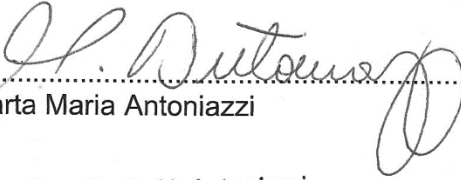
- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 27 de fevereiro de 2020.



.....
Aluna: Laura Virginio Vieira da Silva

De acordo:.....
Orientadora: Marta Maria Antoniazzi


Dra. Marta M. Antoniazzi
Pesquisador Científico VI
Laboratório de Biologia Estrutural
Instituto Butantan

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim, que todos os dias me deram forças para superar as dificuldades e persistir no sonho de fazer uma pós-graduação. Obrigada por fazerem o possível e o impossível, com todo amor do mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Marta Maria Antoniazzi, pela constante orientação, pelas longas conversas, risadas e ensinamentos que me fizeram refletir e crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Dr. Carlos Jared, Diretor do Laboratório de Biologia Celular, por ter me dado a oportunidade de me inserir no universo da pele e das secreções cutâneas dos anfíbios.

Aos amigos do laboratório Biologia Celular, Beatriz Mauricio, Simone Gonçalves Silva Jared, Cesar Alexandre e em especial a Pedro Luiz Mailho Fontana e Luciana de Almeida Sato por toda ajuda na realização de alguns experimentos, pelas conversas descontraídas, risadas, conselhos, enfim pela amizade.

Agradeço imensamente aos meus pais Marcelo e Magna, e ao meu irmão Lucas que sempre me apoiaram e cujo incentivo aos estudos são e sempre serão os principais motivos pelos quais sigo minha carreira.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho o meu muito obrigada.

“Deixem que o futuro diga a verdade e avalie cada um de acordo com o seu trabalho e realizações. O presente pertence a eles, mas o futuro pelo qual eu sempre trabalhei pertence a mim”.

Nikola Tesla

RESUMO

VIEIRA-DA-SILVA, Laura Virginio. **A atividade secretória cutânea em pererecas: uma abordagem morfológica.** 2020. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Animais de Interesse em Saúde. – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

A pele nos anfíbios é um órgão envolvido em diversas funções vitais, como respiração e defesa química contra predadores e microrganismos. Essas funções estão relacionadas a diferentes componentes da pele, tais como as glândulas cutâneas de dois tipos básicos, as mucosas e as de veneno. Entre os anuros, em especial nas pererecas, chama a atenção o fato que, em situações de estresse, enquanto algumas espécies conseguem liberar imediatamente grandes quantidades de secreção, geralmente espessa e pegajosa, outras não modificam seu modo secretório cutâneo, fazendo uso de estratégias comportamentais para escapar do perigo. Essas diferenças, à primeira vista, deveriam se relacionar com a maior ou menor capacidade de contração das células mioepiteliais que envolvem as glândulas da pele, agindo isoladamente ou em conjunto com outras características morfológicas cutâneas. Este trabalho objetivou o estudo morfológico e morfométrico da pele de diferentes pererecas capazes de liberar secreção abundante, *Trachycephalus mesophaeus* e *Corythomantis greeningi*, em comparação com uma perereca pouco secretora, *Itapotihyla langsdorffii*. Procuramos focar nas principais características das glândulas cutâneas, principalmente no que se refere às células mioepiteliais, mas também analisamos outras características estruturais, como a espessura da camada dérmica calcificada e o número de células pilares espalhadas na derme. Amostras de pele dorsal de indivíduos adultos (n = 3) de *T. mesophaeus*, *I. langsdorffii*, *C. greeningi* obtidas de animais previamente fixados em solução de paraformaldeído tamponada, foram processadas para histologia em historesina. Os cortes (2 µm) foram corados com azul de toluidina-fucsina. As imagens foram obtidas e analisadas em um microscópio de luz Olympus BX51, equipado com uma câmera digital e o software Olympus Cellsens 1.17. As medições foram realizadas em triplicata e as médias calculadas. A análise estatística foi realizada através da ANOVA one-way e as diferenças foram consideradas significantes quando $P \leq 0,05$. Os resultados mostraram que, em todas as espécies analisadas, os

mioepitélios, tanto das glândulas de veneno como das mucosas, não apresentaram diferenças significativas em suas espessuras, contrariado o que era inicialmente esperado. Em relação às outras características estruturais, chama a atenção o número de células pilares aparentemente mais numerosas em *I. langsdorffii* e *C. greeningi*, fato que também não era esperado inicialmente, além da camada calcificada mais espessa em *T. mesophaeus* e *C. greeningi*. Nossos resultados demonstram que as estruturas morfológicas cutâneas analisadas aparentemente não possuem um papel individual predominante em uma ou outra espécie. Todas devem participar de um sistema mais complexo de liberação da secreção cutânea, conjuntamente com outros fatores de origem filogenética, fisiológica e comportamental.

Palavras-chave: Anura. Pele. Glândulas cutâneas. Secreção cutânea. Morfologia.

ABSTRACT

VIEIRA-DA-SILVA, Laura Virginio. **Cutaneous secretory activity in tree frogs: a morphological approach.** 2020. 49 p. Monograph (Specialization in Animals of Interest in Health) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

The skin in amphibians is an organ involved in several functions, such as breathing and chemical defense against predators and microorganisms. These functions are related to different skin components, such as cutaneous glands of two basic types, the mucous glands and the poison glands. Among anurans, in special in tree frogs, calls attention the fact that, in stressful situations, while some species can release large amounts of secretion, usually thick and sticky, others do not modify their secretory mode, making use of behavioral strategies to escape of danger. These differences, at first sight, may be related to greater or lesser capacity to control myoepithelial cells that involve the skin glands, isolated or together with other cutaneous morphological characteristics. This work aims at the morphological and morphometric study of the skin of different tree frogs capable of release abundant secretion, *Trachycephalus mesophaeus* and *Corythomantis greeningi*, in comparison with a little secretory tree frog, *Itapotihyla langsdorffii*. We tried to focus on the main characteristics of the cutaneous glands, mainly with regard to the myoepithelial cells, but we also analyzed other specific characteristics, such as the thickness of the calcified dermal layer and the number of pillar cells scattered in the dermis. Samples of dorsal skin of adults (n = 3) from *T. mesophaeus*, *I. langsdorffii* and *C. greeningi* obtained from animals previously fixed in buffered paraformaldehyde solution, were processed for histology in historesin. The sections (2 µm) were stained with toluidine blue-fuchsin. The images were analyzed in an Olympus BX51 light microscope, equipped with a digital camera and the Olympus Cellsens 1.17 software. The measurements were performed in triplicate and the media was calculated. A statistical analysis was performed using unidirectional ANOVA and the differences were significant when $P \leq 0.05$. The results showed that in all analyzed species, in some cases, both the poison and the mucous glands, did not show differences in thickness, contrarily of what was expected.

In relation to the other structural characteristics, called attention the number of pillar cells that were apparently more numerous in *I. langsdorffii* and in *C. greeningi*, fact that was not initially expected, in addition to the thicker calcified layer in *T. mesophaeus* and *C. greeningi*. Our results demonstrate that the cutaneous morphological structures do not seem to perform a predominant individual role in any of the analyzed species. All structures seem to participate of a more complex system of skin secretion release, together with other factors of phylogenetic, physiological and behavioral origin.

Keywords: Anura. Skin. Cutaneous glands. Cutaneous secretion. Morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representantes das três ordens que compõem a classe Amphibia	15
Figura 2- Tegumento dos anfíbios	16
Figura 3- <i>Corythomantis greeningi</i>	19
Figura 4- <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	20
Figura 5- <i>Itapotihyla langsdorffii</i>	21
Figura 6- Histologia da pele dorsal	25
Figura 7- Aspecto das glândulas cutâneas	27
Figura 8- Espessura da camada mioepitelial	28
Figura 9- Espessura camada calcificada	29
Figura 10- Aspecto das células pilares	30
Figura 11- <i>Corythomantis greeningi</i> : Lâmina 259	39
Figura 12- <i>Corythomantis greeningi</i> : Lâmina 260	40
Figura 13- <i>Corythomantis greeningi</i> : Lâmina 9089	41
Figura 14- <i>Corythomantis greeningi</i> : camada calcificada	42
Figura 15- <i>Trachycephalus mesophaeus</i> : Lâmina 283	44
Figura 16- <i>Trachycephalus mesophaeus</i> : Lâmina 285	45
Figura 17- <i>Trachycephalus mesophaeus</i> : Lâmina 10015	46
Figura 18- <i>Trachycephalus mesophaeus</i> : camada calcificada	47
Figura 20- <i>Itapotihyla langsdorffii</i> : Lâmina 272	49
Figura 21- <i>Itapotihyla langsdorffii</i> : Lâmina 275	49
Figura 22- <i>Itapotihyla langsdorffii</i> : Lâmina 276	50
Figura 23- <i>Itapotihyla langsdorffii</i> : camada calcificada	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Características Gerais da Pele de Anfíbios</i>	15
1.1	<i>Glândulas Mucosas e Glândulas de Veneno</i>	16
1.2	<i>Camada Calcificada</i>	17
1.3	<i>Corythomantis greeningi</i>	17
1.4	<i>Trachycephalus mesophaeus</i>	18
1.5	<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	<i>Objetivos gerais</i>	21
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	<i>Obtenção e fixação das amostras histológicas</i>	22
3.2	<i>Técnica histológica</i>	22
3.3	<i>Fotomicrografias</i>	23
3.4	<i>Análises estatísticas</i>	23
4	RESULTADOS	24
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÕES	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO(S)	37

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios surgiram no período Devoniano e foram os primeiros vertebrados a conquistar o ambiente terrestre. Há cerca de 390 milhões de anos atrás surgiu-se os labirintodontes, considerados os primeiros representantes da classe Amphibia (DUELLMAN; TRUEB, 1986; RETALLACK, 2011). Atualmente são conhecidas 8.120 espécies de anfíbios que estão alocados na Sub-classe Lissamphibia, que é composta por três ordens distintas: Anura (sapos, rãs e pererecas) (Figura 1A), Urodela (salamandras e tritões) (Figura 1B) e Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) (Figura 1C) (ZARDOYA; MEYER, 2001; POUGH et al., 2002; FROST, 2019).

Figura 1- Representantes das três ordens que compõem a classe Amphibia



Fonte:

<https://www.flickr.com/photos/mariosacramentophotos/6326765760/>
Itapotihyla langsdorffii

Fonte:

<https://www.iucnredlist.org/species/59467/11928700>
Salamandra salamandra

Fonte:

<https://www.superstock.com/asset/7718402/>
Siphonops annulatus

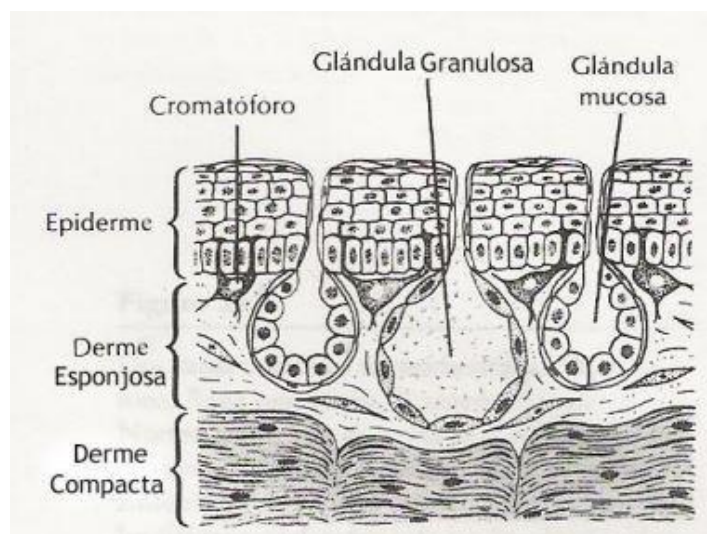
Os anfíbios são animais ectotérmicos, isto é, seu metabolismo depende totalmente da temperatura ambiente (FERREIRA et al, 2006; MANGIONE; GARCIA; CARDOZO, 2011), e possuem pele úmida e permeável apresentando respiração pulmonar e/ou cutânea e branquial. Por esse motivo, os anfíbios apresentam grande dependência da água, principalmente no período reprodutivo, apesar de a maioria das espécies viverem fora do ambiente aquático. Essas características favoreceram adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais peculiares, que permitiram uma colonização cosmopolita, desde os desertos até ambientes gelados do Ártico (BENTLEY, 1966; DUELLMAN; TRUEB, 1986; STEBBINS; COHEN, 1995; WARBURG, 1997; TRACY et al., 2010).

1.1 Características Gerais da Pele de Anfíbios

O tegumento dos anfíbios é considerado a interface morfofuncional entre o organismo e o ambiente. Além da proteção física, participa da respiração, no transporte de íons e água, no controle de temperatura, na recepção sensorial química e mecânica, na reprodução e na defesa contra microrganismos e predadores (FOX, 1986; TOLEDO; JARED, 1993c; ZUG, 1993; STEBBINS; COHEN, 1995; TOLEDO; JARED, 1995; DUELLMAN; TRUEB, 1996; CLARKE, 1997).

Como em todos os vertebrados, a pele dos anfíbios é composta por uma epiderme e uma derme (DUELLMAN; TRUEB, 1996) (Figura 2).

Figura 2- Tegumento dos anfíbios



Fonte: Duellman; Trueb, 1986.

Esquema representando o tegumento dos anfíbios composto por epiderme, derme esponjosa e derme compacta, além das células pigmentares e das glândulas características.

A epiderme, de origem ectodérmica, é um estrato epitelial, geralmente organizado em quatro camadas de células, sendo estrato córneo (mais externo), estrato granuloso, estrato espinhoso e o estrato germinativo (mais profundo). Essa última camada se apoia sobre a lâmina basal, que separa o epitélio da derme subjacente, e é responsável por originar todas as outras camadas epiteliais (Zug, 1993; Fox, 1986 e 1994; BRITO-GITIRANA; AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH et al., 2009).

Abaixo da epiderme está localizada a derme, de origem mesodérmica, que é composta basicamente de duas camadas de tecido conjuntivo: o estrato esponjoso, que contém uma camada de cromatóforos (xantóforos, iridóforos e melanóforos) colágeno, fibras elásticas, nervos, vasos sanguíneos e glândulas (mucosas e granulosas) (BAGNARA, 1986; FROSTMASON et al., 1994; STEBBINS; COHEN, 1995); e o estrato compacto, que contém fibras colágenas frequentemente dispostas em blocos e paralelas à superfície do corpo (FOX, 1994; STEBBINS; COHEN, 1995). Imediatamente abaixo do estrato compacto localiza-se a tela subcutânea, composta de tecido conjuntivo frouxo, onde se situam principalmente os vasos sanguíneos e nervos (PATT; PATT, 1969; FOX, 1994).

A pele dos anfíbios, em geral, é permeável e bastante elástica, oferecendo resistência à tensão mecânica (MANGIONE; GARCIA; CARDOZO, 2011).

Sua grande diversidade de cores se dá pelo diferentes tipos de pigmentos localizados nos cromatóforos. (FERREIRA *et al*, 2006) Essa diferenciação de cores pode ter várias funções, como camuflagem (FRANÇA, 2015), permitindo que fiquem despercebidos aos olhos dos predadores, mimetismo, permitindo copiar a cor e forma de algum animal nocivo ao predador e coloração apossemática, indicando a presença de substâncias tóxicas na pele.

1.1 Glândulas Mucosas e Glândulas de Veneno

Os anfíbios anuros apresentam dois tipos fundamentais de glândulas: as mucosas e as granulosas ou de veneno, ambas encontradas no estrato esponjoso (TOLEDO; JARED, 1995). As glândulas mucosas geralmente são mais numerosas, acinosas e apresentam lumen evidente. Encontra-se distribuída por toda a superfície do corpo e tem como função a secreção de um muco que envolve o corpo do animal. Esse muco mantém a pele constantemente úmida, ajudando na respiração cutânea e a evitar a desidratação (TOLEDO; JARED, 1995; FERREIRA *et al*, 2006; FRANÇA, 2015; MANGIONE; GARCIA; CARDOZO, 2011). As glândulas granulosas constituem-se em estruturas sinciciais secretoras, cujo lumen é completamente preenchido por grânulos. Mais abundantes na região dorsal, são responsáveis pela produção de secreções tóxicas utilizadas na defesa passiva dos anfíbios contra predadores e microrganismos (LUTZ, 1966;

DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1995; FERREIRA *et al*, 2006; FRANÇA, 2015).

Tanto as glândulas mucosas como as granulosas são alveolares e envolvidas por uma camada de células mioepiteliais que auxiliam na liberação do material sintetizado (TOLEDO; JARED, 1995; DELFINO *et al.*, 1998; DELFINO *et al.*, 1999; DELFINO *et al.*, 2006).

1.2 Camada Calcificada

Entre o estrato esponjoso e o estrato compacto de algumas espécies de anuros, observa-se uma camada calcificada, também denominada camada Eberth-Katschenko (ELKAN, 1976, JARED *et al.*, 1995; KATCHBURIAN *et al.*, 2001; FERREIRA *et al*, 2006; MANGIONE; GARCIA; CARDOZO, 2011; MENDES, 2015). Essa camada é formada por depósitos de sais de cálcio além de proteoglicanas e glicosaminoglicanas (JARED & ANTONIAZZI, 1999; KATCHBURIAN *et al.*, 2001). A real função dessa camada ainda é incerta. Acredita-se que possa ser uma barreira que auxilia contra a dessecação, uma reserva de cálcio e fosfato, ou simplesmente uma estrutura que possa proteger os animais contra eventuais predadores (ELKAN, 1968; TOLEDO; JARED, 1993a, b, c; TOLEDO; JARED, 1995; KATCHBURIAN *et al.*, 2001).

1.3 *Corythomantis greeningi*

Corythomantis greeningi (Figura 3) pertence à família Hylidae, normalmente encontrado nas regiões da Caatinga brasileira (KATCHBURIAN *et al*, 2001; MENDES, 2015). Possui dimorfismo sexual bastante evidente. O macho possui diversas espículas córneas, o que o deixa com a pele mais enrugada, enquanto a fêmea possui a pele mais lisa, sem verrugas ou camada córnea desenvolvida (MENDES, 2015). Possui uma cabeça co-ossificada com o crânio, a qual utiliza para tampar a entrada de sua toca ou pequenas frestas para se proteger de predadores e da dessecação, comportamento que é denominado fragmose (Jared *et al*, 2005; MENDES, 2015). Apesar da ideia de que a co-ossificação da cabeça do *C. greeningi* está relacionada à dessecação (Sales-de-Aquino *et al*, 2012; MENDES, 2015), estudos sugerem que essa estrutura craniana tem também

como função proteger o anuro contra predadores, além de estar indiretamente ligada ao equilíbrio de água em seu corpo (Jared et al, 2005).

Figura 3- *Corythomantis greeningi*



Fonte: Carlos Jared.
Indivíduo da espécie *Corythomantis greeningi*

1.4 *Trachycephalus mesophaeus*

Trachycephalus mesophaeus (Figura 4) é uma perereca da família Hylidae. Possui uma coloração que varia de marrom claro até tons de bege, podendo chegar até sete centímetros de comprimento, alimentando-se exclusivamente de insetos. É frequentemente encontrada no interior de bromélias, no alto das árvores (Jared C, comunicação pessoal). Os animais dessa espécie podem ser encontrados nas bordas da Mata Atlântica, desde o Rio Grande do Sul, até Pernambuco (Cunha; Oliveira; Hartmann, 2010; Solé et al, 2010; SANTANA et al, 2016), vivendo próximos a fontes de água (SANTANA et al, 2016). É uma espécie com um alto nível de reprodução, fazendo o uso de poças temporárias ou permanentes para tal. (SANTANA et al, 2016).

Figura 4- *Trachycephalus mesophaeus*



Fonte: Carlos Jared.
Indivíduo da espécie *Trachycephalus mesophaeus*

1.5 Itapotihyla langsdorffii

Itapotihyla langsdorffii (Figura 5) é uma espécie da família Hylidae e única espécie do gênero *Itapotihyla*. É encontrada por quase toda a Mata Atlântica, incluindo nordeste da Argentina e centro e sul do Paraguai (LINGNAU *et al*, 2006; Vrcibradic, Teixeira & Borges-Júnior, 2009; Sales-de-Aquino *et al*, 2012). Possui um dimorfismo sexual bastante evidente. A fêmea é razoavelmente maior do que o macho (Sales-de-Aquino *et al*, 2012), podendo colocar até seis mil ovos durante a época da reprodução (Vrcibradic, Teixeira & Borges-Júnior, 2009). Sua dieta consiste basicamente de ortópteros, como grilos e gafanhotos, mas já foram encontrados restos de pequenos anuros e penas em seu estômago, o que indicia que essa espécie de perereca pode se alimentar de alguns vertebrados (Sales-de-Aquino *et al*, 2012; Vrcibradic, Teixeira & Borges-Júnior, 2009). Assim como *Corythomantis greeningi*, *I. langsdorffii* possui ossos do crânio bastante duros que podem ter a função de tampar a entrada de buracos (Jared *et al*, 2005; Sales-de-Aquino *et al*, 2012), auxiliar o controle de perda de água do corpo, e oferecer proteção contra predadores. O principal meio de defesa da espécie é a secreção de uma substância que pode causar efeitos diversos, desde dores no corpo e lacrimejamento excessivo à dificuldades visuais, caso haja um possível toque da região com veneno aos olhos (Sales-de-Aquino *et al*, 2012).

Figura 5- *Itapotihyla langsdorffii*



Fonte: Carlos Jared.
Indivíduo da espécie *Itapotihyla langsdorffii*

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Estudar a morfologia e morfometria da pele de diferentes pererecas capazes de liberar secreção abundante, *Trachycephalus mesophaeus* e *Corythomantis greeningi*, em comparação com uma espécie de perereca cuja pele não é muito secretora, *Itapotihyla langsdorffii*.

2.2 *Objetivos específicos*

- Obter dados morfológicos da pele que possam estar relacionados com a sua capacidade de secreção;
- Caracterizar morfológicamente as glândulas cutâneas dessas espécies;
- Analisar morfometricamente a espessura da camada mioepitelial das glândulas granulosas;
- Analisar morfometricamente outras características estruturais, como a espessura da camada dérmica calcificada e a quantidade de células pilares longitudinais espalhadas sobre a derme;

3 METODOLOGIA

3.1 *Obtenção e fixação das amostras histológicas*

O presente estudo utilizou três espécimes de *Trachycephalus mesophaeus*, de *Corythomantis greeningi* e de *Itapotihyla langsdorffii*. Os animais foram sacrificados com uma dose letal de 50mg/kg de Tiopental, por via intraperitoneal e fixados em solução de paraformaldeído (4%) em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2 para retirada de amostras de pele da região dorsal do corpo. Em seguida à remoção das amostras, os animais utilizados foram preservados em formalina e encaminhados à coleção herpetológica do Instituto Butantan.

3.2 *Técnica histológica*

Amostras de aproximadamente 1 cm² de pele dorsal foram removidas dos animais e processadas de acordo com o seguinte protocolo (KIERNAN, 2001):

- fixação em paraformaldeído (4%) em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2, de 8 a 10 horas;
- desidratação gradual em etanol: 70%, 95% e 100%
- inclusão orientada em historresina (Leica);

O material incluído em historresina foi cortado em micrótomo nas espessuras de 2 µm, e posteriormente foi corado pelo azul de toluidina-fucsina, para finalmente ser estudado histologicamente.

➤ **Coloração azul de toluidina-fucsina**

- coloração dos cortes em historresina com azul de toluidina por 30 segundos
- lavagem dos cortes com água destilada;
- coloração pela fucsina por 5 segundos;
- lavagem em água corrente;
- secagem da lâmina em chapa aquecida;
- montagem da lâmina com Entellan®.

Essa coloração é utilizada para visualizações morfológicas gerais dos tecidos incluídos em historresina. O azul de toluidina cora os componentes basofílicos em azul e a fucsina cora o citoplasma em magenta.

Os cortes histológicos foram realizados de forma semiseriada, descartando-se 10 cortes entre os cortes colhidos. Para cada amostra, foram realizadas três lâminas histológicas, onde três cortes foram analisados aleatoriamente.

3.3 Fotomicrografias

As imagens foram obtidas no microscópio de luz Olympus BX51, equipado com uma câmera digital e um software (Olympus Cellsens 1.17) para captura e análise de imagem.

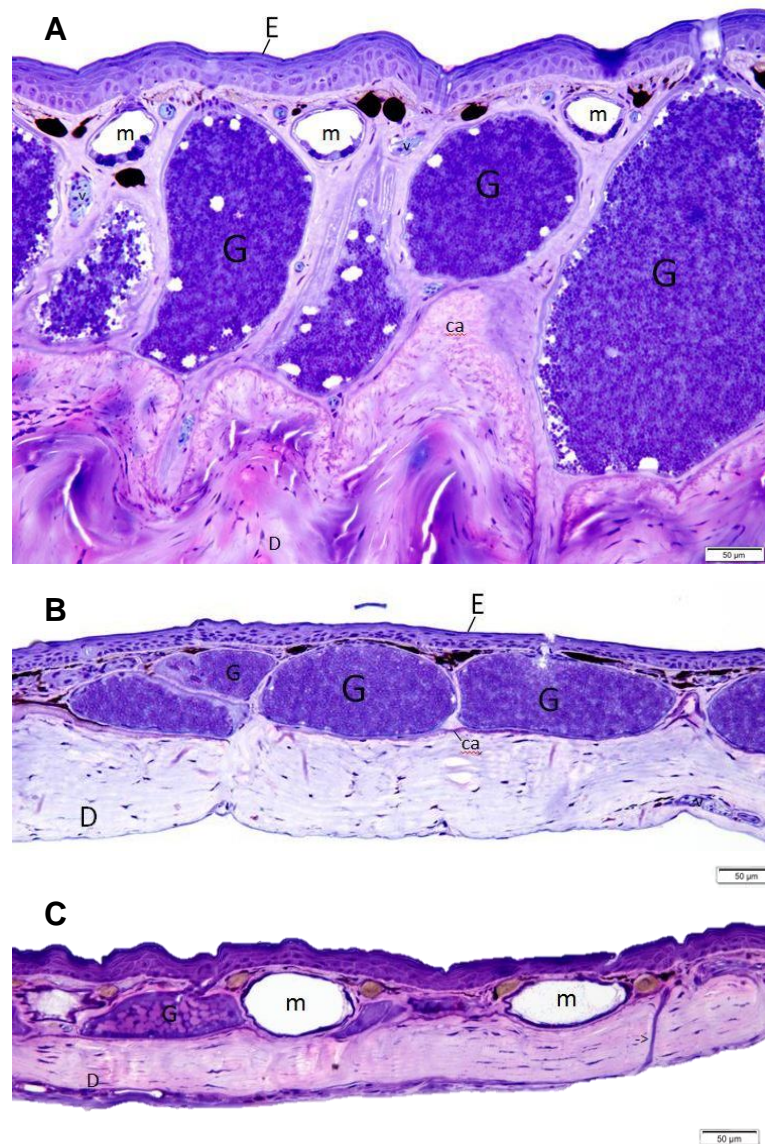
3.4 Análises estatísticas

Medidas de cada corte foram realizadas em triplicata e as médias calculadas foram então usadas como valores representativos. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA one-way. As diferenças de resultados foram consideradas estatisticamente significantes quando $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Externamente a pele dorsal das três espécies, é uma estrutura irregular, abundante em verrugas que dão à pele um aspecto espinhoso e áspero. Histologicamente o tegumento dorsal é formado por cerca de seis camadas celulares. A derme é dividida em estrato esponjoso, onde são observadas glândulas mucosas e granulosas, e estrato compacto, composto principalmente fibras de colágeno que se dispõem longitudinalmente (Figura 6).

Figura 6- Histologia da pele dorsal

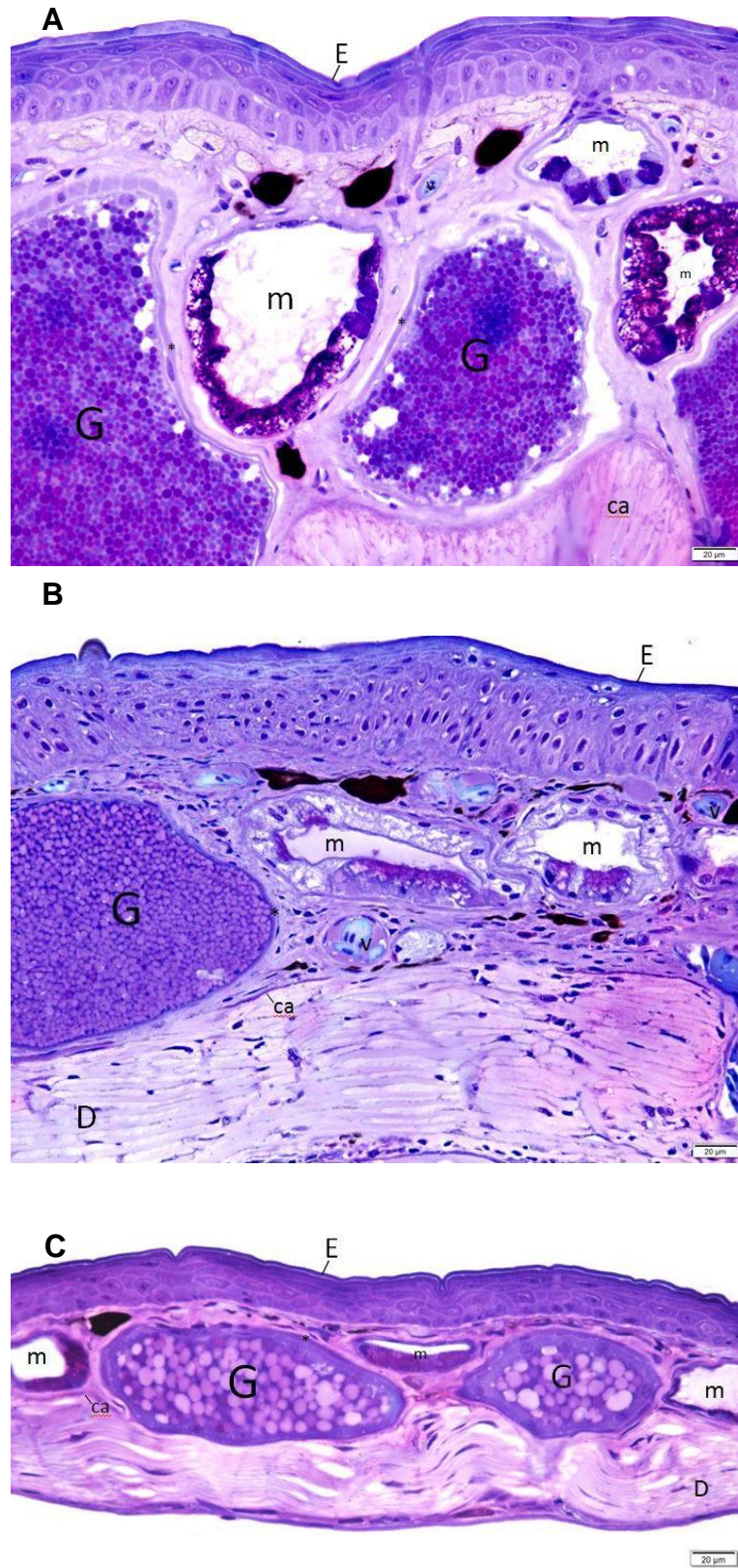


Fonte: próprio autor.

(imagem A) Morfologia geral da pele de *T. mesophaeus*. (imagem B) Morfologia geral da pele de *C. greeningi*. (imagem C) Morfologia geral da pele de *I. langsdorffii*. (E) epiderme, (G) glândula granulosa, (m) glândula mucosa, (ca) camada calcificada, (D) derme, (seta) células pilares, (v) vasos sanguíneos.

As glândulas mucosas estão dispostas logo abaixo da epiderme, são menores que as granulosas, possuem lumen e não são sinciciais. As glândulas granulosas não possuem lumen, são sinciciais e se apresentam totalmente preenchidas por grânulos esféricos. Ambos os tipos glandulares são envolvidos por uma monocamada de células mioepiteliais, que é mais desenvolvida nas glândulas granulosas e se conectam com o exterior através de dutos epidérmicos por onde a secreção é liberada na superfície corporal.

Figura 7- Aspecto das glândulas cutâneas

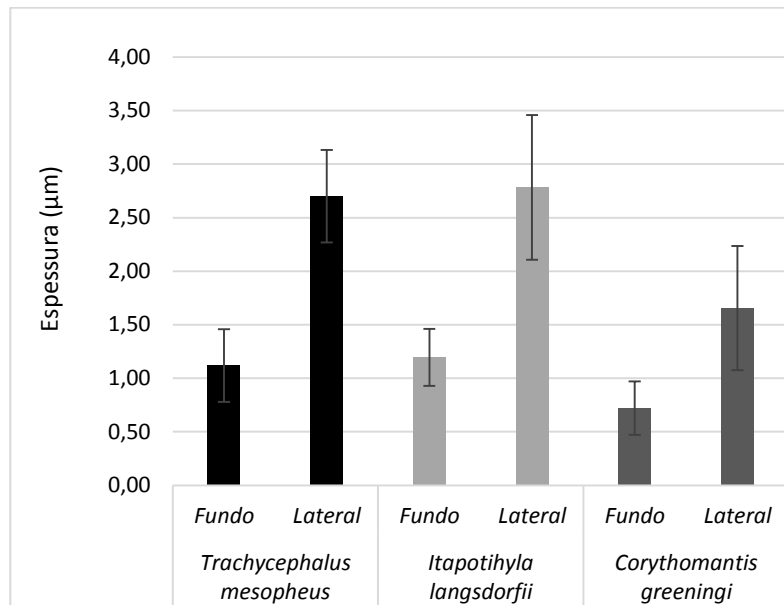


Fonte: próprio autor.

(imagem A) *T. mesophaeus*. (imagem B) *C. greeningi*. (imagem C) *I. langsdorffii*. (E) epiderme, (G) glândula granulosa, (m) glândula mucosa, (ca) camada calcificada, (*) camada mioepitelial, (D) derme, (v) vasos sanguíneos.

Com relação à camada mioepitelial, não houve diferença significativa na espessura da camada entre as espécies. Porém, na espécie *Corythomantis greeningi* essa camada apresentou ser um pouco mais fina do que nas demais espécies (Figura 8).

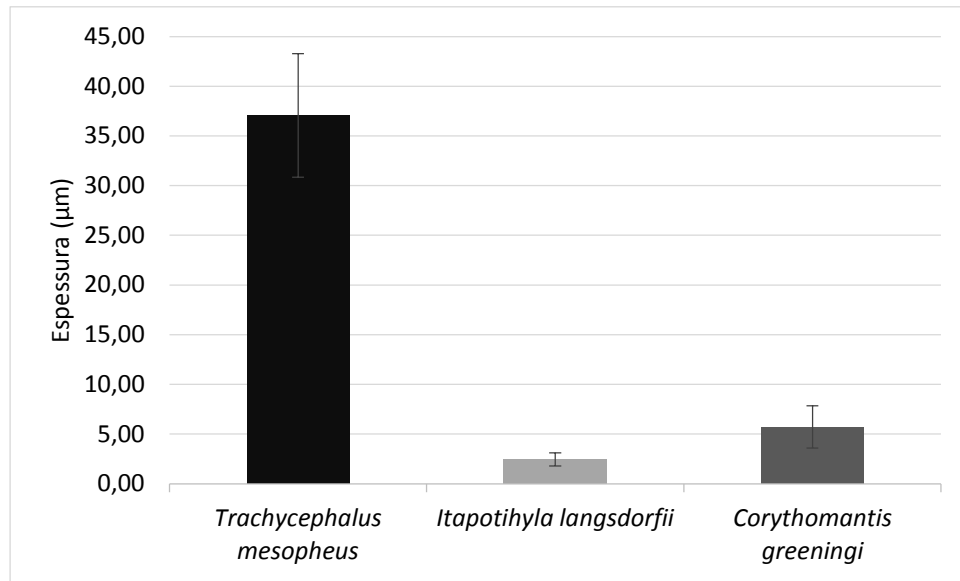
Figura 8- Espessura da camada mioepitelial



Fonte: próprio autor.

Comparação da espessura da camada mioepitelial entre as três espécies estudadas.

Entre o estrato esponjoso e compacto da derme existe uma camada formada por depósitos de cálcio, chamada de camada calcificada. Essa camada apresentou ser bem mais espessa na espécie *Trachycephalus mesophaeus*, enquanto na espécie *Itapotihyla langsdorffii*, apresentou-se bem mais delgada (Figura 9).

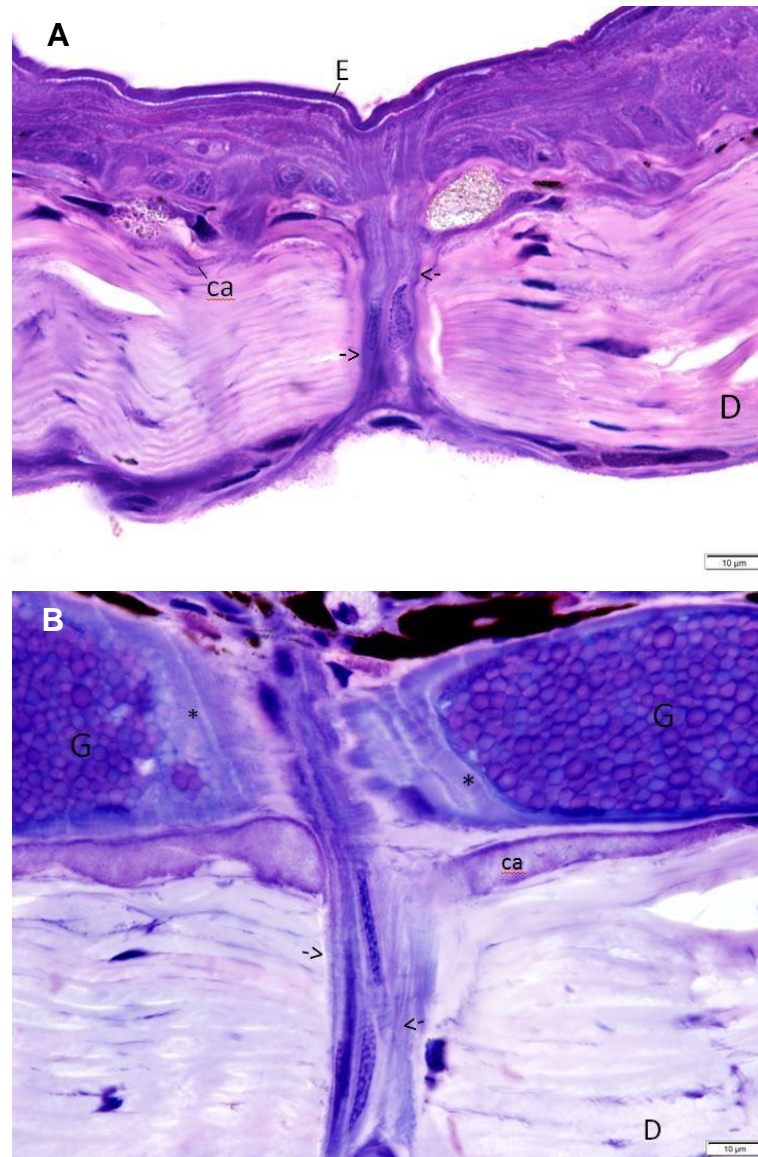
Figura 9- Espessura camada calcificada

Fonte: próprio autor.

Comparação da espessura da camada calcificada entre as três espécies estudadas.

Foi também possível observar em *Itapotihyla langsdorffii* e *Corythomantis greeningi* a presença de células pilares em grande número. Essas células formam longas fibras que atravessam toda a altura da pele, sendo muito finas e contendo um núcleo fusiforme muito alongado. Pelas suas características morfológicas, são provavelmente de origem mioepitelial, partindo da tela subcutânea, e fixando-se na camada mais basal da epiderme. Em *Trachycephalus mesophaeus*, essas células são praticamente inexistentes.

Figura 10- Aspecto das células pilares



Fonte: próprio autor.

(imagem A) *I. langsdorffii*. (imagem B) *C. greeningi*. (E) epiderme, (G) glândula granulosa, (ca) camada calcificada, (*) camada mioepitelial, (D) derme, (seta) células pilares.

5 DISCUSSÃO

A análise por microscopia de luz evidenciou que a pele e as glândulas cutâneas seguem o padrão básico já descrito para várias outras espécies de anfíbios anuros (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1995; STEBBINS; COHEN, 1995).

Qualitativamente observamos que a pele dorsal de *Trachycephalus mesophaeus* é bem mais espessa e abriga uma maior quantidade de glândulas cutâneas, principalmente granulosas, quando comparada às demais espécies estudadas. As glândulas granulosas dos anfíbios são normalmente responsáveis pela produção de substâncias tóxicas e/ou impalatáveis (TOLEDO; JARED, 1995; MELZER et al., 2013).

As células mioepiteliais, que envolvem totalmente as glândulas granulosas, têm sido associadas com o processo de extrusão da secreção glandular (HOLMES; BALLS, 1978; DELFINO, 1991). A espessura da camada mioepitelial entre as espécies estudadas não diferiu estatisticamente. Assim, surpreendentemente, *Trachycephalus mesophaeus* e *Corythomantis greeningi*, espécies extremamente secretoras, comparadas a *Itapotihyla langsdorffii*, que não secreta tanto pela pele, apresentaram camadas mioepiteliais com espessuras semelhantes. Esse resultado aparentemente contradiz o que era inicialmente esperado. Partia-se do pressuposto de que essas espécies que secretam muito apresentariam camadas mioepiteliais muito mais espessas do que a espécie que é menos secretora. No entanto, um estudo mais aprofundado das camadas mioepiteliais deveria levar em conta a análise da inervação no entorno das glândulas, de modo a melhor compreender como o estímulo nervoso atua sobre a contração das células mioepiteliais, o que poderia indicar a real relevância do seu papel na liberação da secreção cutânea em cada espécie estudada.

Além de glândulas, na pele dos anuros existe uma estrutura comumente encontrada denominada camada calcificada ou camada de Eberth-Kastschenko. Essa camada já foi bem caracterizada química e morfológicamente em trabalhos anteriores (JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001). No entanto, a função da camada calcificada ainda não é bem compreendida (TOLEDO; JARED, 1993c; JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001). Alguns autores relacionam essa estrutura à economia hídrica (ELKAN, 1968; TOLEDO; JARED, 1995) e/ou a uma

reserva natural de cálcio do organismo (TOLEDO; JARED, 1993c; JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001; NAVAS et al., 2004). Acresce ainda o fato de várias espécies de anuros não apresentarem camada calcificada, fenômeno ainda não bem explicado, mas que provavelmente está relacionado com a origem filogenética de cada espécie. No presente trabalho, as três espécies estudadas apresentaram essa camada, sendo aquela presente em *Trachycephalus mesophaeus* a mais espessa quando comparada com a de *Itapotihyla langsdorffii*, que é visivelmente a mais delgada das três espécies. Supomos que essa camada, dependendo da sua espessura e do sua forma, pode fornecer à pele diferentes níveis de dureza e flexibilidade, o que poderia ter papel no momento da expulsão da secreção do interior das glândulas cutâneas.

Em relação às células pilares, elas são quase inexistentes em *Trachycephalus mesophaeus* enquanto que em *Itapotihyla langsdorffii* e em *Corythomantis greeningi*, elas são bem evidentes e numerosas. Essas células, embora frequentemente presentes na pele de muitos anuros, foram até o momento relegadas ao esquecimento, e não existe na literatura nenhum trabalho a seu respeito. Pelas observações já realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, parecem, por sua morfologia, ser de origem mioepitelial e devem fornecer melhor sustentação para a pele dos animais. Caso sejam de fato de origem mioepitelial, quando contraídas, poderiam exercer um importante papel na compressão e expulsão do conteúdo das glândulas cutâneas.

Diante desse quadro, é possível que o fato de uma espécie ser mais secretora que outra não seja somente ligado às suas características morfológicas, mas também a características filogenéticas e fisiológicas, além das comportamentais, que poderiam exercer papéis tão ou mais importantes do que a unicamente a estrutura. Assim, o mais provável seria que esses vários fatores atuassem de formas combinadas e variadas em cada espécie, liberando quantidades maiores ou menores de secreção cutânea em situações estressantes.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Em todas as espécies, a camada mioepitelial não apresentou diferenças significativas conforme o esperado.
- ✓ As células pilares são aparentemente mais numerosas e espessas em *I. langsdorffii*, que é a espécie menos secretora, enquanto em *T. mesophaeus* essas células são praticamente inexistentes.
- ✓ *T. mesophaeus* mostra a camada dérmica calcificada mais espessa, enquanto em *I. langsdorffii* essa camada é muito fina.
- ✓ Nossos resultados podem constituir uma evidência de que, diferentemente do esperado, a espessura dos mioepitélios pode não exercer influência significativa no controle da liberação de secreção cutânea.
- ✓ *T. mesophaeus*, espécie aparentemente privada de células pilares, é exatamente aquela em que a camada dérmica calcificada mais espessa foi encontrada. Essa correlação inversa interessante merece uma melhor investigação sobre a real influência de características estruturais na liberação de secreção cutânea.
- ✓ Outros fatores fisiológicos, como controle hormonal/neural sobre características contráteis da pele e musculatura subcutânea, poderiam exercer papéis mais importantes na liberação imediata da secreção da pele em situações estressantes do que apenas a estrutura.
- ✓ É possível que fatores morfológicos, filogenéticos e fisiológicos, além dos comportamentais, atuem de formas combinadas e variadas em cada espécie, liberando quantidades maiores ou menores de secreção cutânea em situações estressantes.

REFERÊNCIAS¹

AMPHIBIAWEB. Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org>> Acesso em: 05 nov. 2019.

BAGNARA, J. T. **Pigment cells In: Biology of the Integument**. Vol.2 - Vertebrates. Edit by Bereiter-Hahn, J; Matoltsy, A. G; Richards, K. S; Springer, Berlin, 1986, p.137-149.

BENTLEY, P. J. Adaptations of amphibia to arids environments. **Science**, v. 152, p. 619-623, 1966.

BRITO-GITIRANA, L; AZEVEDO, R. A. Morphology of Bufo ictericus integument (Amphibia, Bufonidae). **Micron**, v. 36, p. 532–538, 2005.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretion, their normal functioning and potencial medical applications. **Rev. Biol.**, v. 72, p. 365-370, 1997.

CUNHA, A. K.; Oliveira, I. S.; Hartmann, M. T. Anurofauna da Colônia Castelhanos, na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, Serra do Mar paranaense, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 2, p. 123-134, abr. 2010. ISSN 2175-7925.

DELFINO, G.; AMERINI, S.; MUGELLI, A. In vitro studies on the venom emission from the skin of Bombina variegata pachypus (Bonaparte) (Amphibia, Anura, Discoglossidae). **Cel. Biol. Int. Rep**, v. 6, n. 9, p. 843-850, 1982.

DELFINO G. Ultrastructural aspects of venom secretion in anuran cutaneous glands. In: TU AT, DEKKER, M (eds). **Reptile Venoms and Toxins. Handbook of Natural Toxins**. New York: Marcel Dekker Inc. 1991. p. 777-802.

DELFINO, G; BRIZZI, R; ALVAREZ, B. B; KRACKE-BERNDORFF, R. Serous cutaneous glands in Phyllomedusa hypohondrialis (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis. **Tiss. Cell**, v. 30, n. 1, p. 30-40, 1998.

DELFINO, G; BRIZZI, R; ALVAREZ, B. B; TADDEI, L. Secretory polymorphism and serous cutaneous gland heterogeneity in Bufo granulosus. **Toxicon**, v. 37, p. 1281- 1296, 1999.

DELFINO, G; DREWES, R. C; MAGHERINI, S; MALENTACCHI, NOSI, D; TERRENI, A. Serous cutaneous glands of the Pacific tree-frog Hyla regilla (Anura, Hylidae): Patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. **Tiss. Cell**, v. 38, p. 65-77, 2006.

DUELLEMAN, W. E; TRUEB, L. **The Biology of Amphibians**. MacGraw-Hill Book Company, New York, 1986. DUELLEMAN, W. E; TRUEB, L. The Biology of Amphibians. MacGraw-Hill Book Company, New York, 1986.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **The biology of amphibians**. New York: MacGraw – Hill, 1996.

ELKAN, E. Mucopolysaccharides in the anuran defence against desiccation. **J. Zool. London**, v. 155, n. 1, p. 9-53, 1968.

ELKAN, E. Ground substance: anuran defence against desiccation. In: LOFTS, B. **Physiology of the Amphibia**. New York: Academic Press, 1976.

FELSEMBURGH, F. A; ALMEIDA, P. G; CARVALHO-E-SILVA, S. P; BRITOGITIRANA, L. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. **Micron**, v. 40, p. 198-205, 2009.

FERREIRA, D.S.; JÚNIOR, P.E.A.; MAIA, C.S.; SILVA, W.E.; FRANÇA, D.F.; MORAES, E.F.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C. Caracterização histológica da pele da rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). **Biológico**, São Paulo, v.68, Suplemento, p.239-243, 2006

FOX, H. Epidermis In: **Biology of the Integument**, In: Vertebrates. Edit by BereiterHahn, J.; Matoltsy, A.G.; Richards, K.S. Springer, Berlin, 1986, p. 78-135.

FOX, H. The structure of integument, In: **Amphibian Biology - The integument**. Edit by Harold Heatwole Surrey Beatty Sons, Austrália, 1994, p. 1-32.

FRANÇA, J. M. da S. **A composição do veneno do sapo-cururuzinho muda de acordo com a sua dieta?**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/mg, 59 f. 2015. Disponível em: <<https://www.unifalmg.edu.br/ppgca/system/files/imce/Defesa/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Juceli%20Franca.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (15/12/2019). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA, 2019.

FROST-MASON, S; MORRISON, R; MASON, K. Pigmentation, In: **Amphibian Biology - The integument**. Edit by Harold Heatwole Surrey Beatty Sons, Austrália, 1994, p. 64-97.

HOLMES, C.; BALLS, M. In vitro studies on the control of myoepithelial cell contraction in the granular glands of *Xenopus laevis* skin. **Gen. Comp. Endocrinol**, n. 36, n. 2, p. 255-263, 1978.

JARED, C; TOLEDO, R. C; ANTONIAZZI, M. M. A. histological study of the integument of *Corythomantis greeningi* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 55, n. 3, p. 509-515, 1995.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M; KATCHBURIAN, E; TOLEDO, R. C; FREYMULLER, E. Some aspects of the natural history of the casque-head tree frog *Corythomantis greeningi* Boulenger (Hylidae). **Anal. Scienc. Natur.**, v. 3, p. 105-115, 1999.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M; NAVAS, C. A; KATCHBURIAN, E; FREYMULLER, E; TAMBOURGI, D. V; RODRÍGUEZ, M. T. Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-dead tree frog *Corythomantis greeningi*. **J. Zool. Lond.**, v. 265, p. 1-8, 2005.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M; JORDÃO, A. E. C; SILVA, J. R. M. C; GREVEN, H. & RODRIGUES, M. T. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, v. 54, p. 197-207, 2009.

KATCHBURIAN, E.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; FARIA, F. P.; SOUZA SANTOS, H.; FREYMULLER, E. Mineralized dermal layer of the Brazilian tree-frog *Corythomantis greeningi*. **J. Morphol**, v. 28, n. 1, p. 56-63, 2001.

LINGNAU, R.; ZANK, C.; COLOMBO, P.; VINCIPROVA G. Amphibia Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii*: distribution extension. **Check List**, [S.I.], v. 2, n. 1, p. 38-39, may 2006. ISSN 1809-127X.

LUTZ, B. Biological significance of cutaneous secretions in toads and frogs. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 33, p. 55-59, 1966.

MAILHO-FONTANA, P. L. **Estudo morfológico comparativo do sistema de defesa química cutânea em duas espécies de sapos amazônicos (*Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*)**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Toxinologia, Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

MANGIONE, S.; GARCIA, G.; CARDOZO, O. M. The Eberth–Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). **Acta Zoologica**. 92. 21 – 26, 2010.

MELZER, S; CLERENS, S; BISHOP, P. J. Skin gland morphology and secretory peptides in naturalized *Litoria* species in New Zealand. **J. Herpt.**, v. 47, n. 4, p. 565– 574, 2013.

MENDES, V. A. **A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo integrativo**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Toxinologia, Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

NOSI, D; TERRENI, A; ALVAREZ, B. B; DELFINO, G. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Anura: Hylidae): Response by different gland types to norepinephrine stimulation. **Zoomorphology**, v. 121, n. 3, p. 139-148, 2002.

PATT, D. I.; PATT, G. R. **Comparative vertebrate histology**. New York: Harper and Row; 1969.

POUGH, F. H; ANDREWS, R. M; CADLE, J. E; CRUMP, M. L; SAVITZKY, A. H; WELLS, K. D. **Herpetology**. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.

RETALLACK, G. J. Woodland hypothesis for Devonian tetrapod evolution. **J. Geol.**, v. 119, n. 3, p. 235-258, 2011.

ROTA, E.; TANTERI, G.; MONTORI, G.; GIACHI, F.; DELFINO, G.; SEVER, D. Skin of the red eye tree frog *Agalychnis callidryas* (hylidae, Phyllomedusinae) contains lipid glands of the type described in the genus *Phyllomedusa*: lipid cutaneous glands in *agalychnis callidryas*. **The Anatomical Record**, 2016.

SALES-DE-AQUINO, D. C. P.; JALORETTO, I.; LANTYER-SILVA, A. S. F. & SOLÉ, M. Predation of *Aparasphenodon arapapa* (Hylidae) by *Itapotihyla langsdorffii* (Hylidae). **Herpetology Notes**. 5. 437-438.

SANTANA, D. O.; ALMEIDA, R. P. S.; CALDAS, F. L. S.; DIAS, E. J. R.; FARIA, R. G. (2016). New records of *Trachycephalus mesophaeus* (Hensel, 1867) (Anura: Hylidae) from Atlantic Forest in Sergipe state, Brazil. **Herpetology Notes**. 9. 255-260.

SOLÉ, M.; MARCIANO-JR, E.; DIAS, I. R. KWET, A. Predation Attempts on *Trachycephalus Cf. Mesophaeus* (Hylidae) by *Leptophis Ahaetulla* (Colubridae) and *Ceratophrys Aurita* (Ceratophryidae). **Salamandra** 46(2): 101–103, 2010.

STEBBINS, R. C; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. Princeton University Press, New Jersey. p. 332, 1995.

TOLEDO, R. C; JARED, C. The calcified dermal layer in anurans. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 104, p. 443-448, 1993a.

TOLEDO, R. C; JARED, C. A contribution to the study of the cutaneous calcified layer in the anurans. **Rev. Bras. Biol.** v. 53, p. 619-624, 1993b.

TOLEDO, R. C; JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 105A, p. 593-608, 1993c.

TOLEDO, R. C; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibians venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 111, n. 1, 1-29, 1995.

TRACY, C. R; CHRISTIAN, K. A; TRACY, R. Not just small, wet, and cold: effects of body size and skin resistance on thermoregulation and arboreality of frogs. **Ecology**, v. 91, n. 5, p. 1477–1484, 2010.

VRCIBRADIC, D.; TEIXEIRA, R. L.; BORGES-JÚNIOR, V. N.T. Sexual dimorphism, reproduction and diet of the casque-headed treefrog *Itapotihyla langsdorffii* (Hylidae: Lophiohylini), **Journal of Natural History**, 43:35-36, 2245-2256, 2009

WARBURG, M. R. **Ecophysiology of amphibians inhabiting xeric environments**. Springer-Verlag, Berlin, 1997.

ZARDOYA, R; MEYER, A. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. **PNAS**, v. 98, p. 7380-7383, 2001.

ZUG, G. R. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press Inc; San Diego. 1993.

ANEXO(S)

Encontram-se abaixo relacionadas os dados brutos utilizados para elaboração dos gráficos:

Corythomantis greeningi

MEDIDAS POR GLÂNDULA (em μm)					
lâmina	glândula	embaixo	esquerda	direita	lateral (esquerda+direita)
9089 <i>Corythomantis greeningi</i>	1	1,00	2,57	2,35	
	2	0,82	1,75	1,79	
	3	0,94	1,19	2,28	
	média	0,92	1,84	2,14	1,99

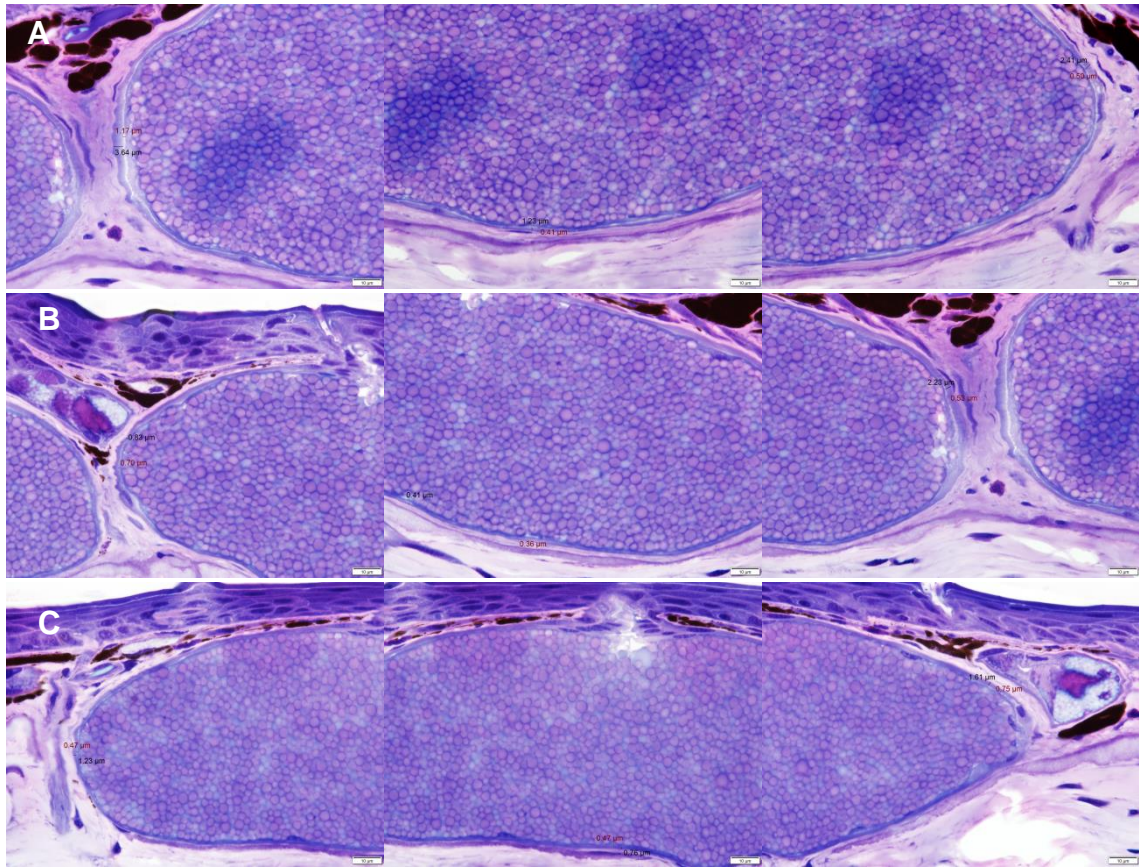
259 <i>Corythomantis greeningi</i>	1	1,23	3,64	2,41	
	2	0,41	0,83	2,23	
	3	0,76	1,23	1,61	
	média	0,80	1,90	2,08	1,99

260 <i>Corythomantis greeningi</i>	1	0,32	0,68	1,03	
	2	0,53	1,04	0,82	
	3	0,47	0,88	1,47	
	média	0,44	0,87	1,11	0,99

	base	lateral
media geral	0,72	1,66
desvio padrão	0,25	0,58

CAMADA CALCIFICADA (em μm)				
lâmina	Início	Meio	Final	media
259	6,63	7,47	3,75	5,95
260	3,09	2,93	4,41	3,48
9089	6,87	7,14	9,15	7,72

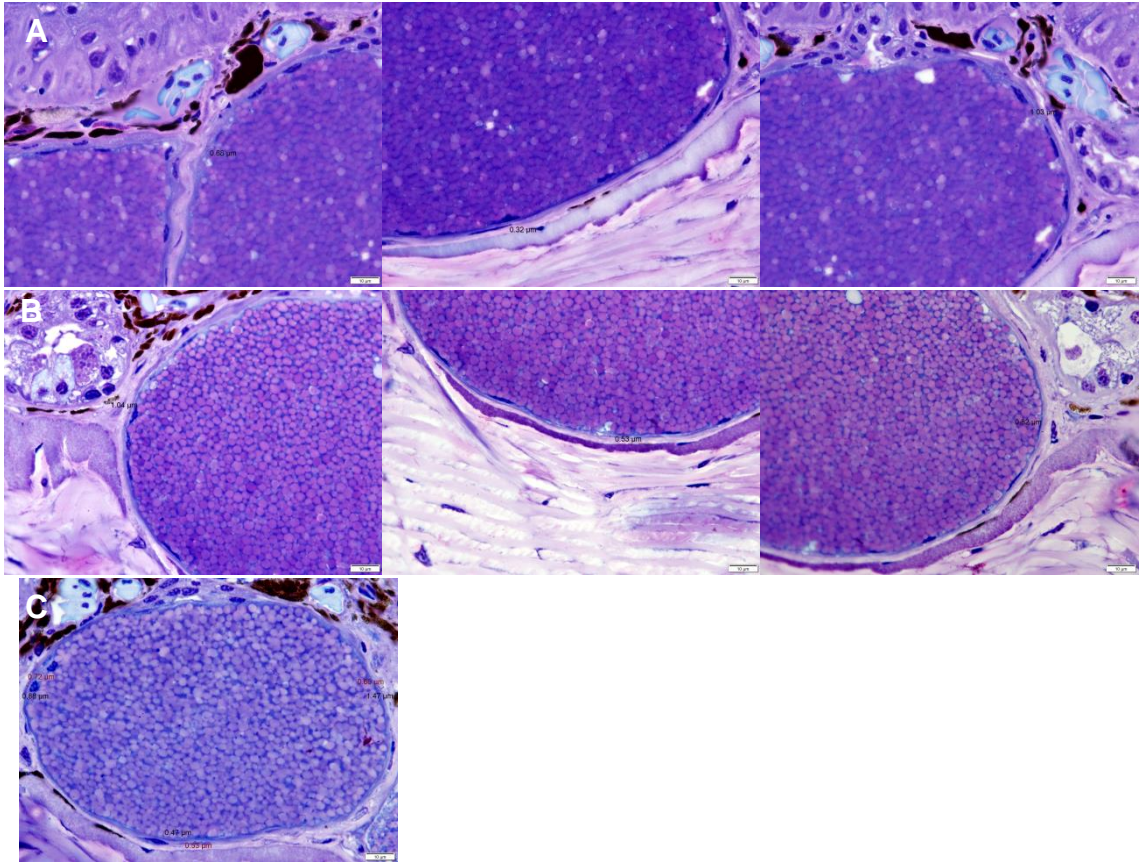
Figura 11- *Corythomantis greeningi*: Lâmina 259



Fonte: próprio autor.

(imagem A) *glândula 1*. (imagem B) *glândula 2*. (imagem C) *glândula 3*.

Figura 12- *Corythomantis greeningi*: Lâmina 260

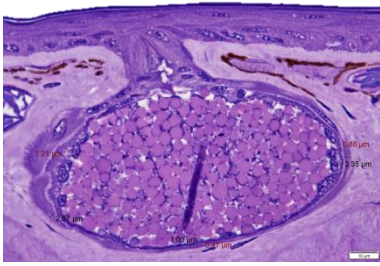


Fonte: próprio autor.

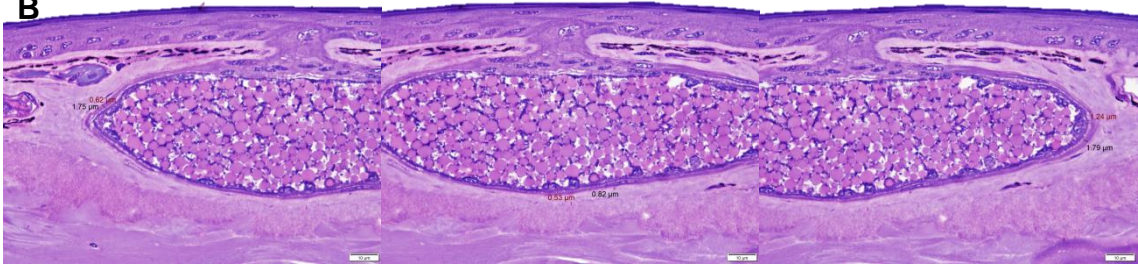
(imagem A) *glândula 1*. (imagem B) *glândula 2*. (imagem C) *glândula 3*.

Figura 13- *Corythomantis greeningi*: Lâmina 9089

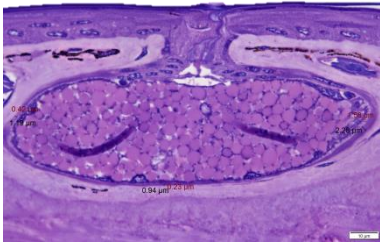
A



B

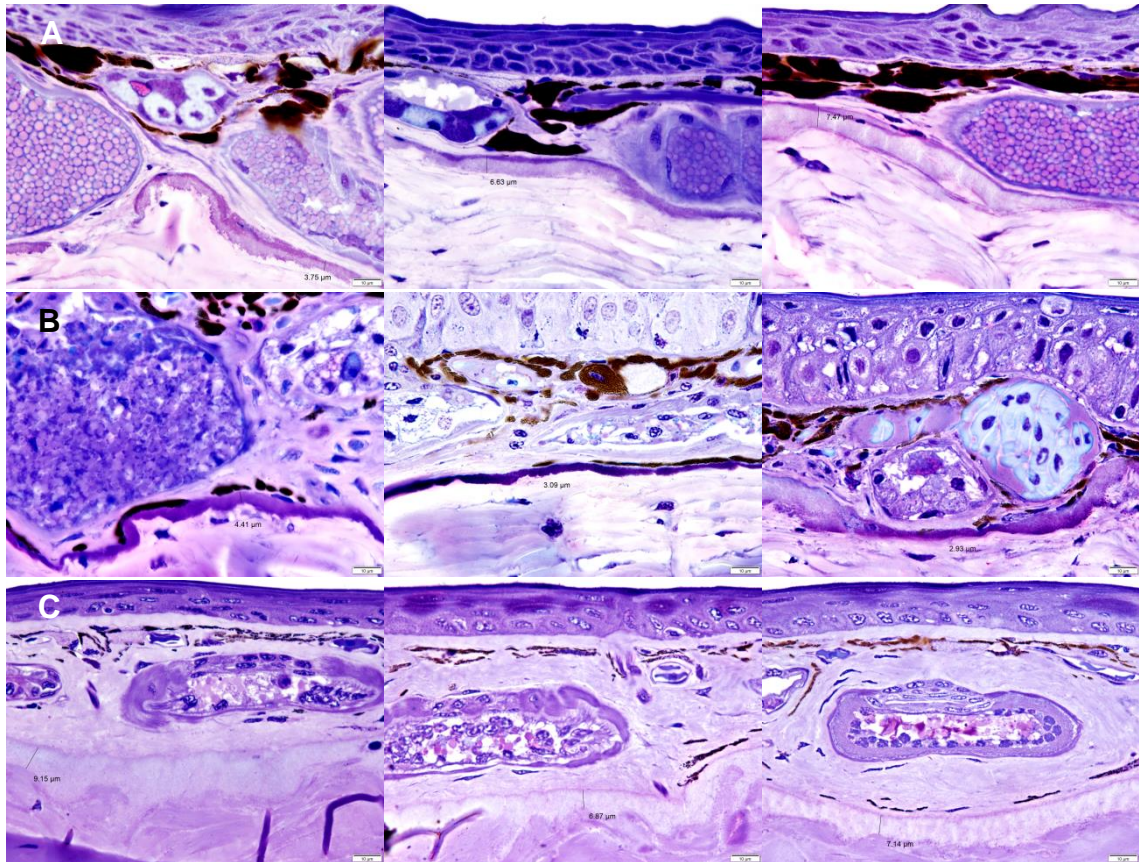


C



Fonte: próprio autor.
(imagem A) glândula 1. (imagem B) glândula 2. (imagem C) glândula 3.

Figura 14- *Corythomantis greeningi*: camada calcificada



Fonte: próprio autor.

(imagem A) lâmina 259. (imagem B) lâmina 260. (imagem C) lâmina 9089.

Trachycephalus mesophaeus

MEDIDAS POR GLÂNDULA (em μm)					
lâmina	glândula	embaixo	esquerda	direita	lateral (esquerda+direita)
10015 <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	1	1,07	2,66	1,76	
	2	0,53	3,08	2,10	
	3	0,82	2,69	2,77	
	média	0,81	2,81	2,21	2,51

283 <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	1	1,81	2,59	2,73	
	2	0,82	4,40	3,87	
	3	0,58	2,65	2,93	
	média	1,07	3,21	3,18	3,20

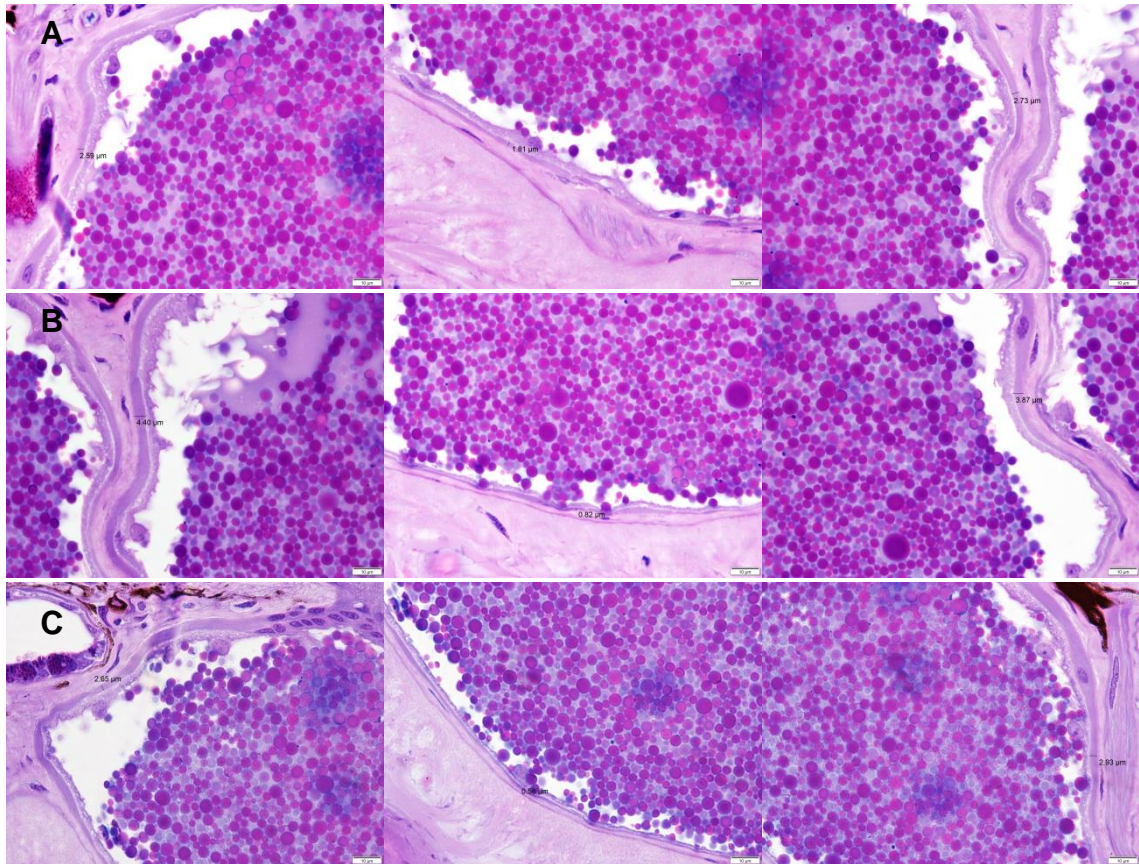
285 <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	1	2,12	3,92	2,17	
	2	1,09	2,12	2,43	
	3	1,23	1,71	2,02	
	média	1,48	2,58	2,21	2,40

	base	lateral
media geral	1,12	2,70
desvio padrão	0,34	0,43



CAMADA CALCIFICADA (em μm)				
lâmina	Início	Meio	Final	media
283	29,94	28,88	53,57	37,46
285	48,80	37,94	42,48	43,07
10015	46,20	20,01	25,73	30,65

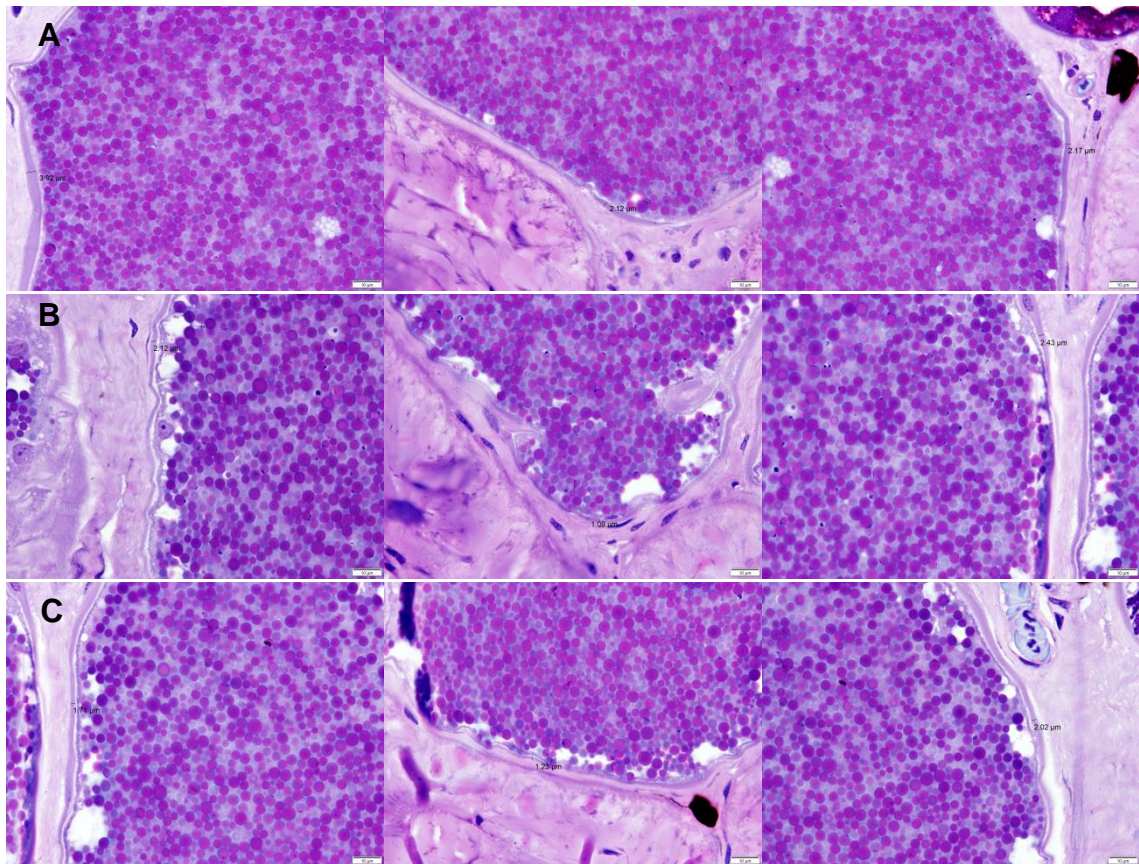
Figura 15- *Trachycephalus mesophaeus*: Lâmina 283



Fonte: próprio autor.

(imagem A) *glândula 1*. (imagem B) *glândula 2*. (imagem C) *glândula 3*.

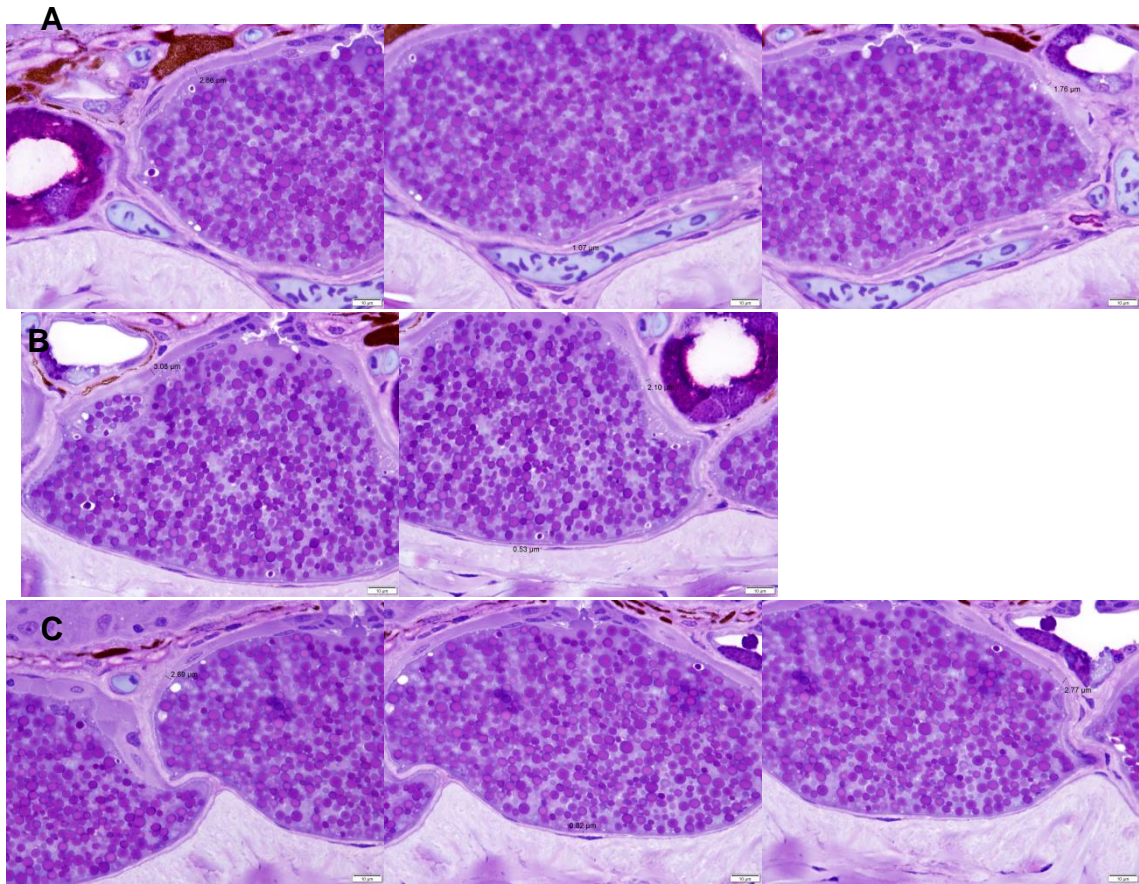
Figura 16- *Trachycephalus mesophaeus*: Lâmina 285



Fonte: próprio autor.

(imagem A) *glândula 1*. (imagem B) *glândula 2*. (imagem C) *glândula 3*.

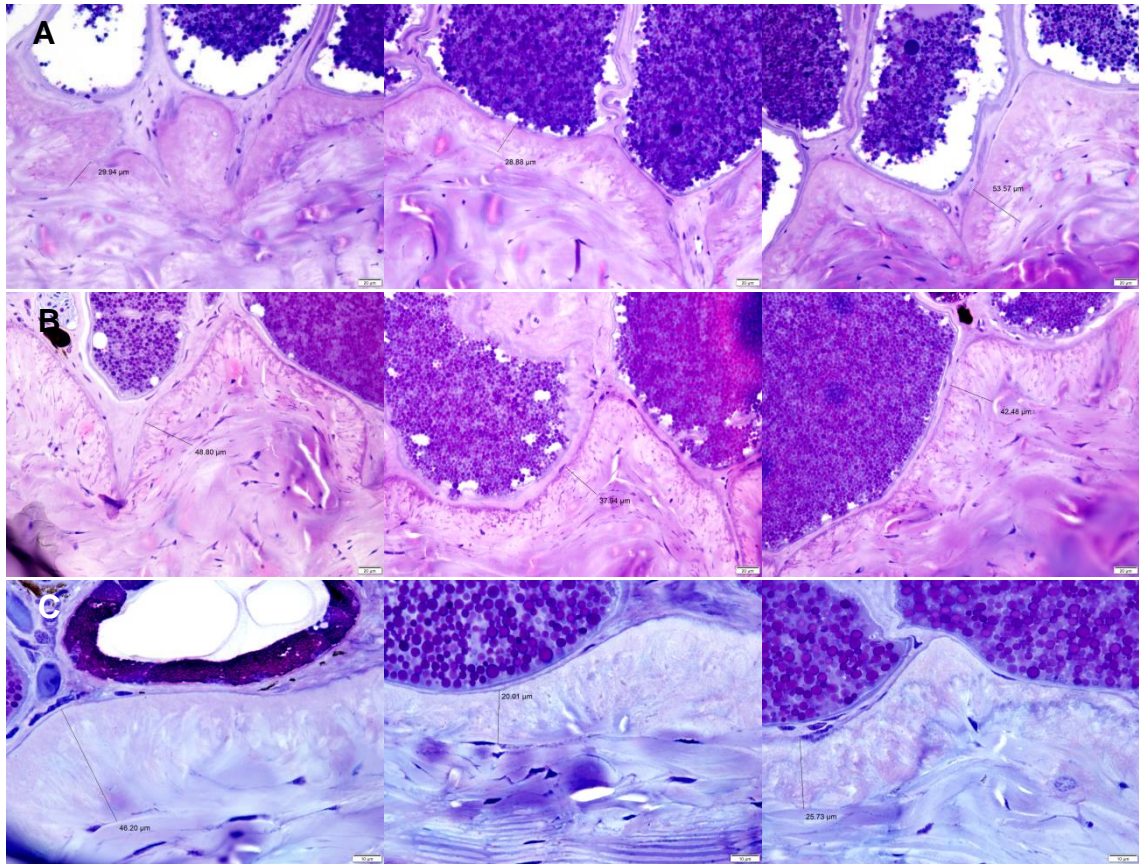
Figura 17- *Trachycephalus mesophaeus*: Lâmina 10015



Fonte: próprio autor.

(imagem A) glândula 1. (imagem B) glândula 2. (imagem C) glândula 3.

Figura 18- *Trachycephalus mesophaeus*: camada calcificada



Fonte: próprio autor.

(imagem A) *lâmina* 283. (imagem B) *lâmina* 285. (imagem C) *lâmina* 10015.

Itapotihyla langsdorffii

MEDIDAS POR GLÂNDULA (em μm)					
lâmina	glândula	embaixo	esquerda	direita	lateral (esquerda+direita)
272 <i>Itapotihyla langsdorffii</i>	1	0,88	3,48	3,01	
	2	1,64	1,37	2,88	
	3	1,24	2,17	2,00	
	média	1,25	2,34	2,63	2,49

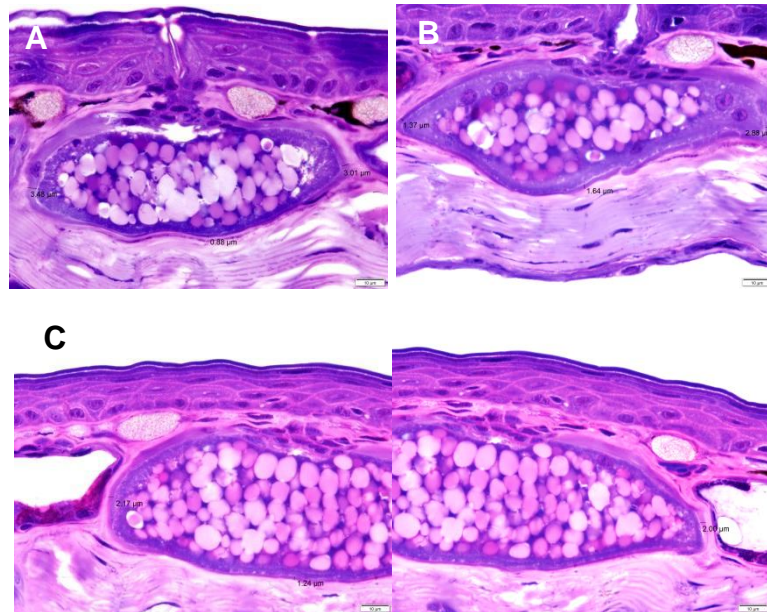
275 <i>Itapotihyla langsdorffii</i>	1	1,52	3,60	3,33	
	2	1,00	3,42	4,17	
	3	1,76	2,82	4,00	
	média	1,43	3,28	3,83	3,56

276 <i>Itapotihyla langsdorffii</i>	1	1,41	3,06	3,03	
	2	0,70	2,82	1,55	
	3	0,60	1,94	1,45	
	média	0,90	2,61	2,01	2,31

	base	lateral
media geral	1,19	2,78
desvio		
padrão	0,27	0,68

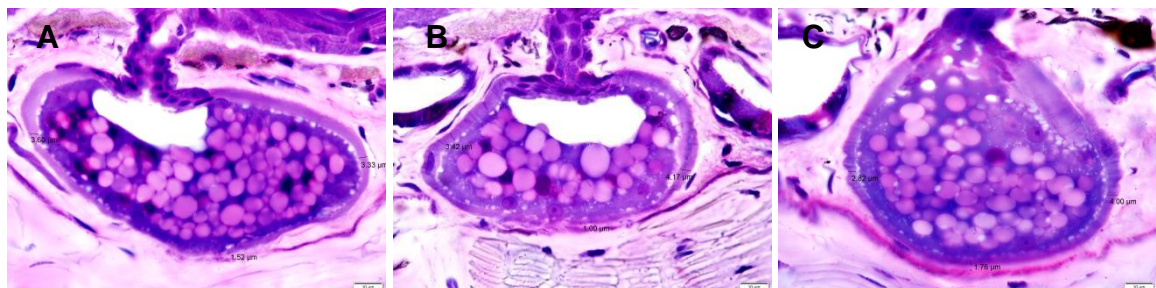
CAMADA CALCIFICADA (em μm)				
Lâmina	Início	Meio	Final	media
272	1,82	2,70	1,42	1,98
275	2,41	1,70	2,31	2,14
276	2,16	4,33	3,12	3,20

Figura 20- *Itapotihyla langsdorffii*: Lâmina 272



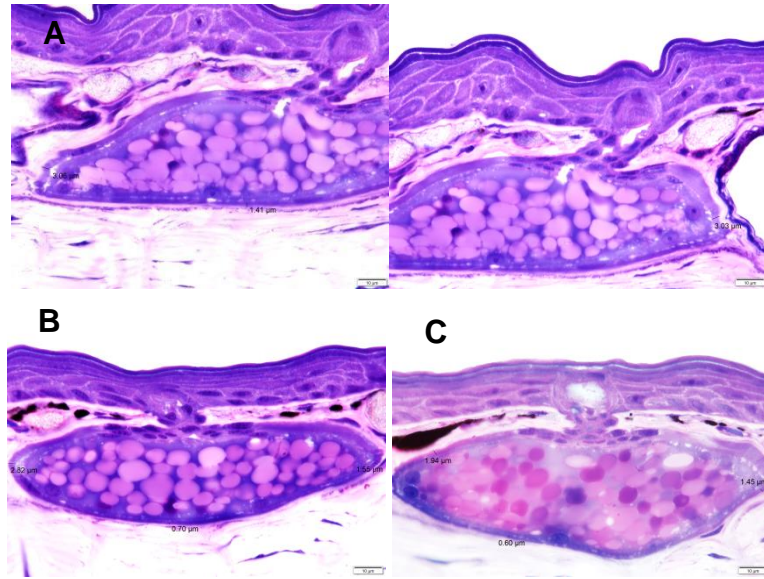
Fonte: próprio autor.
(imagem A) *glândula 1*. (imagem B) *glândula 2*. (imagem C) *glândula 3*.

Figura 21- *Itapotihyla langsdorffii*: Lâmina 275



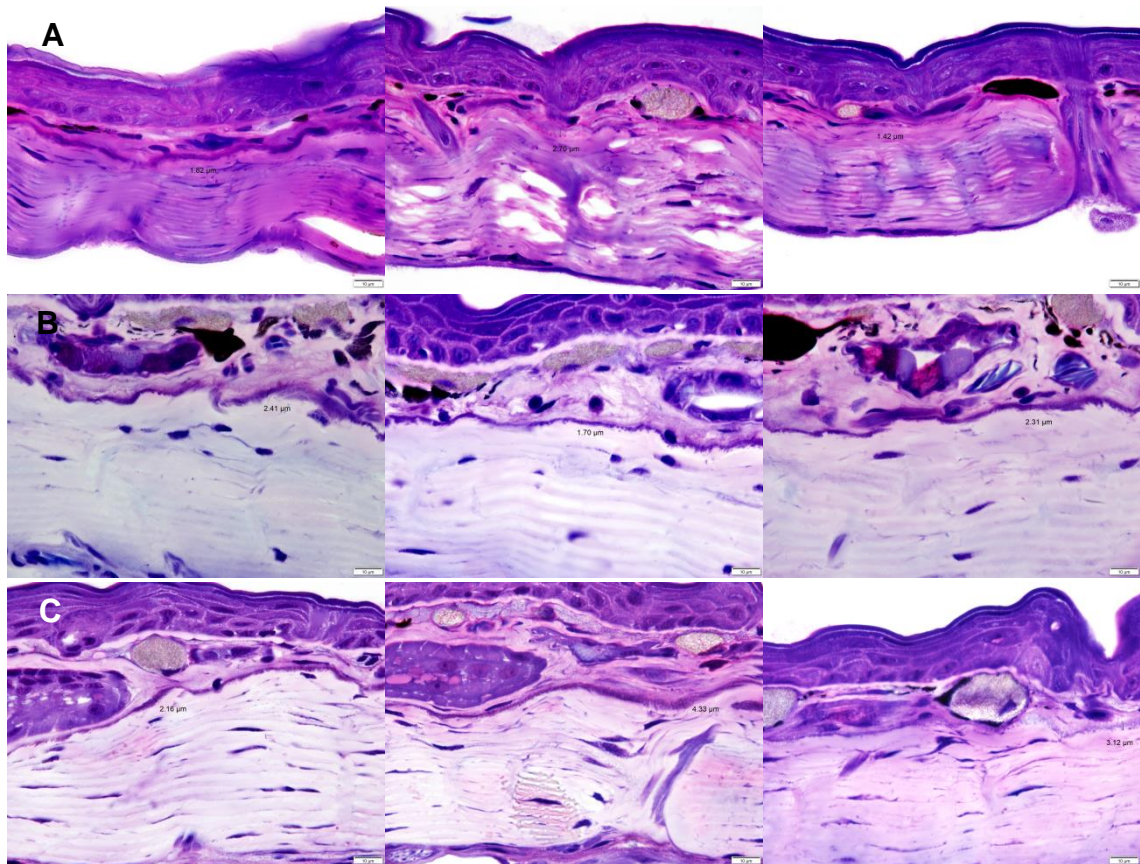
Fonte: próprio autor.
(imagem A) *glândula 1*. (imagem B) *glândula 2*. (imagem C) *glândula 3*.

Figura 22- *Itapotihyla langsdorfii*: Lâmina 276



Fonte: próprio autor.
(imagem A) glândula 1. (imagem B) glândula 2. (imagem C) glândula 3.

Figura 23- *Itapotihyla langsdorfii*: camada calcificada



Fonte: próprio autor.
(imagem A) lâmina 272. (imagem B) lâmina 275. (imagem C) lâmina 276.