

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO TEGUMENTO DE FÊMEAS DE *PROCERATOPHRYS BOIEI*

Flávia Abreu Felseburgh¹ & Lycia de Brito Gitirana²

¹Laboratório de Histologia Animal e Comparada, ICB – UFRJ; Curso de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental - UERJ. Av. Trompowsky s/nº, Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – Brasil – 21940-970

E-mail: flavia_morfologia@yahoo.com.br

²Laboratório de Histologia Animal e Comparada, ICB – UFRJ. Av. Trompowsky s/nº, Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – Brasil – 21940-970

E-mail: lyciabg@ufrj.br

Recebido 07 de novembro de 2007; revisado 30 de novembro; aceito 08 de janeiro de 2008

RESUMO - Apesar das diversas espécies de anuros no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), pouco tem sido pesquisado sobre a estrutura morfológica do tegumento desses animais. Baseado neste fato, este estudo teve por objetivo a caracterização do tegumento de fêmeas de *Proceratophrys boiei*, uma das espécies de anuros que ocorre no PARNASO. Os resultados revelaram que o tegumento é formado por uma epiderme e uma derme, sendo a derme subdividida em camada esponjosa e camada compacta. Na epiderme, o queratinócito é o tipo celular predominante e se organiza formando um epitélio estratificado. Além dos queratinócitos, flask cells também ocorrem. O aspecto rugoso do tegumento se deve a irregularidade da camada córnea e a presença de tubérculos corneificados. Três tipos de glândulas exócrinas ocorrem na derme esponjosa: glândulas mistas, glândulas granulosas e glândulas lipídicas. As glândulas mistas são formadas por células mucosas e células serosas; as glândulas granulares apresentam uma secreção granular acidófila e a glândula lipídica exhibe inclusões lipídicas distribuídas entre um material acidófilo de aspecto homogêneo. Assim, o tegumento das fêmeas de *P. boiei* exhibe a mesma morfologia observada para os machos da espécie, não revelando dimorfismo sexual.

Palavras-chaves: *Proceratophrys*, tegumento, morfologia.

ABSTRACT - Despite the diverse of anuran species which occur in the Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), little is known about their integument morphology. Based on this fact, this study was carried out in order to provide the morphological characterization of the female integument of *Proceratophrys boiei* which occurs in PARNASO. The results showed that female integument is formed by an epidermis and a dermis which is subdivided by a spongious layer and a compact layer. In the epidermis, the keratinocyte predominate and is responsible for general organization of the keratinized stratified squamous epithelium. Beside keratinocytes flask cells also occur. The integument roughness is due to the epidermic cornea layer and to the keratinized tubercles. Mixed, granular, and lipidic exocrine glands occur in the spongious dermis. The mixed glands are formed by mucous and serous cells; the granular glands have a granular acidophilic intake. Thus, the female integument show similarities to the male integument of *P. boiei*, and does not reveal sexual dimorphism.

Keywords: *Proceratophrys*, integument, morphology.

INTRODUÇÃO

Nos anuros, o tegumento tem revelado características próprias conforme a espécie (Elkan, 1968) e desempenha diversas funções como proteção mecânica (Faquahar e Palade, 1965); defesa química (Delfino *et al.*, 1995), percepção sensorial (Koyama *et al.*, 2001); transporte iônico (Sullivan *et al.*, 2000); controle hídrico (Azevedo *et al.*, 2007); respiração (Duellman & Trueb 1994); reserva de cálcio (Azevedo *et al.*, 2005). Essas funções são reflexos da complexidade morfológica (de Brito-Gitirana & Azevedo, 2005), assim como nas propriedades fisiológicas dos componentes do tegumento (Greven *et al.*, 1995). Como resultados das adaptações morfofisiológicas, o tegumento dos anuros revela importantes informações sobre a adaptabilidade desses animais ao seu ambiente

(de Brito-Gitirana & Azevedo, 2005), além de exibir características próprias conforme a espécie (Azevedo *et al.*, 2005; Felseburgh *et al.*, 2007).

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) apresenta uma diversificada anurofauna. Contudo, pouco se conhece sobre a estrutura do tegumento desses animais. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar o tegumento de fêmeas de *Proceratophrys boiei*, um anuro que ocorre no PARNASO, contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre a biologia dos anuros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Duas fêmeas adultas de *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied, 1824) foram coletadas no Parque Nacional da Serra dos Órgãos em Teresópolis no Estado do Rio de Janeiro, de acordo com as leis brasileiras (licença 191/2005 - IBAMA).

Para o estudo pela microscopia de luz, fragmentos da região dorsal e ventral do tegumento foram fixados em formol neutro tamponado a 10% e processados de acordo com as técnicas histológicas para inclusão em parafina. Lâminas contendo cortes com cinco micrometros de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Gomori (Lillie & Fulmer, 1976). A coloração pelo Alcian Blue (AB) 8GX 1% em pH 1,0 e pH 2,5 foi empregada para demonstrar as formas sulfatadas e carboxiladas dos glicosaminoglicanos (GAG), respectivamente (Mowry, 1963). O ácido periódico associado com o reativo de Schiff (PAS) foi utilizado para detectar glicoproteínas neutras (Kierman, 1990).

Para análise dos materiais foi utilizado o microscópio da Zeiss Axioskop 2 e

as imagens foram capturadas pelo sistema AxiVision 2.05.

RESULTADOS

Em *P. boiei*, o tegumento das regiões dorsal e ventral revela a estrutura básica do tegumento de anuros, apresentando uma epiderme e uma derme. Abaixo da derme se observa uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo que corresponde à hipoderme (**Figura 1**).

A epiderme é constituída de 3 a 5 camadas celulares, que se justapõem e formam um típico epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Além dos queratinócitos, que representam o tipo celular predominante da epiderme, também se observam as flask-cells. Na epiderme, é possível distinguir a camada basal, a camada intermediária ou espinhosa e a camada córnea. A superfície da camada

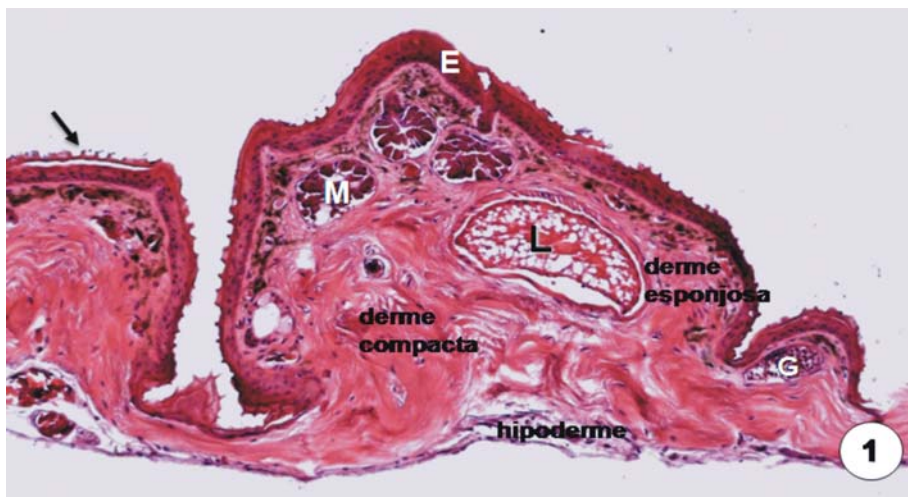


Figura 1 - Tegumento de *Proceratophrys boiei*: epiderme (E); derme, que é subdividida em derme esponjosa e derme compacta. A derme esponjosa aloja as glândulas mistas (M), granuladas (G) e lipídicas (L). A camada córnea, voltada para o meio externo, se apresenta irregular (→), sendo lisa na face voltada para as células da camada intermediária.

córnea, voltada para o meio externo, revela aspecto irregular devido à presença de projeções e reentrâncias; porém, a face da camada córnea, voltada para as células da camada intermediária, se apresenta lisa (Figura 1 e 2).

Associado a irregularidade superficial da camada córnea, a epiderme forma projeções cônicas, denominadas tubérculos corneificados, que são mais frequentes na região dorsal do tegumento e são responsáveis pelo aspecto macroscópico rugoso do tegumento (Figura 3 e 4).

Abaixo da epiderme, se localiza a derme formada por tecido conjuntivo e se

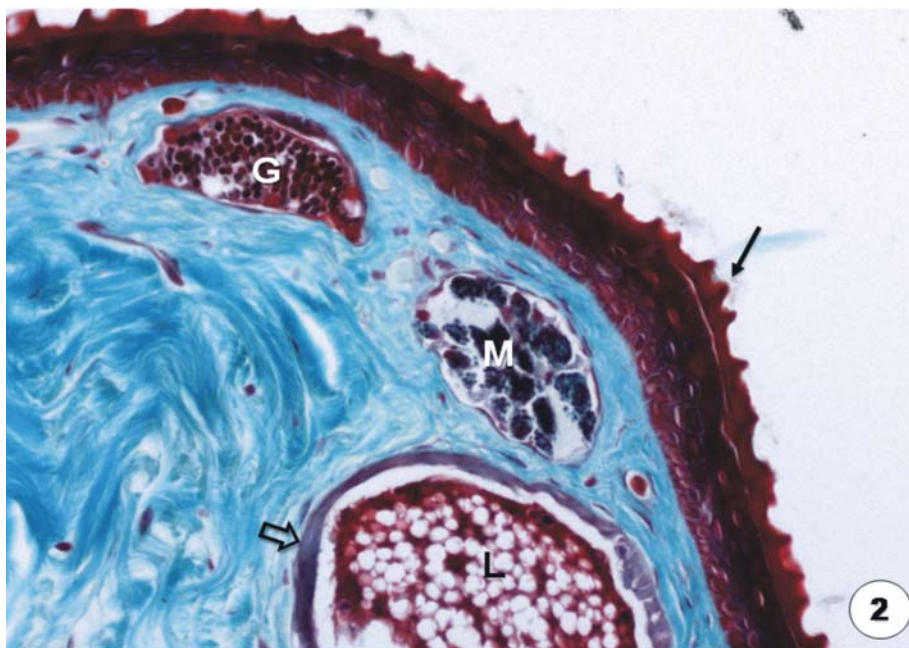


Figura 2 - Glândula mista (M), glândula granulosa (G) e glândula lipídica (L).
Camada córnea (→); célula mioepitelial (⇨)

encontra subdividida em duas camadas: a derme esponjosa e a derme compacta (**Figura 1**). A derme esponjosa, logo abaixo da epiderme, é formada por tecido conjuntivo frouxo e aloja a porção secretora das glândulas exócrinas (**Figura 1 e 2**), além de apresentar na sua porção mais superficial células pigmentares ricas em melanina (**Figura 3 e 4**). A derme compacta apresenta fibras colagenosas com um arranjo denso e bem organizado (**Figura 1**) e é interrompida esporadicamente por feixes de fibras colagenosas, as quais partem da hipoderme em direção a derme esponjosa. A camada de Eberth-Katschenko, comumente observada entre a derme esponjosa e a derme compacta, não foi visualizada.

As glândulas exócrinas são de três tipos: glândula mista, glândula granulosa e glândula lipídica (**Figura 1 e 2**); o ducto excretor dos tipos glandulares é constituído por um epitélio bi-estratificado, sendo que a porção inicial dos ductos excretores é revestida por uma fina camada de queratina contínua com a camada córnea da epiderme. As glândulas mistas são constituídas por células mucosas e por células serosas (**Figura 3 e 4**). Somente as células mucosas revelaram reação positiva aos métodos do AB e do PAS (**Figura 3 e 4**), indicando que sua secreção contém mucopolissacarídeos ácidos com características de glicosaminoglicanos e glicoproteínas neutras. As células serosas não apresentaram reação aos métodos do AB e PAS (**Figura 3 e 4**). As glândulas granulosas exibem granulações acidófilas esféricas AB- e PAS-negativas. As glândulas lipídicas exibem numerosas inclusões lipídicas distribuídas entre um material acidófilo de aspecto homogêneo que também não relevou reação nem ao AB nem ao PAS. Células mioepiteliais (**Figura 2 e 3**) dispostas em uma fina camada são observadas ao redor da porção secretora dos três tipos de glândulas.

DISCUSSÃO

Poucos são os relatos sobre os aspectos morfológicos do tegumento de anuros do gênero *Proceratophrys* (Felseburgh *et al.*, 2007). Um dos fatores que contribuem para a escassez de informações sobre estas espécies se refere às dificuldades de acesso, já na coleta dos mesmos, visto que esses animais apresentam coloração críptica, sendo de difícil visualização no chão das florestas (Sazima, 1978; Izecksohn & Peixoto, 1996; Teixeira & Coutinho, 2002).

A análise histológica do tegumento de fêmeas de *P. boiei* revelou que o tegumento apresenta a estrutura básica descrita previamente para outros anuros (Schwinger *et al.*, 2001; de Brito-Gitirana & Azevedo, 2005), isto é, constituído por uma epiderme e uma derme subdividida em derme esponjosa e derme compacta. Assim, a estrutura morfológica não revela dimorfismo sexual quando comparado com os machos da espécie (Felseburgh *et al.*, 2007).

Um aspecto interessante revelado neste estudo é que a camada córnea do tegumento de fêmeas de *P. boiei* apresenta o mesmo padrão já descrito para os machos (Felseburgh *et al.*, 2007), podendo ser esta uma característica do gênero, como já descrito em *P. laticeps* e *P. appendiculata* (Felseburgh *et al.*, 2007).

Diferentes elevações ou projeções epidérmicas no tegumento de diferentes anuros foram descritas por Elias & Shapiro (1957). De Brito-Gitirana & Azevedo (2005) relataram os tubérculos corneificados na região dorsal do tegumento de *Bufo ictericus* e descrevem os tubérculos como pequenas projeções de tecido conjuntivo da derme esponjosa, revestidas pela epiderme. Os tubérculos corneificados estariam relacionados a uma maior proteção do tegumento contra

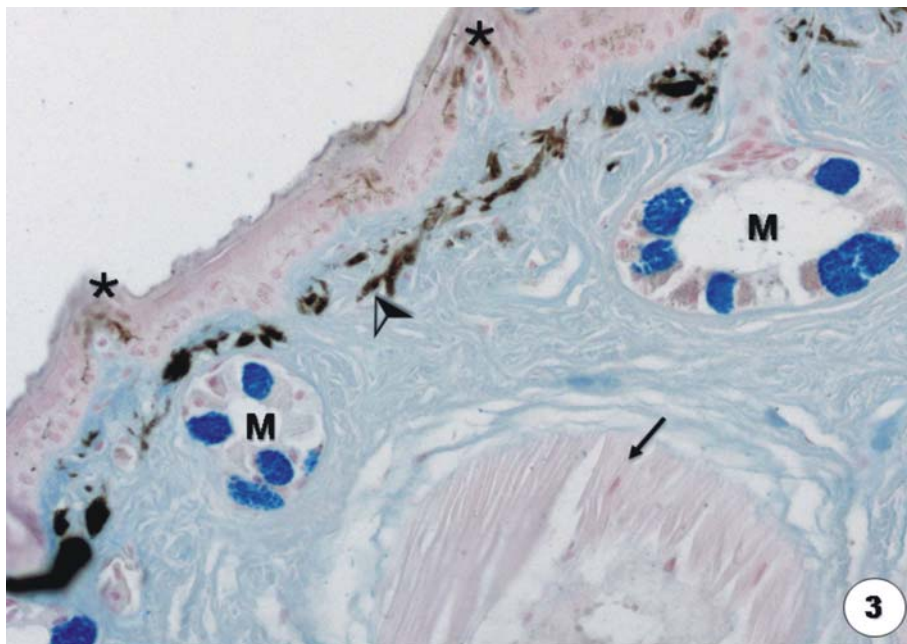


Figura 3 - Reação AB-positiva das células mucosas das glândulas mistas (M). Tubérculos (✱), Melanóforos (➤). Célula mioepitelial (→) em corte tangencial.

os efeitos da radiação solar, pois a queratina é uma escleroproteína com propriedade birrefringente, capaz de refletir a luz solar.

Assim como em *Xenopus laevis* (Greven *et al.*, 1995), em *Bufo marinus* (Schwinger *et al.*, 2001) e em *Bufo ictericus* (Azevedo *et al.*, 2005), a derme compacta não é uma camada contínua, mas é atravessada por feixes de fibras colagenosas que conectam a hipoderme a derme esponjosa. Para Deneffle *et al.* (1993), os feixes verticais de fibras colagenosas são considerados uma via de migração de células. Gonçalves & de Brito-Gitirana (2008) mostraram que é através dessas colunas conjuntivas que os vasos sanguíneos transitam, partindo da derme e atingindo a derme esponjosa.

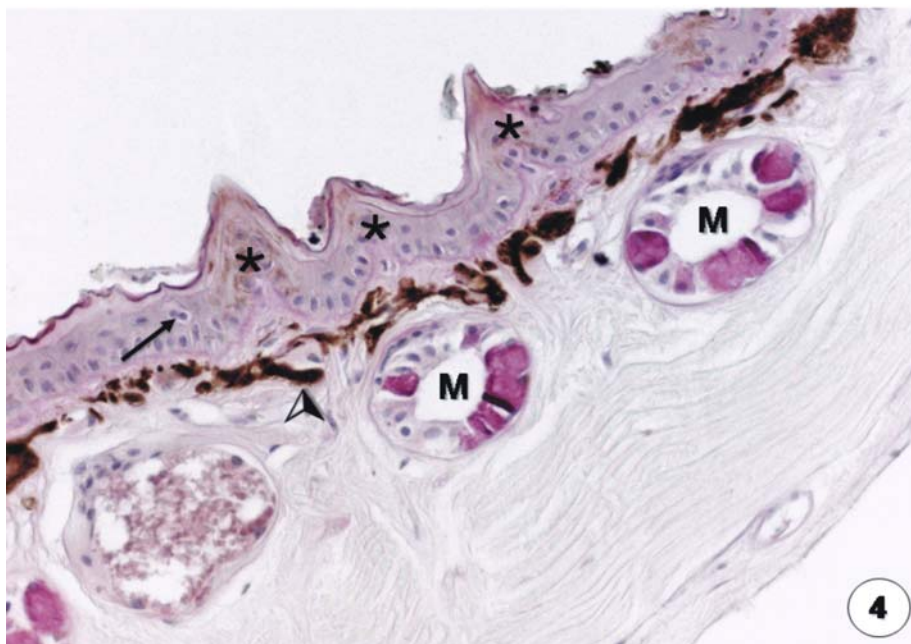


Figura 4 - Células mucosas PAS-positivas das glândulas mistas (M); tubérculos corneificados (*); flask cell (→) em divisão celular. Melanóforos (➤).

A camada de Eberth-Katschenko é descrita em diversos tipos de anuros e tem sido relacionada com o controle hídrico do animal (Elkan, 1968). Contudo, Azevedo *et al.* (2007) demonstraram que a derme esponjosa é a camada da derme responsável pela reserva hídrica. Em *B. ictericus*, a camada de Eberth-Katschenko é visualizada através de sua típica basofilia (de Brito-Gitirana & Azevedo, 2005; Azevedo *et al.*, 2005) e corresponde ao acúmulo de dermatansulfato (Pelli *et al.*, 2007).

Essa camada não foi visualizada no tegumento das fêmeas de *P. boiei*. Azevedo *et al.* (2005) comentaram que a preservação da camada de Eberth-Katschenko pode estar relacionada ao tipo de fixador empregado na fixação do

animal. Como a camada de Eberth-Katschenko foi previamente visualizada em machos de *P. boiei* (Felseburgh *et al.*, 2007), a existência dessa camada no tegumento pode ser influenciada por fatores ambientais, como a oferta de alimento ou ao período sazonal de coleta.

Glândulas cutâneas dos anfíbios viventes usualmente pertencem a quatro tipos principais: glândulas mucosas, glândulas serosas (granular ou de veneno), glândulas lipídicas e glândulas mistas (seromucosas) (Duellman & Trueb, 1994; Brizzi *et al.*, 2002). Embora a literatura generalize a nomenclatura glandular (Duellman & Trueb, 1994), Almeida *et al.* (2007) comentam que as glândulas mistas no tegumento de *B. ictericus* são formadas por duas populações celulares, isto é, células mucosas e células serosas; assim, o produto final é uma mistura de secreção mucosa e serosa. Glândulas mistas, glândulas granulosas e glândulas lipídicas foram encontradas no tegumento de fêmeas de *P. boiei*. As células mucosas das glândulas mistas apresentaram positividade aos métodos do AB e do PAS, indicando que seu produto de secreção contém polissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados, com características de glicosaminoglicanos, além de glicoproteínas neutras. As células serosas das glândulas mistas e das glândulas granulosas não apresentaram reação a ambos os métodos. Esses resultados também são semelhantes aos descritos em machos de *B. ictericus* (Azevedo *et al.*, 2005), em machos de *P. boiei*, *P. laticeps*, *P. appendiculata*, *Odontophrynus americanus* (Felseburgh *et al.*, 2007) e em machos e fêmeas de *Cycloramphus fuliginosus* (Gonçalves & de Brito-Gitirana, 2008). As glândulas lipídicas também são descritas no tegumento de *Phyllomedusa sauvagei*, onde a secreção lipídica previne a perda de água (McClanahan *et al.*, 1994). Como o *P. boiei* é um anuro de hábitos terrestres, vivendo no chão

de florestas, as glândulas lipídicas podem estar associadas à proteção do tegumento e participar do controle hídrico do animal.

Neste estudo, também foram observadas células mioepiteliais ao redor das porções secretoras das glândulas. As células mioepiteliais auxiliariam na estruturação da porção secretora, assim como na ejeção dos produtos de secreção (Mills & Prum, 1984; Delfino *et al.*, 1987; Almeida *et al.*, 2007; Gonçalves & de Brito-Gitirana, 2008).

CONCLUSÃO

Com este estudo é possível concluir que o tegumento de fêmeas de *P. boiei* apresenta a estrutura básica do tegumento já descrita para outras espécies de anuros. A estruturação do tegumento está relacionada com a fisiologia de cada superfície e representa uma adaptação ao hábitat, refletindo o modo de vida animal.

Comparando-se a morfologia do tegumento de fêmeas com os dados relatados por Felseburgh *et al* (2007) para os machos de *P. boiei*, verifica-se que não há presença de dimorfismo sexual.

A caracterização morfológica do tegumento de anuros é importante por fornecer subsídios para a compreensão da biologia desses animais, bem como para auxiliar na diferenciação de gêneros/espécies, contribuindo para o conhecimento da anurofauna local.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. G.; FELSEBURGH, F. A.; AZEVEDO, R. A. & DE BRITO-GITIRANA, L. (2007). Morphological re-evaluation of the parotoid glands of *Bufo ictericus*

(Amphibia, Anura, Bufonidae). *Contributions to Zoology*, 76 (3): 145-152.

AZEVEDO, R. A.; CARVALHO, F. H. & DE BRITO-GITIRANA. (2007). Hyaluronan in the epidermal and the dermal extracellular matrix: Its role in cutaneous hydric balance and integrity of anuran integument. *Micron*, 38 (6): 607-610.

AZEVEDO, R. A.; PELLI, A. A.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SANTANA, A. S DE J.; FELSEMBURGH, F. A. & DE 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(1): 61-65.

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.

DE BRITO-GITIRANA, L. & AZEVEDO, R. A. (2005). Morphology of *Bufo ictericus* integument. *Micron*, 36 (6): 532-538.

DELFINO, G; BRIZZI, R. & FERI, L. (1995). Chemical skin defense in *Bufo bufo*: na ultrastructural study during ontogenesis. *Zoologischer Anzeiger*, 234: 101-111.

DENEFLE, J. P.; ZHU, Q. L. & LECHAIRE, J. P. (1993). Localisation of fibronectin in the frog skin. *Tissue Cell*, 25: 87-102.

DUELLMAN, W. R. & TRUEB, L. (1994). *Biology of Amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press Ltd, 670 p.

ELIAS, H. & SHAPIRO, J. (1957). Histology of the skin of some toads and frogs. *American Museum of Natural History*, 1819: 1-27.

FAQUAHAR, M. G. & PALADE, G. E. (1965). Cell junctions in amphibian skin. *The Journal of Cell Biology*, 26: 263-291.

FELSEMBURGH, F. A.; CARVALHO-E-SILVA, S. P. & DE BRITO-GITIRANA, L. (2007). Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys*

- and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron*, 38 (5): 439-445.
- FUJIKURA, K.; KURABUCHI, S.; TABUCHI, M. & INOUE, S. (1988). Morphology and distribution of the skin glands in *Xenopus laevis* and their response to experimental stimulation. *Zoology Science*, 5: 415-430.
- GONÇALVES, V.F. & DE BRITO-GITIRANA, L. (2008). Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). *Micron*, 39: 32-39.
- GREVEN, H.; ZANGER, K. & SCHWINGER, G. (1995). Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). *Journal of Morphology*, 224: 15-22.
- IZECKSON, E. & PEIXOTO, O. L. (1996). Uma grande concentração de indivíduos de *Proceratophrys laticeps* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Série Ciência e vida*, 18: 105-107.
- KIERMAN, J. A. (1990). *Histological and histochemical methods*. Theory and Practice. Frankfurt. Pergamon Press, ed. 2, 433p.
- KOYAMA, H.; NAGAI, T.; TAKEUCHI, H. & HILLYARD, S. D. (2001). The spinal nerves innervate putative chemosensory cells in the ventral skin of desert toads, *Bufo alvarius*. *Cell Tissue Research*, 304:185-192.
- LILLIE, R. D. & FULLMER, H. M. (1976). *Histopathologic technique and practical histochemistry*. New York. MacGraw-Hill, ed. 4, 942p.
- MCCLANAHAC, L. L.; RUIBAL, R. & SHOEMAKER, V. H. (1994). Frogs and Toads in deserts. *Scientific American*, p. 82-88.
- MILLS, J. W. & PRUM, B. E. (1984). Morphology of the exocrine glands of the frog skin. *The American Journal of Anatomy*, 171: 91-106.
- MOWRY, R. W. (1963). The special value of methods that color both acidic and vicinal

hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8X and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction. *Annals of the New York Academy Science*, 196: 402-423.

PELLI, A. A.; AZEVEDO, R. A., CINELLI, L. P., MOURÃO, P. A. S. & DE BRITO-GITIRANA, L. (2007). Dermatansulfate is the major metachromatic glycosaminoglycan in the integument of the anuran *Bufo ictericus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 146: 160-165.

SAZIMA, I. (1978). Convergent defensive behavior of two leaf-litter frogs of Southeastern Brazil. *Biotropica*, 10 (2): 158.

SCHWINGER, G.; ZANGER, K.. & GREVEN, H. (2001). Structural and mechanical aspects of the skin of *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). *Tissue Cell*, 33 (5): 541-547.

SULLIVAN, P. A.; HOFF, K.V. S. & HILLYARD, S. D. (2000). Effects of anion substitution on hydration behavior and water uptake of the red-spotted toad, *Bufo punctatus*: is there an anion paradox in amphibian skin? *Chemical senses*, 25: 167-172.