

ADRIANO BAUER COSTA DA SILVA

Estudo comparativo da utilização de diferentes fixadores na preservação histológica e descrição morfológica das glândulas de veneno da pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus*.

São Paulo

2022

ADRIANO BAUER COSTA DA SILVA

Estudo comparativo da utilização de diferentes fixadores na preservação histológica e descrição morfológica das glândulas de veneno da pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia veterinária

Área de concentração:

Anatomia dos animais domésticos e silvestres

Orientador:

Carlos Alberto Gonçalves Silva
Jared

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4164 FMVZ	Silva, Adriano Bauer Costa da Estudo comparativo da utilização de diferentes fixadores na preservação histológica e descrição morfológica das glândulas de veneno da pele da perereca <i>Trachycephalus mesophaeus</i> / Adriano Bauer Costa da Silva. – 2022. 54 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2022. Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared. 1. Anfíbios. 2. Coleções zoológicas. 3. Fixadores. 4. Morfologia. 5. Pele. I. Título.
-----------------	--

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP

CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 28 de fevereiro de 2020
CEUAx N 3207031219

Ilmo(a). Sr(a):

Responsável: Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Adriano Bauer Costa Da Silva - *executor* (Instituto Butantan); Marta Maria Antoniazzi - *colaborador* (Instituto Butantan); Cesar Alexandre - *colaborador* (Instituto Butantan); Pedro Luiz Mailho Fontana - *colaborador* (Instituto Butantan); Carlos Jared (orientador)

Título do projeto: "Estudo da morfologia das glândulas de veneno da pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus* e a utilização de diferentes fixadores na preservação histológica cutânea".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 12/02/2020, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Adriano Bauer Costa

Título: **Estudo comparativo da utilização de diferentes fixadores na preservação histológica e descrição morfológica das glândulas de veneno da pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A todas as formas de vida que merecem respeito e admiração, por nos permitirem evoluir e aprender através da ciência.

DEDICATÓRIA

À minha família:

Meus pais Expedito e Martha, pela inspiração e por inserir no meu código genético a paixão pela saúde e pelas ciências.

Minha tia Mônica pela paciência, assessoria, leitura dos textos, conselhos, dicas e apoio! Você é sensacional!!!

Meus irmãos, Ricardo e Gustavo por todo apoio, incentivo, discussão, enfim tudo! Muito grato pela nossa história de união e parceria!

Minha esposa Fernanda por ser um alicerce fundamental na minha vida, que sofre junto e me acompanha há 27 anos vivendo de dentro essa montanha-russa que é ser médico veterinário de animais silvestres, e ainda assim me apoia nas ideias mais malucas! Como dizem, “na saúde e na doença” não é mesmo? Love you baby!!!

Minhas queridas filhas Manu e Bibi por me ensinarem diariamente como ser uma pessoa melhor e por me darem a oportunidade de vivenciar o amor no sentido mais intenso e genuíno que um ser humano pode experimentar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Butantan, meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared e também à Prof. Dra. Marta Maria Antoniazzi por todas as conversas, ensinamentos e por todo suporte e enriquecimento que me foi proporcionado! Agradeço especialmente por terem me recebido como aluno de mestrado mesmo após quase vinte anos distante da vida acadêmica! Muito obrigado pela compreensão, credibilidade e paciência.

À equipe do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan por todo aprendizado e apoio, foram todos muito importantes para minha evolução durante essa jornada acadêmica e determinantes para meu crescimento, e para que tudo tenha saído de maneira perfeita! Muito obrigado pela generosidade e companheirismo dos amigos Pedro Luiz Mailho-Fontana, César Alexandre, Beatriz Maurício, Simone Jared e Mariza Valsechi.

Ao Departamento de Anatomia Veterinária da FMVZ/USP, professores, alunos e especialmente meus companheiros de departamento: Júlia, José Miguel, Gabriel, Fabíola, Juliana, Leandro e Mayla! Muito obrigado!!!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Processo nº: 88887.476002/2020-00.

E a todos que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, me ajudaram nessa jornada. Muito obrigado a todos vocês.

*“O sucesso não é constante, o fracasso não é fatal,
o que conta é a coragem de continuar” – Winston Churchill*

SILVA, A. B. C. **Estudo comparativo da utilização de diferentes fixadores na preservação histológica e descrição morfológica das glândulas de veneno da pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus*.** (Comparative study using different fixatives for histological preservation and morphological description of the venom glands on the skin of *Trachycephalus mesophaeus* tree frog.) 2022. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

RESUMO

As coleções biológicas constituem uma das mais importantes ferramentas para obtenção de informações sobre a biodiversidade. Nas coleções zoológicas de vertebrados, um dos meios clássicos de preservação de espécimes é através de fixação em solução aquosa de formaldeído a 10% (ou formalina), seguida de preservação em etanol 70%. A formalina pode ser considerada como um bom fixador de tecidos biológicos, ainda que não chegue a níveis de preservação morfológica suficientemente refinada para a utilização da microscopia eletrônica, o que necessariamente requer o uso de fixadores mais precisos contendo glutaraldeído. Por outro lado, com a aplicação da biologia molecular, tornaram-se cada vez mais frequentes os estudos que necessitam da preservação do DNA de amostras, principalmente retiradas do músculo ou do fígado, visando o acesso à sistemática molecular. Essas amostras, porém, devem necessariamente ser fixadas em etanol, não podendo ter contato com fixadores aldeídicos. Para tanto, muitos pesquisadores zoólogos passaram a fixar os espécimes coletados em campo diretamente no etanol 70%, capaz de preservar o DNA das amostras. Essa prática se tornou especialmente comum durante expedições de campo para coleta de anfíbios, talvez devido à pouca sobrevivência dos espécimes coletados e à grande permeabilidade e fragilidade cutâneas, que permitem que esses animais sejam rapidamente e facilmente fixados em etanol 70%. No entanto, essa prática fornece material inadequadamente fixado às coleções zoológicas, muitas vezes inviabilizando o seu aproveitamento para possíveis estudos morfológicos. Entre os anfíbios, a pele é diferenciada em cada espécie considerada, o que a torna um bom material para a avaliação das condições de preservação morfológica. Dessa forma, visando à conscientização dos

curadores de coleções e dos pesquisadores responsáveis pela coleta de animais no campo, a proposta desse estudo é a avaliação comparativa da preservação morfológica em uma espécie de perereca da Mata Atlântica, *Trachycephalus mesophaeus*, submetida à preservação pelo uso de diferentes agentes fixadores. Em paralelo, utilizamos as peles preservadas em fixador contendo glutaraldeído para realizarmos um estudo morfológico detalhado da pele dessa perereca, principalmente no que se refere às glândulas de veneno e às glândulas mucosas.

Palavras-chave: Anfíbios; Coleções Zoológicas; Fixadores; Morfologia; Pele.

SILVA, A. B. C. **Comparative study using different fixatives for histological preservation and morphological description of the venom glands on the skin of the tree frog *Trachycephalus mesophaeus*.** (Estudo comparativo da utilização de diferentes fixadores na preservação histológica e descrição morfológica das glândulas de veneno da pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus*.) 2022. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

ABSTRACT

Biological collections are important tools for obtaining information about biodiversity. In vertebrate zoological collections, one of most classic methods of specimen preservation is through fixation using 10% aqueous formaldehyde solution (or formalin), followed by 70% ethanol preservation. Formalin can be considered a good fixative of biological tissues, although it does not reach sufficiently refined morphological preservation levels for electron microscopy, which necessarily requires the use of more accurate glutaraldehyde-containing fixatives. On the other hand, application of molecular biology studies requiring DNA preservation especially of muscle or liver samples aiming to access the molecular systematics, have become increasingly frequent. DNA samples, however, cannot have contact with aldehyde fixatives and necessarily must be preserved in ethanol. For this reason, aiming at the preservation of DNA, many zoologists are fixing field specimens directly in 70% ethanol. This practice has become especially common in field expeditions for amphibian collection, perhaps due to the poor survival of the collected specimens and the high skin permeability and fragility that allow these animals to be quickly and easily fixed in 70% ethanol. This practice, however, provides material badly fixed to zoological collections, often turning its use impossible for morphological purposes. Among amphibians, the skin is differentiated in each species considered, which makes it a good material for the evaluation of morphological preservation conditions. Thus, aiming at the awareness of the zoological collection curators and of field researchers, the main purpose of this study is the comparative evaluation of the morphological preservation in a common tree frog species of the Atlantic Rainforest, *Trachycephalus mesophaeus*, submitted to preservation using different fixative agents. In

parallel, we used the skin preserved with glutaraldehyde-containing fixative to perform a detailed morphological study of the skin of this tree frog, especially regarding the poison and mucous glands.

Keyword: Amphibians; Fixatives; Morphology; Skin; Zoological Collections.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia da perereca <i>Trachycephalus mesophaeus</i> evidenciando as regiões de pele amostradas	29
Figura 2. Fotomicrografia geral da pele dorsal de <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	33
Figura 3. Detalhes dos dois tipos de glândulas mucosas, capilares sanguíneos, camada mio-epitelial e extrato compacto da derme	34
Figura 4. Fotomicrografias das glândulas em coloração básica de azul de toluidina e fucsina, histoquímica de PAS e azul de bromofenol.	35
Figura 5. Fotomicrografia evidenciando a presença da camada calcificada . .	36
Figura 6. Fotomicrografia das amostras de pele dorsal e ventral de <i>Trachycephalus mesophaeus</i> e seus respectivos fixadores corados pelo azul de toluidina-fucsina..	38
Figura 7 (A-L). Fotomicrografia da pele dorsal de <i>Trachycephalus mesophaeus</i> após a aplicação das técnicas histoquímicas PAS, azul de bromofenol e von Kossa.	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Coleções zoológicas	18
2.2 A perereca <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	19
2.3 Fixação de tecidos	20
2.3.1 Fixadores Alcoólicos	21
2.3.2 Fixadores Aldeídicos	22
2.3.3 Utilização de tampões associados aos fixadores.....	24
2.4 Estrutura tegumentar dos anfíbios.....	25
3. MÉTODOS	27
3.1 Espécimes utilizados	27
3.1.1 Preparo dos fixadores	27
3.2 Estudo histológico.....	29
3.2.1 Processamento em historresina.....	29
3.3 Microtomia em historresina.....	29
3.3.1 Estudo histoquímico (Bancroft & Stevens, 1999; Kiernan, 2001).	30
4. RESULTADOS	32
4.1 Estudo histológico geral.....	32
4.2 Avaliação dos fixadores	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

As coleções biológicas constituem uma das mais importantes ferramentas para obtenção de informações sobre a composição e distribuição da biodiversidade em um determinado ambiente. Essas informações são essenciais para a pesquisa científica, para a modelagem ambiental, e para subsidiar a tomada de decisões do poder público no ordenamento territorial e nas estratégias de conservação e utilização dos recursos naturais. As coleções biológicas representam um ponto de partida para o estudo da diversidade de uma região, onde especialistas de diferentes áreas podem procurar informação e obter a identificação de seus objetos de estudo (INGENITO, 2014). Além disso, as coleções são um importante suporte para áreas estratégicas não só relativas à gestão ambiental, mas também às relativas à pesquisa nas áreas agrônômica, médica ou farmacêutica, envolvendo, assim todos os níveis da sociedade (ZAHER; YOUNG, 2003).

Com o advento da biologia molecular, as coleções científicas passaram também a representar bancos genéticos onde podem ser armazenadas alíquotas de tecidos, imprescindíveis aos estudos moleculares e de biotecnologia. Esse material científico constitui uma rica fonte de informação, com potencial para propiciar novas descobertas (ZAHER; YOUNG, 2003)

Para que o material guardado em coleções possa ser usado em futuros estudos, é muito importante que seja preservado de maneira adequada, através do uso de soluções fixadoras. A qualidade da fixação das amostras é importante, pois impede que os espécimes ou amostras (de órgãos ou tecidos) iniciem o processo de autólise, onde ocorre um acúmulo de dióxido de carbono nos tecidos, fazendo com que enzimas atuem no citoplasma das células com objetivo de destruí-las. Ao injetarmos um fixador nos tecidos biológicos, há uma interrupção abrupta do metabolismo celular, o que estabiliza os componentes intra e extracelulares, conservando indefinidamente a estrutura das amostras.

Sendo assim, é importante que seja dada muita atenção ao se realizar a fixação das amostras, utilizando-se um bom fixador, de forma que ocorra a boa preservação dos tecidos que se deseja estudar futuramente.

Na literatura são citados diversos tipos de fixadores, cada um com suas vantagens, porém nenhum reconhecido como perfeito. Entretanto, sabe-se que

certos fixadores são bons para a conservação de alguns elementos do tecido, enquanto outros são melhores para outros elementos. Assim, deve-se investigar qual o melhor fixador a ser empregado, de acordo com o material e o objetivo do estudo (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

Nas coleções zoológicas de vertebrados, um dos meios clássicos de preservação de espécimes é através de fixação em solução aquosa de formol a 10% (ou formalina), seguida de preservação em meio úmido utilizando-se o etanol 70%. A formalina pode ser considerada como um bom fixador de tecidos biológicos, ainda que não chegue a níveis de preservação morfológica suficientemente refinada para a utilização do material na microscopia eletrônica, o que necessariamente requer a utilização de fixadores mais precisos contendo glutaraldeído.

Por outro lado, com a aplicação da biologia molecular, tornaram-se cada vez mais frequentes os estudos que necessitam de preservação do DNA mitocondrial de amostras, retiradas principalmente do músculo ou do fígado, visando o acesso à sistemática molecular. Essas amostras, porém, necessariamente devem ser fixadas em etanol, não podendo ter contato com fixadores aldeídos. Para tanto, muitos pesquisadores zoólogos passaram a fixar os espécimes coletados em campo diretamente no etanol 70%, capaz de preservar o DNA das amostras, e evitando qualquer contato deletério do DNA dos tecidos com fixadores como o formaldeído e o glutaraldeído. Essa prática tornou-se especialmente comum durante expedições de campo para a coleta de anfíbios, talvez devido à pouca sobrevivência dos espécimes coletados, o que requer muitas vezes a eutanásia e preservação logo após a captura, ainda durante a viagem de campo. Ademais, a grande permeabilidade e fragilidade cutâneas, características comuns a todos os anfíbios, permitem que esses animais sejam rápida e facilmente fixados através do uso do etanol 70%. Essa prática, no entanto, fornece material inadequadamente fixado às coleções zoológicas, muitas vezes inviabilizando seu aproveitamento para possíveis estudos morfológicos. É o que temos constatado com grande frequência na nossa prática de morfologistas estudiosos dos anfíbios, em particular da sua pele.

O tegumento dos anfíbios é um órgão complexo muito organizado, apresentando diferentes tipos celulares e variados componentes extracelulares. Além disso, nesse grupo de vertebrados, a pele é diferenciada para cada espécie

considerada, prestando-se muito bem para a avaliação da boa preservação morfológica (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1993, 1995).

Uma das características fundamentais de todos os anfíbios é a presença das glândulas cutâneas granulosas e mucosas. Essas glândulas são constituídas por diferentes tipos de células secretoras e dotadas de grande riqueza de grânulos de secreção (TOLEDO; JARED, 1995). Por esse motivo, são muito sensíveis aos diferentes fixadores.

A proposta desse estudo foi realizar a avaliação comparativa da qualidade de preservação para avaliação morfológica utilizando quatro diferentes agentes fixadores em amostras de pele de uma espécie de perereca da Mata Atlântica, comum na região cacauera baiana, *Trachycephalus mesophaeus*.

Em paralelo, aproveitando o rico material que foi gerado por essa avaliação, utilizamos as peles preservadas em fixador contendo glutaraldeído para realizarmos um estudo morfológico cutâneo detalhado nessa espécie de perereca, principalmente no que se refere às glândulas de veneno e às glândulas mucosas. Essas últimas, geralmente se apresentam de dois tipos distintos em relação ao tamanho, forma e origem química dos grânulos de secreção.

Cabe ainda ressaltar, que com o declínio de populações e até mesmo a extinção de algumas espécies de anfíbios que presenciamos na atualidade, torna-se ainda mais importante assegurarmos a qualidade das coleções zoológicas, de forma a garantir o acesso das gerações futuras a exemplares cada vez mais raros da anfíbiofauna.

Com a divulgação dos resultados obtidos, objetivamos também conscientizar, particularmente os curadores de coleções científicas e pesquisadores que executam trabalho de coleta no campo, sobre a importância da correta preservação dos espécimes de forma a garantir futuros estudos morfológicos através do uso de exemplares tombados em coleções zoológicas.

Ainda, pretendemos gerar um material digital de consulta rápida para profissionais que trabalham em consultoria ambiental, atendendo exigências dos órgãos ambientais para o cumprimento das condicionantes propostas no licenciamento ambiental. Esses profissionais, durante os trabalhos a campo, geram muitos espécimes para coleções zoológicas e muitas vezes o conhecimento sobre a importância da correta fixação dos mesmos não atinge os profissionais fora da área acadêmica. Com isso esperamos aumentar a difusão

desse conhecimento para a prática de campo e assim otimizar e melhorar a qualidade das amostras oriundas de tais atividades.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Coleções zoológicas

As coleções zoológicas têm como função principal armazenar, preservar e ordenar o acervo de espécimes representando a diversidade biológica de uma determinada área e assim fornecer subsídios para medidas de conservação das espécies e áreas naturais; servir de testemunho de estudos científicos realizados; fornecer um estoque de material biológico para pesquisas futuras; promover exposições públicas e o uso didático em diferentes áreas do ensino; além de representar, até certo ponto, a herança cultural das comunidades humanas (ZAKER; YOUNG, 2003; INGENITO, 2014).

As coleções científicas constituem, de fato, uma fonte crucial de informação para todos os que, por sua atividade, têm contato com seres vivos. Isto envolve áreas estratégicas de atuação governamental, como a gestão do meio ambiente, a pesquisa agrônômica, médica ou farmacêutica que, por sua vez, tem implicações sérias em todos os níveis da sociedade (ZAKER; YOUNG, 2003).

No Brasil, a primeira coleção zoológica foi fundada por iniciativa de Dom João VI, na cidade do Rio de Janeiro, que posteriormente viria a se tornar o Museu Nacional do Rio de Janeiro (ZAKER; YOUNG, 2003; VASCONCELOS et al., 2017).

Embora grandes instituições de pesquisa e museus de história natural abriguem coleções biológicas bem estruturadas, coleções de porte menor podem ser geridas por instituições menores e até por pesquisadores independentes. Seja qual for o seu tamanho, uma coleção biológica precisa apresentar quatro pontos principais: coleta de indivíduos na natureza; preparação do material coletado; triagem, catalogação e identificação dos espécimes; e a inclusão dos espécimes em acervos mantidos em condições adequadas de preservação, estando posteriormente disponível para pesquisas de diversas naturezas (TONINI; SILVA; SARMENTO-SOARES, 2018).

Sendo assim, é importante que seja dada muita atenção ao se realizar a fixação das amostras, utilizando-se um bom fixador, de forma que ocorra a boa preservação das estruturas e tecidos que compõem os espécimes para que

deles seja possível tirar o melhor proveito servindo a qualquer tipo de estudo futuro.

2.2 A perereca *Trachycephalus mesophaeus*

O gênero *Trachycephalus* (Tschudi, 1838) compreende 17 espécies distribuídas desde o México até o sul da Argentina, atravessando toda América Central e do Sul a leste dos Andes (FROST, 2020).

A espécie *Trachycephalus mesophaeus* é um anfíbio anuro de porte médio com padrão de coloração dorsal parda delimitado lateralmente por uma faixa amarela contornada de preto que se estende desde o olho até próximo da cloaca (LEMA; MARTINS, 2011). Foi descrita por Hensel, 1867 na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (SANTANA et al., 2016). É endêmica da Mata Atlântica, porém com ampla distribuição, apresenta registros de ocorrência em toda porção leste do Brasil, desde o Alagoas até o Rio Grande do Sul, sendo encontrada a até 800 m de altitude (SOLEÉ et al., 2010).

Pode ser encontrada em florestas de vegetação primária, secundária e borda de mata, associados aos corpos d'água e utilizam a estratégia de reprodução explosiva, aproveitando lagoas temporárias ou permanentes onde os ovos gelatinosos são depositados e ficam flutuando sobre a água (CARVALHO-E-SILVA; GARCIA, 2004; SANTANA et al., 2016).

A pele dos anfíbios é característica pela presença de glândulas mucosas e granuladas e estão associadas não apenas à proteção contra desidratação, mas também com a defesa química contra microrganismos e predadores (TOLEDO; JARED, 1995; MAILHO-FONTANA et al., 2014). As pererecas do gênero *Trachycephalus* são popularmente conhecidas como pererecas-leiteiras por apresentarem uma abundante quantidade de secreção cutânea quando ameaçadas ou manuseadas. Nas espécies mais estudadas, esta secreção apresenta característica adesiva e tóxica e quando em contato com membranas mucosas ou feridas abertas pode causar irritação, edema e dor intensa (BROWN, 2020; GARBINO et al., 2020).

2.3 Fixação de tecidos

A preparação dos espécimes para estudos morfológicos de microscopia envolve vários procedimentos que irão determinar a qualidade do material de estudo e conseqüentemente os resultados das análises geradas. O início do processo se dá com a fixação do material. A fixação dos tecidos desempenha papel preponderante na qualidade das análises morfológicas e possibilitam estudos diversos em um mesmo espécime por período virtualmente indeterminado, quando adequadamente fixados. O processo de fixação, visa estabilizar a arquitetura celular, intercelular e a composição das células no tecido para permitir que elas suportem o processamento subsequente. A fixação também preserva as proteínas, carboidratos e outras porções bioativas em sua relação espacial com a célula, para que possam ser posteriormente estudadas (KIERNAN, 2000; SESSO, 2007; THAVARAJAH et al., 2012).

O processo de fixação é empregado aos tecidos para impedir que a degradação pela ação de enzimas presentes nas células ou de bactérias, além de preservar a estrutura e a composição molecular. A fixação é um processo físico-químico gradual e complexo, envolvendo a difusão do fixador no tecido e uma variedade de potenciais fenômenos físicos e reações químicas. Para que seja atingida tal finalidade podem-se utilizar diferentes métodos de fixação sejam eles físicos ou químicos (THAVARAJAH et al., 2012; RHODES, 2013).

Entre os métodos físicos de fixação podemos citar a secagem ao ar, crio-fixação, e até mesmo o uso de microondas. Embora os métodos de fixação química sejam aplicados com maior frequência para procedimentos histológicos, os métodos físicos também podem ser utilizados dependendo da finalidade do estudo a ser realizado (SESSO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A fixação química dos tecidos é realizada por meio do emprego de substâncias químicas que atuam em porções específicas das macromoléculas celulares com a finalidade de estabilizá-las. No entanto não existe um método absoluto de fixação e praticamente todos os métodos levarão a alguma alteração tecidual ou artefato, pois as células, assim como os componentes extracelulares contêm peptídeos, proteínas, lipídios e fosfolipídios, carboidratos, além de RNA e DNA e esses elementos podem reagir quimicamente de diversas formas

dependendo do agente fixador empregado (RHODES, 2013). Muitas vezes, artefatos produzidos por determinado agente fixador são tolerados em função de características específicas preservadas pelo mesmo no tecido estudado (BOZZOLA; RUSSEL, 1999).

Os tecidos preservados podem ser submetidos a diferentes tipos de estudos, dentre os quais podemos citar alguns como: reações histoquímicas, imunohistoquímicas, biologia molecular, microscopia de luz ou microscopia eletrônica. Para cada uma das finalidades os tecidos podem apresentar diferentes resultados com a utilização dos diferentes agentes fixadores. Tal fato está relacionado ao mecanismo de ação do agente fixador empregado no processo de fixação assim como com as características do tecido a ser preservado.

Portanto o fixador ideal deve proporcionar a utilização dos tecidos fixados, em boa qualidade, pelo maior período possível, além de promover a aplicação de variadas técnicas preservando as características dos diversos tipos de tecidos (SESSO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RHODES, 2013).

Além das características já citadas, o fixador ideal também deve ser atóxico e não oferecer riscos para saúde e meio ambiente, não inflamável ou explosivo, apresentar longa viabilidade depois de preparado e rápida penetração nos tecidos. Diante disso, a busca por um fixador ideal é constante no meio acadêmico uma vez que nenhum dos agentes fixadores conhecidos é capaz de reunir todas as características elencadas como ideais em uma única substância (RHODES, 2013).

2.3.1 Fixadores Alcoólicos

Etanol 70%

Os álcoois são classificados como fixadores coagulantes, pois promovem a precipitação e coagulação das proteínas constituintes das células.

A ação fixadora do etanol a 70% acontece através da rápida desidratação do tecido, removendo partículas de água que são então ocupadas pelo agente fixador (SESSO, 2007).

As proteínas são macromoléculas formadas por cadeias de aminoácidos e podem ser organizadas em quatro níveis estruturais. A estrutura primária é composta pela sequência linear de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas covalentes. No entanto, nos outros níveis estruturais secundário, terciário e quaternário, predominam ligações fracas realizadas por pontes de hidrogênio (NELSON; COX, 2005).

A estrutura proteica tem relação direta com sua funcionalidade, portanto interações que promovam graves alterações estruturais acarretam a desnaturação da proteína (NELSON; COX, 2005).

As moléculas de água no entorno das porções hidrofóbicas das proteínas, promovem a estabilidade das ligações entre estes grupos hidrofóbicos através da força de repulsão, que induz o agrupamento destes. Ao remover as moléculas de água da célula, as ligações entre as porções hidrofóbicas são enfraquecidas. Além disso, ao mesmo tempo, as pontes de hidrogênio entre as porções hidrofílicas também são afetadas com a remoção das moléculas de água, assim proporcionando o colapso da estrutura terciária e a desnaturação proteica, levando à coagulação e tornando-as insolúveis, na grande maioria das vezes de maneira irreversível (RHODES, 2013).

2.3.2 Fixadores Aldeídicos

A fixação química pela ação de compostos aldeídicos é amplamente utilizada para fixar estruturas subcelulares para microscopia de luz e eletrônica (SCHMIEDEBERG et al., 2009). São denominados fixadores aditivos, pois são capazes de realizar ligações covalentes entre as biomacromoléculas e assim criar uma trama de ligações cruzadas entre as proteínas, ácidos nucléicos e macromoléculas celulares, estabilizando o conteúdo intra e extracelular, formando uma espécie de gel transparente (SESSO, 2007; RHODES, 2013).

Solução aquosa de formalina a 10% e Paraformaldeído Tamponado 4%

O formaldeído é um gás incolor, obtido através da oxidação do metanol. É encontrado comercialmente na forma de uma solução na concentração de 37% ou 40% e podem apresentar em sua composição 7% a 15% de metanol, que é adicionado como um estabilizador para retardar sua polimerização. Ao se preparar uma solução aquosa de formaldeído comercial a 10%, de fato a solução estará a 3,7% ou 4%; apesar disso, convencionou-se chamar essa solução de solução aquosa de formalina 10% ou formaldeído a 10% (BUESA, 2008; MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010). Quando utilizamos formaldeído produzido a partir da solução aquosa, a fixação acontece em duas etapas inicialmente pelo metanol presente na solução, seguida da reticulação promovida pelo formaldeído (KIERNAN, 2000; SESSO, 2007). No entanto, o metanol, da mesma forma que o etanol, tem a desvantagem de agir como um agente desnaturante e coagulante das proteínas, o que acaba por introduzir artefatos indesejados na morfologia.

O formaldeído sem metanol em sua composição é obtido a partir da forma polimérica do formaldeído, o paraformaldeído. O paraformaldeído é um pó solúvel em meio aquoso e ligeiramente alcalino que precisa de tratamento mais energético sendo necessário o aquecimento, além da adição de uma fonte de íons hidróxido, para que sejam quebradas as grandes moléculas de polímero e obtenha-se a solução aquosa (KIERNAN, 2000; SESSO, 2007).

O formaldeído tem a capacidade de penetrar no tecido rapidamente, pois apresenta moléculas pequenas, porém as reações cruzadas com as proteínas ocorrem mais lentamente em relação a outros fixadores, como o glutaraldeído, como comentaremos a seguir.

Solução de Karnovsky

Até o início da década de 60, o único fixador considerado satisfatório para a microscopia eletrônica era o tetróxido de ósmio tamponado. A partir de então, a introdução do glutaraldeído, possibilitou acesso a um fixador de penetração mais rápida, capaz de insolubilizar completamente as proteínas e de menor potencial tóxico quando comparado ao tetróxido de ósmio (KIERNAN, 2000).

O glutaraldeído apresenta moléculas bastante pequenas, cada uma com dois grupos aldeídos em cada uma de suas extremidades. Devido à sua estrutura química, o potencial de reticulação é muito maior do que o do formaldeído, sendo capaz de realizar reações cruzadas de maneira rápida e ampla. Contudo, apesar do grande potencial de realização de ligações cruzadas, quando comparado ao formaldeído, o glutaraldeído apresenta velocidade de penetração no tecido muito menor (NEWMAN; HOBOT, 1999; KIERNAN, 2000).

A partir de 1965, Karnovsky teve a ideia de aproveitar os benefícios do paraformaldeído aos do glutaraldeído, associando em partes iguais, o formaldeído a 4%, obtido a partir do paraformaldeído, e o glutaraldeído 5% (KARNOVSKY, 1965). Essa associação de ambos os fixadores apresenta uma taxa de penetração mais eficiente, onde o formaldeído estabiliza temporariamente as estruturas que são posteriormente estabilizadas em definitivo pelo glutaraldeído presente na solução (BOZZOLA; RUSSEL, 1999).

2.3.3 Utilização de tampões associados aos fixadores

A utilização de tampões nas soluções fixadoras que apresentem pH fisiológico e osmolaridade similar à dos tecidos são essenciais na boa preservação da estrutura morfológica de forma a não introduzir artefatos induzidos por um choque eletrolítico ou de deformidades causadas pelo excesso ou perda de água no interior das células. Embora o tampão fosfato salino seja considerado como o mais compatível do ponto de vista fisiológico, apresenta a desvantagem de permitir o desenvolvimento de microrganismos quando estocado por períodos mais prolongados.

O tampão cacodilato de sódio, por sua vez, oferece vantagens sobre o fosfato permitindo estudos citoquímicos livres da interferência dos íons fosfato, preservação de certas enzimas mais propensas à degradação e resistir à contaminação por microrganismos como bactérias e fungos durante a estocagem, por possuir toxicidade elevada, já que contém arsênio (BOZZOLA; RUSSEL, 1999) . Por sua versatilidade, tem sido largamente utilizado principalmente para microscopia eletrônica, sendo um dos componentes da formulação original do fixador de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965).

2.4 Estrutura tegumentar dos anfíbios

O tegumento dos anfíbios é um órgão complexo muito organizado, apresentando diferentes tipos celulares e variados componentes extracelulares. Além disso, nos anfíbios, a pele é diferenciada para cada espécie considerada, prestando-se muito bem para a avaliação da boa preservação morfológica (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1993, 1995).

A pele nos anfíbios apresenta duas camadas distintas, epiderme e derme, separadas por uma fina membrana basal. A epiderme é a camada mais superficial e sua espessura pode apresentar entre três e sete camadas de células nos indivíduos adultos, sendo formada pelo estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e o estrato germinativo (HEATWOLE; BARTHALMUS, 1994; MENDES, 2015).

A derme, camada mais profunda, é subdividida em estrato esponjoso, composto de tecido conjuntivo frouxo associado a fibras intercalares, abrigando uma camada de cromatóforos, glândulas cutâneas, geralmente granulosa e mucosa, bem como vasos sanguíneos (MENDES, 2015; DEMORI et al., 2019). O estrato compacto é formado por uma série de camadas alternadas de feixes de fibras colágeno dispostas de forma cruzada e tecido conjuntivo denso modelado. Abaixo do estrato compacto está a tela subcutânea, composta principalmente por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e nervos (DUELLMAN; TRUEB, 1986; FOX, 1986).

As glândulas mucosas são, usualmente, acinosas, menores e mais numerosas em relação às glândulas granulosa. A porção secretora é geralmente composta por um epitélio cubóide ou colunar que é responsável pela síntese de uma secreção mucosa basófila, composta por proteoglicanas (DAPSON, 1970; HOUCK; SEVER, 1994). Esse muco intervém na respiração, economia hídrica e reprodução desses animais. Por outro lado, atua na defesa contra predadores, pois dificulta a sua captura através da lubrificação da pele (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1993b; STEBBINS; COHEN, 1995).

As glândulas granulosas são as principais responsáveis pela defesa dos anfíbios contra potenciais predadores, uma vez que produzem secreções tóxicas para muitos vertebrados (LUTZ, 1966; TOLEDO; JARED, 1995). São, em geral, maiores do que as glândulas mucosas e formadas por um sincício desprovido de lúmen, cujo citoplasma, na sua porção periférica produz os grânulos de secreção que se acumulam na região central. (DELFINO; NOSI; GIACHI, 2001; MAILHO-FONTANA et al., 2022).

As glândulas granulosas podem apresentar características especiais em certas regiões do corpo dos animais, aumentando de tamanho e se acumulando, formando protuberâncias conhecidas como macroglândulas, presentes principalmente nos sapos (TOLEDO; JARED, 1995; JARED et al., 2009; MAILHO-FONTANA et al., 2014).

Ambas as glândulas, mucosas e granulosas, são alveolares e envolvidas por uma camada de células mioepiteliais que auxiliam na liberação do material sintetizado (TOLEDO; JARED, 1995).

Na derme de muitas espécies de anuros, encontra-se também a camada de Eberth-Kastchenko ou camada calcificada, localizada entre o estrato esponjoso e o estrato compacto. Essa camada é formada por depósitos globulares de fosfato de cálcio e proteoglicanas e, apesar de sua função não estar plenamente compreendida, algumas hipóteses são de que a camada calcificada atue como uma proteção contra a dessecação e predadores, como uma reserva de mobilização e armazenamento de cálcio, ou ainda que seja vestígio de um esqueleto dermal herdado dos primeiros anfíbios a colonizar o ambiente terrestre (TOLEDO; JARED, 1993a, 1993b; KATCHBURIAN et al., 2001; JARED et al., 2005; CENTENO et al., 2015).

3. MÉTODOS

O material utilizado na pesquisa foi submetido ao comitê de ética CEUA Nº 3207031219 na comissão de ética no uso de animais da FMVZ – USP e encontrava-se depositado no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas - Coleção Herpetológica do Instituto Butantan sob o documento Nº: 27012020.

3.1 Espécimes utilizados

Para esse estudo, foram utilizados fragmentos de pele dorsal e ventral de 12 espécimes adultos machos de *Trachycephalus mesophaeus*, de peso aproximado (20 a 25g) e comprimento rostro-cloacal equivalente, que foram coletados no mesmo dia e local, em Ilhéus, BA. A eutanásia dos animais foi realizada através de injeção intracelomática de dose letal de tiopental sódico (50 mg/Kg). Em seguida, os animais foram injetados com os seguintes fixadores:

1. Etanol 70% (n=3)
2. Formalina 10% (n=3)
3. Paraformaldeído 4% em tampão PBS (n=3)
4. Solução de Karnovsky (glutaraldeído 5% + paraformaldeído 4%, em tampão cacodilato de sódio, 0,1M, pH, 7,2) (n=3)

3.1.1 Preparo dos fixadores

A fim de garantir a melhor eficácia na fixação dos tecidos, as soluções fixadoras foram preparadas momentos antes da aplicação, segundo as recomendações de preparação descritas a seguir:

1. Etanol 70%:

Para obtenção do etanol 70% foi realizada diluição de Etanol absoluto PA (**Synth**) em água destilada, na proporção de 300ml de água destilada para cada 100ml de etanol absoluto.

2. Solução aquosa de formalina 10%

Para o preparo da solução aquosa de formalina a 10%, foi utilizada a solução estoque de formalina a 37% diluída em água destilada na proporção de 100ml de solução estoque de formalina a 37% em 900ml de água destilada.

3. Paraformaldeído Tamponado

Para a preparação desse fixador, foi utilizada a seguinte receita:

1. Diluir 20g de paraformaldeído em 450 ml de água destilada aquecida.
2. Acrescentar gradualmente à mistura, algumas gotas de NaOH 1N até a solução se tornar transparente.
3. Acrescentar 4,5 de NaCl e 50 ml de tampão fosfato 0,1M
4. Filtrar a solução em filtro de papel e reservar em geladeira.

4. Karnovsky original

Este fixador é preparado a partir da mistura da solução A e B. Segue o protocolo das soluções:

Solução A: Misturar 10ml de glutaraldeído 50% com 40 ml de cacodilato de sódio 0,2M em pH 7,2

Solução B: Solução de paraformaldeído 4% recém-preparada.

O procedimento de fixação dos animais seguiu o protocolo adotado no laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan. O processo de fixação inicia-se com a injeção do fixador pela via intracelomática. As características fisiológicas dos anfíbios permitem que o agente fixador seja distribuído de maneira eficiente através dessa via, no entanto também é realizada administração do fixador pelas cavidades naturais como a cavidade oral e a cloaca, além da aplicação intracraniana para melhor fixação do encéfalo e estruturas da cabeça.

Após injeção com o agente fixador, o animal era posicionado na placa de petri, coberto com toalha de papel embebido com fixador, embalado com filme plástico de PVC e deixado sob ação do fixador por 24 horas. Após esse período, foram retiradas amostras de pele de locais equivalentes em todos os animais, correspondendo ao meio do dorso e ao meio do ventre (**Figura 1**). Após a retirada dos fragmentos de pele os animais foram conservados em solução de etanol 70%.

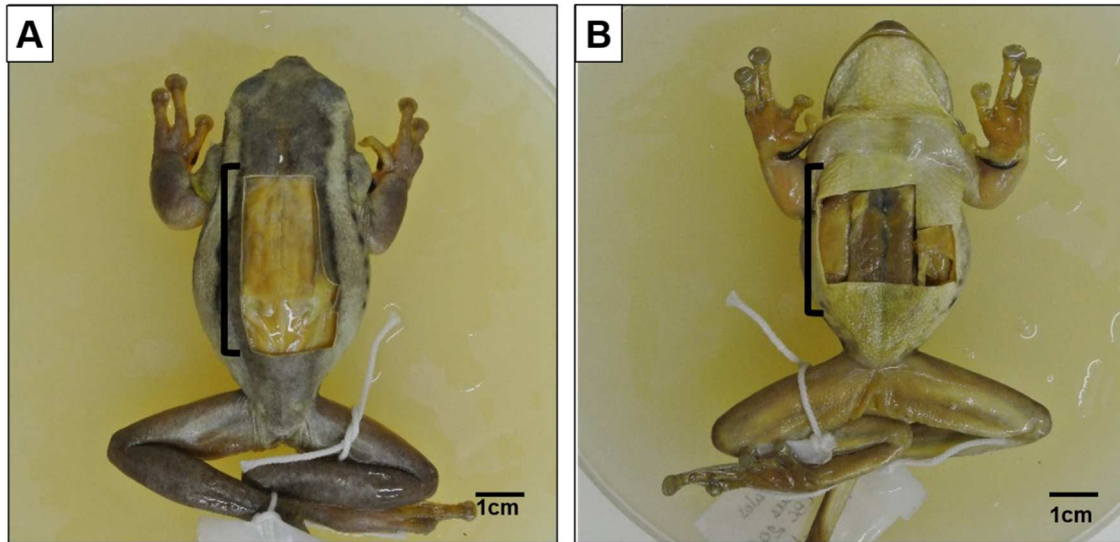


Figura 1. Fotografia da perereca *Trachycephalus mesophaeus*. Em **A** observar animal em decúbito ventral evidenciando a região amostrada da pele (régua). Em **B** observar animal em decúbito dorsal indicando a região amostrada da pele (régua). Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

3.2 Estudo histológico

3.2.1 Processamento em historresina

As amostras de pele dorsal e ventral foram desidratadas gradualmente em álcool etílico e incluídas em e historresina (Leica®) de acordo com o seguinte protocolo:

1. Desidratação em série alcoólica crescente (70%, 95% e 100%);
2. Pré-embebição em **solução A** (peróxido de benzoíla e resina) e álcool 100% (1:1) por 2 horas em rotação;
3. Embebição em **solução A** pura, "overnight", em rotação constante;
4. Inclusão em **solução B** (**solução A** e polimerizador hardener), em moldes plásticos e polimerização à temperatura ambiente com a proteção de parafilme sobre a superfície.

3.3 Microtomia em historresina

O material incluído em historresina, após trimagem, foi cortado na espessura de 2 μm em micrótomo Leica RM 2255, utilizando navalhas de vidro,

distendidos sob gotas de água destilada sobre a lâmina e secos em chapa quente.

3.3.1 Estudo histoquímico (Bancroft & Stevens, 1999; Kiernan, 2001).

Os cortes obtidos de cada uma das regiões da pele foram submetidos a colorações gerais, os cortes em historresina foram corados com azul de toluidina-fucsina, de acordo com os protocolos descritos a seguir:

Método de coloração azul de toluidina e fucsina (ATF)

1. Corar com azul de toluidina a 0,1% por cerca de 40 segundos;
2. Lavar com água destilada;
3. Corar com fucsina básica a 0,05% por cerca de 5 segundos;
4. Lavar com água destilada e secar na chapa quente;
5. Montar a lâmina com entellan.

Como resultado da coloração básica de Azul de toluidina e fucsina, temos a identificação de estruturas basofílicas em azul pelo azul de toluidina, e do citoplasma em magenta pela fucsina.

Além dessas colorações os cortes foram submetidos a algumas técnicas de coloração histoquímica, sendo: ácido periódico-Schiff (PAS) para a identificação de carboidratos, azul de bromofenol para indicar a presença de proteínas; von Kossa para a indicação da presença de cálcio.

Abaixo, os métodos histoquímicos utilizados:

Método do ácido periódico de Schiff (PAS)

1. Hidratar os cortes;
2. Imergir em solução aquosa de ácido periódico 1% por 20 minutos (historresina) e 10 minutos (parafina);
3. Lavar rapidamente com água destilada;
4. Tratar com reativo de Schiff por 30 minutos (parafina) e 45 minutos (historresina);
5. Lavar 3 vezes em água sulfurosa por 3 minutos;
6. Lavar por 30 minutos em água corrente;
7. Montar a lâmina com entellan.

Resultado: Identificação em magenta de carboidratos de uma maneira geral.

Método de azul de bromofenol

1. Corar a solução em azul de bromofenol durante 15 minutos.
2. Diferenciar em ácido acético 0.5 % por 3 vezes.
3. Banho em solução tampão PBS.
4. Passar rapidamente em água.
5. Desidratar o corte naturalmente (deixar secar).
6. Montar em Entellan.

Resultado: Identificação em azul dos locais abundantes em proteínas.

Método de von Kossa

1. Corar em solução de Nitrato de prata (AgNO_3), sob luz forte do dia (acender uma lâmpada) por uma hora.
2. Lavar em água destilada por 1 a 2 minutos.
3. Reduzir a prata imergindo os cortes em solução de hidroquinona 0.5%, ou qualquer outro revelador, por 2 minutos, agitando sempre.
4. Tratar a solução com hipossulfito de sódio a 5% durante 2 minutos e verificar no microscópio de luz. Se necessário deixar mais 1 minuto para tirar o excesso de AgNO_3 .
5. Lavar em água destilada.
6. Contra corar com safranina 0,2 a 0,5 %, durante 20 segundos.

Resultados: Camada calcificada corada em preto.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo histológico geral

A espécie *Trachycephalus mesophaeus* apresenta uma pele com aspecto liso, brilhante e com intensa produção de secreção cutânea. Na região dorsal apresentam-se duas listras escuras que se estendem da cabeça até o meio do dorso. A pele do ventre é bem vascularizada e despigmentada e apresenta aspecto mais delgado.

Quando observada por meio de cortes histológicos, a pele se mostra dividida em estrato córneo, epiderme e derme. A epiderme é caracterizada por ter seis camadas celulares e uma fina camada córnea. A derme é dividida em estrato esponjoso e estrato compacto. O estrato esponjoso, mais superficial, é composto inicialmente por uma camada de pigmentos (presentes em maior abundância na região dorsal), que se localizam logo abaixo da epiderme, em seguida, observa-se um grande número de glândulas granulosas e dois tipos de glândulas mucosas (nesse trabalho denominadas como tipo I e tipo II) que ocupam todo o volume do estrato esponjoso. Diferente da pele dorsal, na região ventral a pele possui a predominância de glândulas mucosas e poucas glândulas granulosas.

Entre o estrato esponjoso e o estrato compacto há uma espessa camada de depósito de cálcio denominada de camada calcificada. O estrato compacto é composto basicamente por fibras de colágeno com disposição entrelaçada e células do tecido conjuntivo denso, os fibroblastos. Abaixo do estrato compacto na face interna da pele, há a ocorrência de intensa vascularização (**Figura 2**).

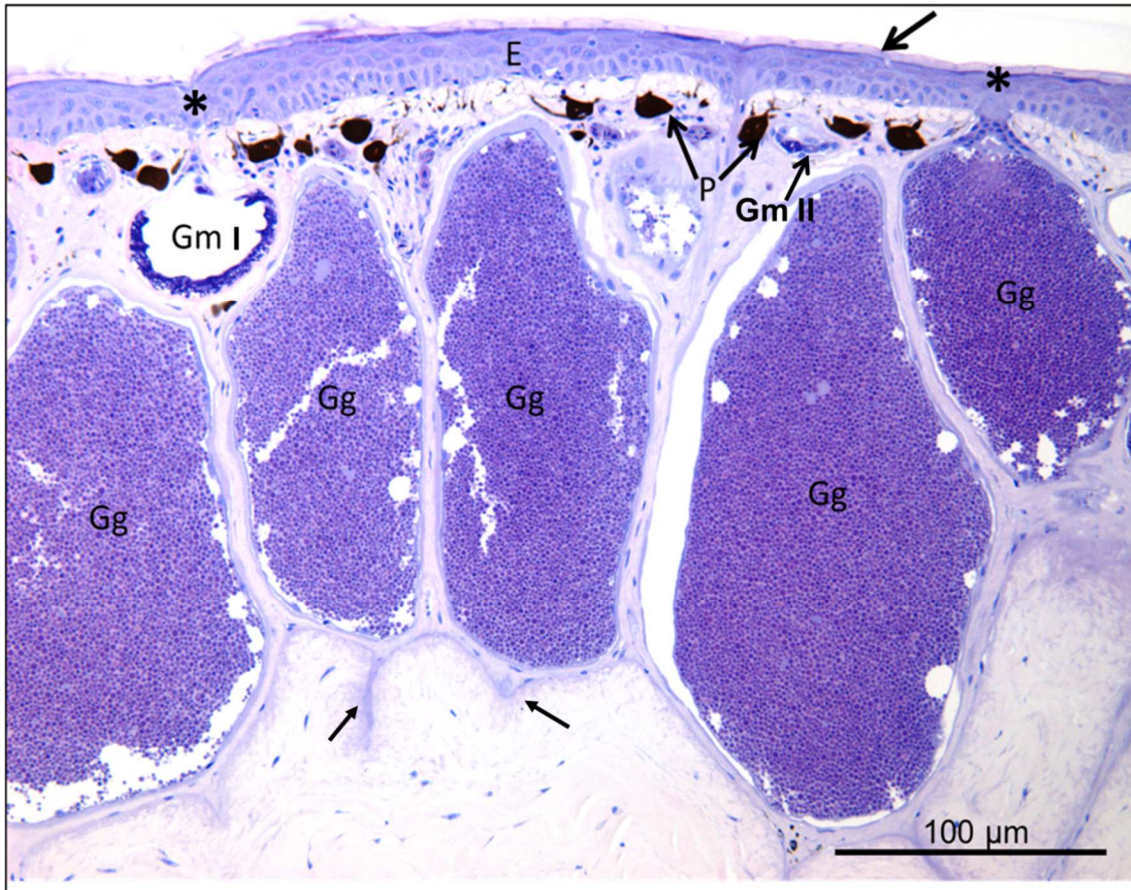


Figura 2. Fotomicrografia geral da pele dorsal de *Trachycephalus mesophaeus*. Legendas: Epiderme (E), glândula mucosa tipo I (Gm I), glândula mucosa tipo II (Gm II), glândula granulosa (Gg) células de pigmento (P), camada córnea (seta maior), dutos glandulares (*), camada calcificada (setas pequenas). Coloração em Azul de Toluidina-Fucsina. Agente fixador solução de Karnovsky. Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

As glândulas granulosas são maiores do que as mucosas, não apresentam lúmen, e são repletas de grânulos de secreção esféricos. As glândulas mucosas são acinosas e estas por um epitélio simples que se abre para um lúmen central. Elas são de dois tipos com células reagindo diferentemente às reações histoquímicas. Tanto as glândulas granulosas como as mucosas apresentam uma camada mioepitelial que as reveste externamente. No entanto, a camada mioepitelial da glândula granulosa é mais espessa. Ambas as glândulas são conectadas à superfície da pele através de dutos (**Figura 3**).

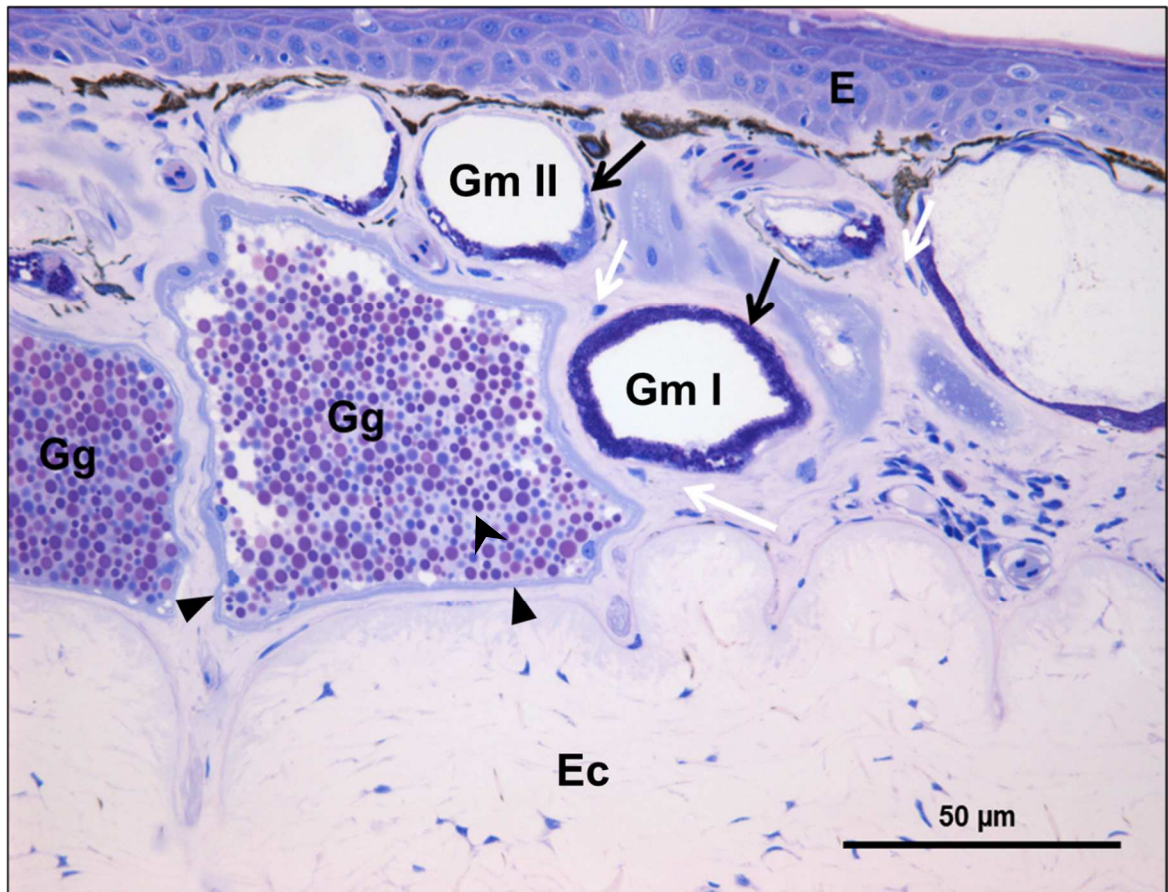


Figura 3. Fotomicrografia da pele dorsal de *Trachycephalus mesophaeus*. Observa-se a presença dos dois tipos de glândulas mucosas Gm I e Gm II (setas pretas). Capilares sanguíneos (setas brancas). Camada mioepitelial (cabeças-de-seta). Extrato compacto da derme (Ec). Coloração em Azul de Toluidina-Fucsina. Agente fixador solução de Karnovsky. Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

As reações histoquímicas na **Figura 4** identificaram que as glândulas granulosas são fracamente positivas ao PAS e altamente positivas ao azul de bromofenol, indicando conteúdo proteico. As glândulas mucosas tanto do tipo I e do tipo II apresentam células positivas ao PAS, porém nas glândulas do tipo I os dois tipos celulares são reativos, um com mais intensidade que o outro. A glândula do tipo II possui um tipo celular não reativo ao PAS. Já em relação a proteínas e glicoproteínas, que se coram pelo azul de bromofenol, nota-se que no tipo I, somente uma das células possui forte positividade, enquanto no tipo II todas as células são medianamente positivas.

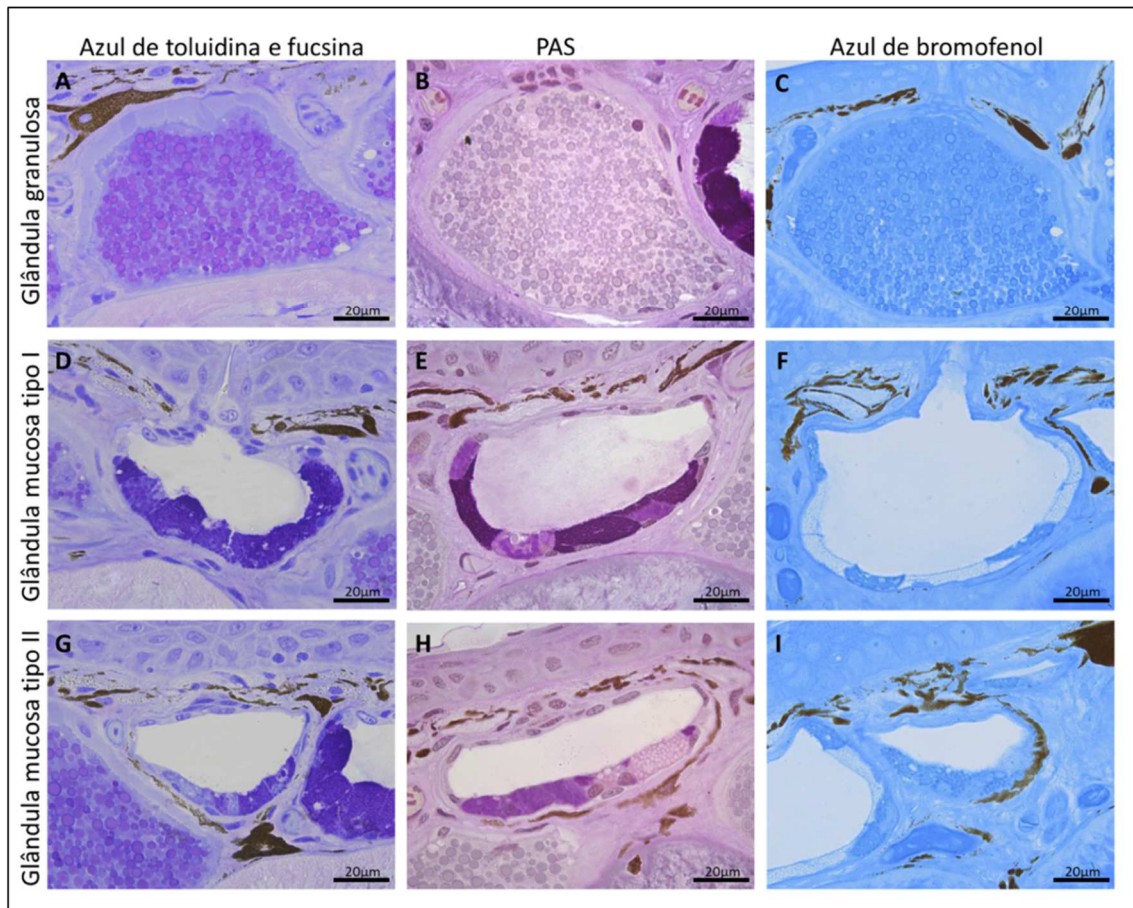


Figura 4. Fotomicrografias das glândulas em coloração básica de azul de toluidina e fucsina, histoquímica de PAS e azul de bromofenol respectivamente; granulosa ou de veneno (A, B, C); mucosa do tipo I (D, E, F) e mucosa do tipo II (G, H, I). Agente fixador solução de Karnovsky. Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

Foi observada também uma espessa e curvilínea camada calcificada entre o estrato esponjoso e o estrato compacto, tanto na pele dorsal como na ventral, sendo que, na pele ventral essa camada é mais fina. Essa camada se destaca em preto quando é utilizado o método de von Kossa, através da marcação do cálcio (**Figura 5**).

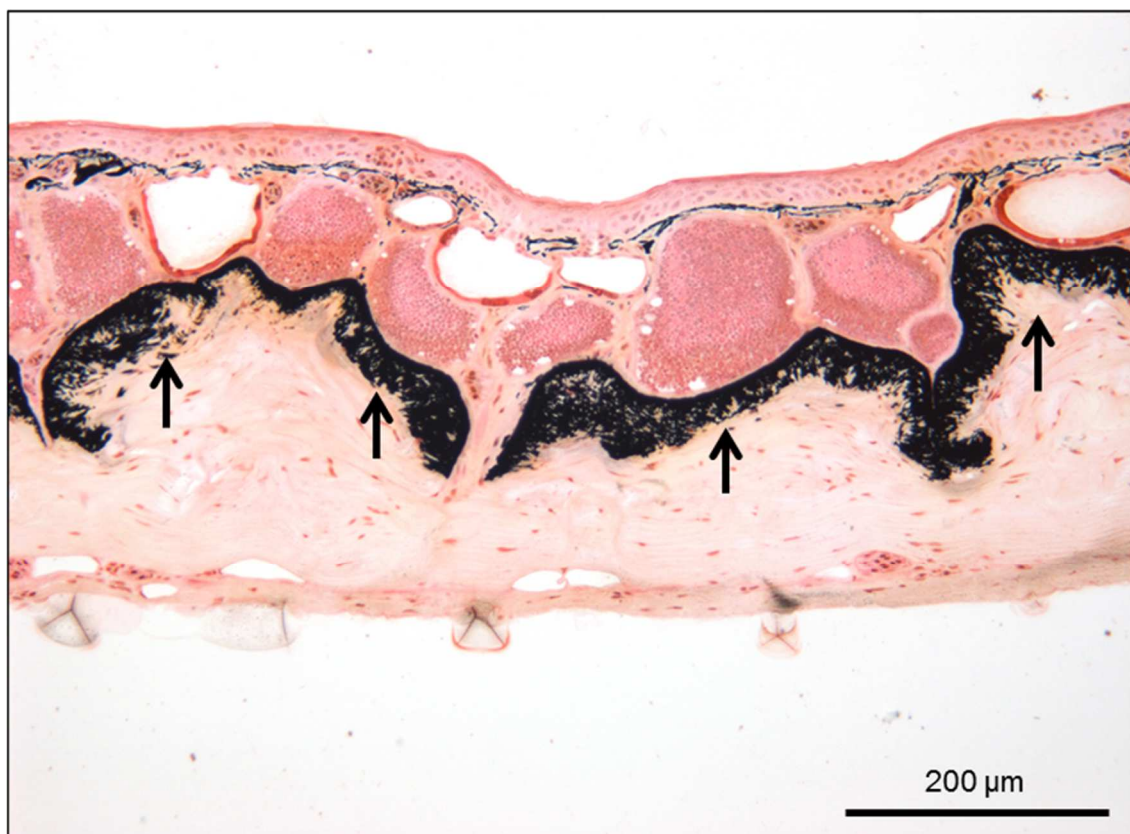


Figura 5. Fotomicrografia de pele dorsal de *Trachycephalus mesophaeus*. Evidencia-se a presença da camada calcificada corada em preto (setas). Coloração em von Kossa. Agente fixador solução de Karnovsky. Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

4.2 Avaliação dos fixadores

Os materiais fixados em etanol 70% apresentaram os piores resultados morfológicos em termos de qualidade. As amostras apresentaram-se mal preservadas e com falta de definição da morfologia e um aspecto lavado dos tecidos. Apenas as membranas celulares, fibras do tecido conjuntivo e um pouco dos pigmentos permaneceram mais bem conservados. Além disso, houve uma grande retração da pele, o que causou, inclusive, dificuldades na retirada das amostras do animal e no processamento e confecção dos cortes histológicos. De uma maneira geral, a pele teve uma redução de metade da sua espessura original. Quanto à coloração, o tempo utilizado com as amostras no etanol foi diferente do tempo utilizado para corar os materiais com outros fixadores. Tanto na coloração geral como em todas as histoquímicas foi observado que as glândulas mucosas não puderam ser identificadas em nenhuma das amostras, tendo sido destruídas. As glândulas granulosas (ou de veneno) foram identificadas em algumas das amostras, porém com o conteúdo quase que

inteiramente perdido. A epiderme sofreu grande retração e teve a maior parte das suas células perdida. Da mesma forma, não foram preservados os vasos sanguíneos das amostras, destruídos pela má fixação.

A solução aquosa de formalina 10% apresentou melhor conservação do material quando comparada ao etanol 70%, porém sofrendo um pouco de retração nos tecidos. A preservação do material foi heterogênea, sendo que, em algumas regiões as glândulas mucosas foram mais bem preservadas do que em outras. Quanto às glândulas granulosas (ou de veneno), houve também preservação parcial das estruturas, com algumas regiões mais íntegras e outras com perda de conteúdo. Assim como as glândulas, os vasos sanguíneos também foram parcialmente conservados.

Os melhores resultados foram obtidos nas amostras fixadas em paraformaldeído tamponado e solução fixadora de Karnovsky. A coloração se mostrou homogênea em toda a primeira porção da derme. Foi possível observar uma grande quantidade de vasos sanguíneos no estrato esponjoso no entorno das glândulas e na tela subcutânea (**Figuras 6 e 7**). Os núcleos das células da epiderme ficaram muito evidentes. Todos os componentes do estrato esponjoso e compacto da derme se apresentaram muito bem preservados, mostrando uma grande riqueza de detalhes. As glândulas mucosas se apresentaram bem íntegras, sendo possível fazer claramente a distinção entre os dois tipos glandulares existentes. Da mesma forma, o conteúdo das glândulas de veneno foi muito bem preservado, sendo possível a observação da forma e conteúdo dos grânulos. Especialmente nas amostras fixadas em Karnovsky, os grânulos não sofreram nenhum deslocamento no interior das glândulas e mostraram com precisão a sua morfologia interna, sendo possível identificar que a secreção venenosa forma diferentes compartimentos evidenciados por diferenças na tonalidade dos corantes. A camada mioepitelial, também se mostrou muito bem preservada ao redor das glândulas.

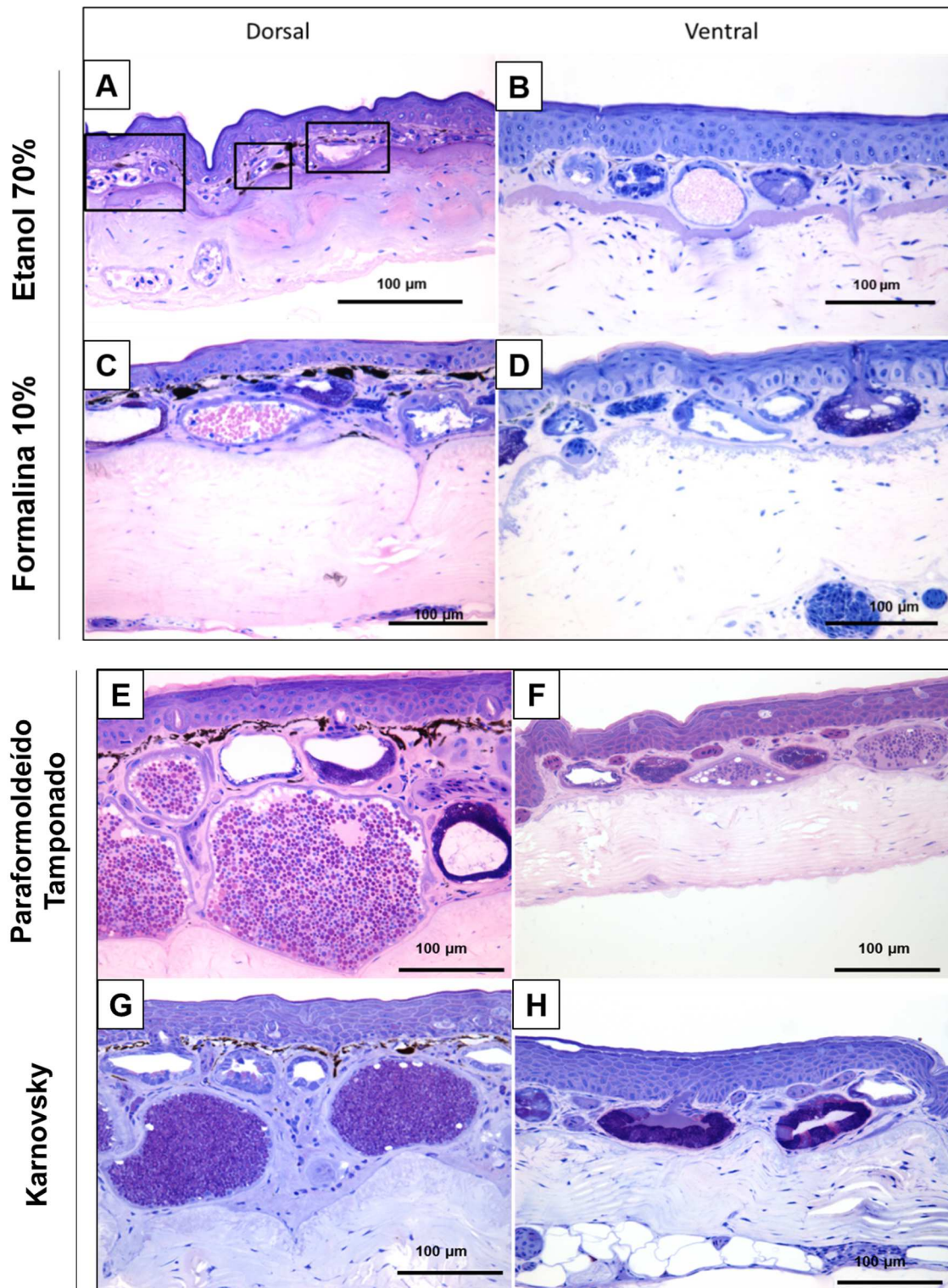


Figura 6. Fotomicrografia das quatro amostras de pele dorsal e ventral de *Trachycephalus mesophaeus* e seus respectivos fixadores corados pelo azul de toluidina-fucsina. Nota-se diferença muito significativa entre o material fixado com etanol e o material fixado em paraformaldeído tamponado e Karnovsky. No material fixado em etanol (A e B), notar a grande retração da pele, que perdeu praticamente metade da sua espessura, e as glândulas do estrato esponjoso, praticamente destruídas (destacadas nos retângulos), No material fixado em formalina 10% (C e D), a preservação é parcial: já é possível a distinção entre os dois tipos de glândulas mucosas e, nas glândulas granulosas, os grânulos estão parcialmente conservados. O material fixado em paraformaldeído tamponado (E e F) e Karnovsky (G e H) mostrou uma ótima conservação das estruturas, especialmente nas amostras fixadas em Karnovsky, pode-se distinguir claramente os diferentes tipos celulares presentes nas glândulas mucosas e os grânulos no interior das glândulas de veneno. Coloração em Azul de Toluidina-Fucsina. Agente fixador solução de Karnovsky. Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

Quando realizadas as histoquímicas, o material fixado em etanol 70%, não apresentou nenhuma diferenciação, não sendo possível detectar a presença de polissacarídeos, no caso de PAS, e proteínas, no caso de azul de bromofenol. Em relação à reação histoquímica de von Kossa, apesar de ter sido possível a detecção da camada calcificada, esta se apresentou muito reduzida, deformada, sem sua forma usual em arcos.

No material fixado com solução aquosa de formalina 10%, as reações histoquímicas mostraram resultado um pouco mais satisfatório sendo possível a diferenciação das estruturas através da coloração. Foi possível detectar o conteúdo das glândulas, e a camada calcificada conservou-se de maneira que mostrasse os arcos ao longo da derme. O paraformaldeído tamponado e a solução de Karnovsky se mostraram, assim como nas colorações básicas, os fixadores que melhor preservaram o material, fornecendo os resultados mais precisos para as técnicas empregadas (**Figura 7**).

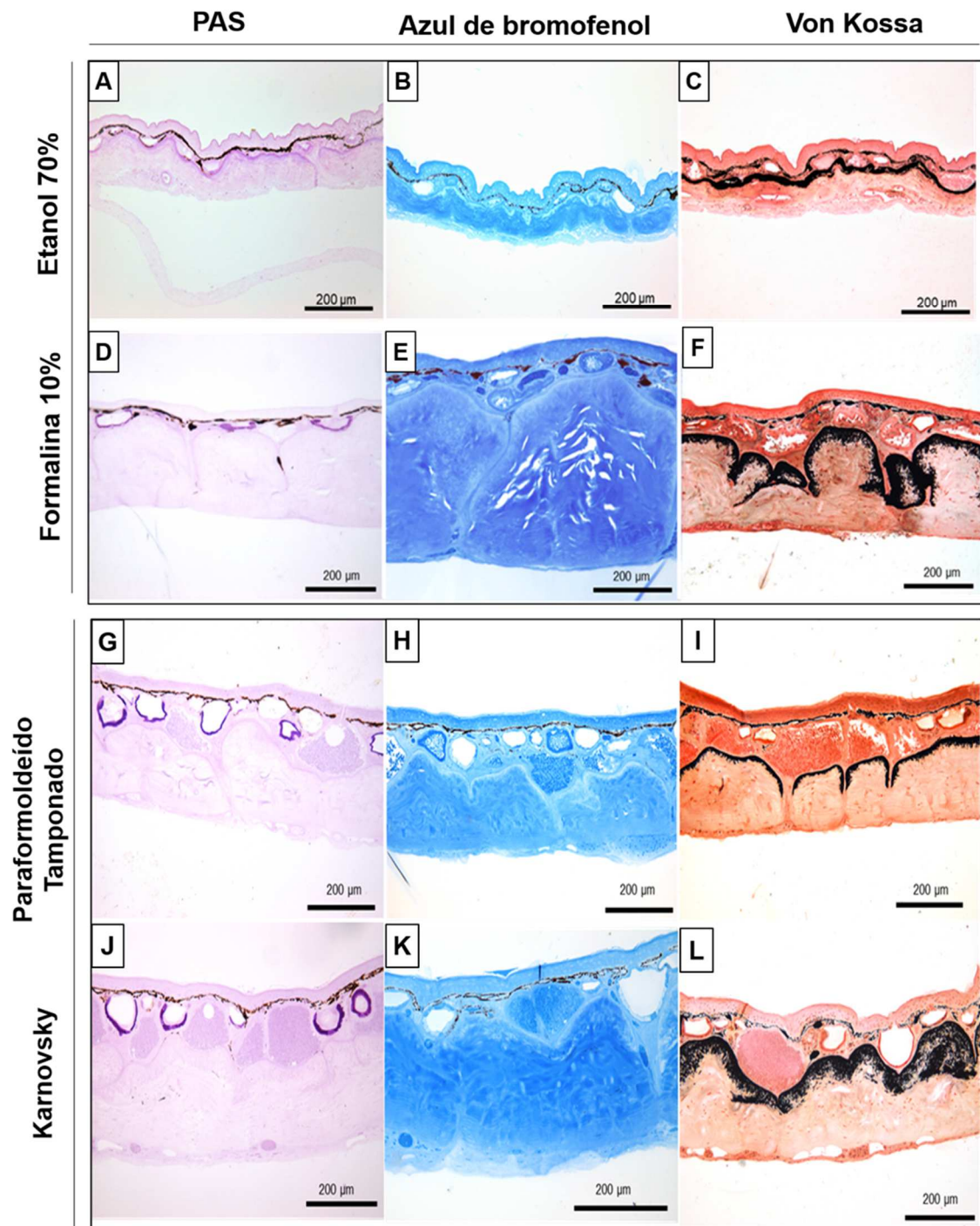


Figura 7 (A-L). Fotomicrografia da pele dorsal de *Trachycephalus mesophaeus* após a aplicação das técnicas histoquímicas PAS, azul de bromofenol e Von Kossa. Nota-se a gradativa melhora na positividade e detalhamento das estruturas, desde a fixação no etanol 70% (A, B e C), passando pela formalina 10% (D, E e F) e paraformaldeído tamponado (G, H e I) até a solução de Karnovsky (J, K e L). Colorações em PAS, Azul de bromofenol e Von Kossa. Fonte: SILVA, A.B.C (2020).

5. DISCUSSÃO

A pele de *Trachycephalus mesophaeus*, de modo geral, segue padrão similar ao dos demais anfíbios (DUELLMAN; TRUEB, 1986). O estrato córneo é formado por uma única camada de células queratinizadas, seguido de epiderme e derme dividida em estrato esponjoso, mais superficial, e compacto, mais profundo (TOLEDO; JARED, 1993a; RIGOLO; ALMEIDA; ANANIAS, 2008). O estrato esponjoso apresenta cromatóforos logo abaixo da epiderme que favorecem a mudança de coloração da pele, vasos sanguíneos, e glândulas mucosas e granulosas. O estrato compacto é composto principalmente de fibras colágenas e é seguido internamente pela tela subcutânea.

A característica mais marcante da pele de todos os anfíbios é a presença de glândulas cutâneas, sendo elas, granulosas (produtoras de veneno) e mucosas (produtoras de muco). Apesar de, em geral, as glândulas mucosas serem mais numerosas e menores que as granulosas (DAPSON, 1970; HOUCK; SEVER, 1994), em *Trachycephalus mesophaeus*, foi observado que na pele dorsal as glândulas granulosas se apresentam em número similar ao das mucosas, além de possuírem grandes dimensões. As glândulas granulosas são o principal meio de defesa dos anfíbios contra predadores (LUTZ, 1966; TOLEDO; JARED, 1995). Assim, esse maior número e tamanho das glândulas no dorso possivelmente está relacionado com a necessidade de uma maior proteção nessa região que é mais exposta e, portanto, mais suscetível à predação, principalmente pelo fato de essa espécie apresentar reprodução explosiva, período no qual os indivíduos permanecem particularmente vulneráveis. É interessante notar que os machos durante o acasalamento mudam de cor, passando do tom castanho amarelado, que normalmente apresentam, para uma cor amarelo brilhante (observações pessoais, C. Jared), possivelmente sinalizando aos predadores o efeito tóxico de suas secreções cutâneas, fenômeno denominado apossematismo (DUELLMAN; TRUEB, 1986; STEBBINS; COHEN, 1995). Na pele ventral, predominam as glândulas mucosas, e as granulosas são esparsamente encontradas. Essas glândulas mucosas, além do papel na respiração cutânea, atuam na lubrificação da pele do animal, dificultando assim, sua captura por predadores (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1993b; STEBBINS; COHEN, 1995).

Como resultado da abundância glandular tanto na região dorsal como na ventral, *T. mesophaeus*, quando manipulado, produz uma abundante secreção que além de mucosa, é também altamente pegajosa, o que deve dificultar ainda mais a predação, colando a boca do predador na tentativa de um ataque. Acresce que, pelo menos à primeira vista, notamos que a camada mioepitelial das glândulas granulosas dessa espécie é muito visível, dada a maior espessura que apresenta quando comparada às glândulas mucosas, ou mesmo às glândulas granulosas de outras espécies de anuros já examinadas em nosso laboratório. A camada mioepitelial, de um modo geral, tem o papel de comprimir a glândula, forçando a expulsão da secreção pelo ducto e liberando seu conteúdo para a superfície do corpo (DOCKRAY; HOPKINS, 1975).

Os resultados positivos para PAS e azul de bromofenol confirmam os resultados de DAPSON, 1970, que demonstraram que o conteúdo das glândulas mucosas é composto primariamente por mucopolissacarídeos, enquanto as glândulas granulosas, em geral, são ricas em material proteico.

A camada calcificada presente entre o estrato esponjoso e o estrato compacto é uma adaptação que evita que os anfíbios percam água, controlando o balanço hídrico do organismo (TOLEDO; JARED, 1993a). Sabe-se que entre os anfíbios a região ventral posterior, denominada região inguinal, é uma área de alta absorção de água, o que pode explicar a ausência de camada calcificada, e a fina espessura dessa região, além da alta vascularização. Ao contrário da região inguinal, as peles dorsal e ventral possuem camada calcificada espessa. Na região dorsal, a camada calcificada é muito mais espessa que na ventral, e isso provavelmente está relacionado ao fato de a região ventral ser mais protegida contra a perda de água e menos exposta ao ambiente (TOLEDO; JARED, 1993a).

Em relação aos testes com os quatro tipos de fixadores, observamos que a formalina preservou apenas parcialmente o material, removendo parte dos componentes dos tecidos e mostrando retração das estruturas e falta de homogeneidade na preservação. Os fixadores que melhor preservaram as amostras foram o paraformaldeído tamponado e em especial o Karnovsky, fixador que além de conter o glutaraldeído acrescido ao paraformaldeído, é também uma solução tamponada, o que preserva muito melhor as células. De

fato, observou-se que a solução aquosa de formalina 10%, (ou seja, sem o uso de tampão), preservou apenas parcialmente o material, o que é resultado de uma fixação lenta, confirmando o que foi constatado por ABRAHÃO et al. (2004). Esses autores testaram cinco diferentes fixadores em fígado de camundongo e mostraram que os melhores resultados foram obtidos com o fixador de Karnovsky e o paraformaldeído tamponado. No nosso estudo, esses dois fixadores apresentaram estruturas sem artefatos e com boa definição dos detalhes estruturais, tornando possível, inclusive a visualização de detalhes internos dos grânulos de secreção, o que dá um bom direcionamento para uma posterior análise por microscopia eletrônica. Ou seja, esses fixadores, principalmente quando utilizados com emblocamento em historresina, funcionam como uma pré-microscopia antes da análise ultraestrutural.

Trabalhos como o de AMARAL et al. (2004) demonstrou que tecidos extraídos de biópsias de endométrio de éguas mostravam melhores resultados quando fixados em formalina em comparação ao fixador de Bouin, que não foi utilizado nesse trabalho. CAMPOS; TAFURI; PINTO (2016), avaliaram a orelha de cães, comparando fixações realizadas com formaldeído a 10% tamponado, fixador de Bouin, e fixador de Carnoy, e verificaram melhores resultados obtidos com o formaldeído a 10% tamponado. Esses resultados estão de acordo com os obtidos nesse estudo, demonstrando o bom grau de preservação de fixadores diluídos em tampão, ainda que não tenham sido feitos a partir do paraformaldeído, que representa a forma mais pura do formaldeído, sem a mistura com o metanol e outras impurezas, como já comentado na Introdução. Entretanto trabalhos como o de BUESA, (2008) descrevem desvantagens no uso da formalina como fixador, apontando o seu efeito tóxico e cancerígeno, pobre na preservação de ácidos nucleicos e proporcionando uma fixação lenta, o que dificulta uma boa preservação, assim como o descrito nesse trabalho.

A fixação com o etanol 70% foi avaliada como a de pior qualidade, causando muita deformação e destruindo os tecidos em grande parte, corroborando o que foi demonstrado por DOS SANTOS et al. (2012), ao testarem seis tipos de fixadores em folículos ovarianos bovinos. Esses autores confirmaram a forte retração do material fixado em etanol 70%. Por outro lado, demonstraram que suas amostras fixadas em paraformaldeído e formalina 10%

também tiveram um resultado ruim, apresentando muita retração tecidual. Esses dados diferem daqueles aqui apresentados em *T. mesophaeus*, mas poderiam ser explicados pela particular dificuldade na fixação dos folículos por aqueles autores.

De qualquer maneira, o que foi constatado nesse trabalho é que a utilização da fixação por etanol 70% é muito prejudicial à preservação das estruturas morfológicas. Quando aplicada em espécimes coletados no campo desperdiça em grande parte o material que posteriormente será tombado em coleção zoológica, inviabilizando o bom uso desse rico material para pesquisas posteriores focadas em estudos histológicos, e morfométricos, uma vez que causa grande retração (ou encolhimento) nos tecidos que compõem o animal. Ao contrário, este trabalho deixa clara a necessidade da utilização de fixadores que contenham aldeídos e que sejam de preferência tamponados a fim de melhor preservar o material.

Até o advento da biologia molecular, nas últimas décadas do século XX, os animais preservados nas coleções zoológicas são e serão muito úteis para os estudos morfológicos. A partir de então, o que constata é uma supervalorização da preservação genética em detrimento da morfológica, em especial, entre os vertebrados, o caso dos anfíbios. Para que haja um aproveitamento integral dos espécimes tombados é necessário que após a eutanásia do animal por dose letal de anestésico proceda-se a retirada de amostras de tecidos para a coleta de DNA, em geral músculo e fígado, que devem ser necessariamente preservados em etanol. Em seguida deve-se proceder a preservação integral do espécime em fixadores aldeídos conforme o já discutido. Dessa forma, faz-se muito necessária a conscientização dos coletores e responsáveis pelas coletas em campo para que a prática do uso do etanol 70% como fixador seja urgentemente abandonada. O futuro da representatividade da nossa biodiversidade nas coleções depende da mudança dessa conduta.

6. CONCLUSÕES

- A pele da perereca *Trachycephalus mesophaeus* apresenta glândulas granulosas de grandes dimensões e em maior número na região dorsal. Os grânulos dessas glândulas são altamente reativos ao azul de bromofenol, confirmando a natureza química proteica dessa secreção;
- As glândulas mucosas encontram-se distribuídas de maneira homogênea nas regiões dorsal e ventral e apresentam-se de dois tipos distintos. A origem química da secreção dessas glândulas é majoritariamente de polissacarídeos positivos para a reação de PAS. Algumas células do epitélio glandular, porém, apresentam positividade à reação do azul de bromofenol, indicando a existência de glândulas mistas com grânulos de secreção de origem proteica.
- A reação histoquímica de von Kossa demonstrou a presença de uma camada calcificada espessa e de formato característico em arcos na região dorsal.
- Os diferentes fixadores mostram diferentes resultados em relação à preservação das amostras de pele. Portanto, é muito importante o uso do fixador adequado, de acordo com cada objetivo pretendido na análise morfológica.
- O etanol 70% é um fixador de baixíssima qualidade para análises morfológicas, tornando inviável qualquer estudo envolvendo tecidos fixados por este agente. Sendo assim, os pesquisadores em campo devem evitar a todo custo utilizar o etanol como fixador.
- O paraformaldeído tamponado e o fixador de Karnovsky são os melhores fixadores em termos de preservação, produzindo poucos artefatos, mantendo o arranjo espacial das estruturas, e preservando a natureza química das secreções e outros compostos presentes nos tecidos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, D. et al. Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 248–254, 2004.

AMARAL, D. et al. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 7–12, 2004.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy Principles and Techniques for Biologists**. Toronto: Jones and Bartlett, 1999.

BROWN, T. W. A caution on handling *Trachycephalus venulosus* (Anura: Hylidae); toxic effects of skin secretion on human eyes. **Herpetological Bulletin**, n. 152, Summer 2020, p. 28–29, 2020.

BUESA, R. J. Histology without formalin? **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 12, n. 6, p. 387–396, dez. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1092913408000816>>.

CAMPOS, L. S. S.; TAFURI, W. L. L.; PINTO, A. J. W. J. W. Avaliação de diferentes fixadores na preservação das características histológicas de pele de orelha de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1212–1218, out. 2016.

CARVALHO-E-SILVA, S. P. de; GARCIA, P. **Trachycephalus mesophaeus**. **The IUCN Red List of Threatened Species 2004**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/55822/11372732>>.

CENTENO, F. C. et al. Anuran skin and basking behavior: The case of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956). **Journal of Morphology**, v. 276, n. 10, p. 1172–1182, 2015.

DAPSON, R. W. Histochemistry of mucus in the skin of the frog, *Rana pipiens*. **The Anatomical Record**, v. 166, n. 4, p. 615–625, 1970.

DELFINO, G.; NOSI, D.; GIACHI, F. Secretory granule-cytoplasm relationships in serous glands of anurans: ultrastructural evidence and possible functional role.

Toxicon, v. 39, n. 8, p. 1161–1171, ago. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010100002531>>.

DEMORI, I. et al. Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. **Molecules** 2019, Vol. 24, Page 347, v. 24, n. 2, p. 347, 18 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/2/347/htm>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

DOCKRAY, G. J.; HOPKINS, C. R. Light and Electron Microscopy Stimulation of Secretion of Serotonin and Glandular Secretion. **Journal of Cell Biology**, v. 64, n. 3, p. 724–733, 1975.

DOS SANTOS, J. T. et al. Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais ovarianos bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 297–304, 2012.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, 1986.

FOX, H. **Dermal Glands**. Berlin: Springer-Verlag, 1986.

FROST, D. **Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference**. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/Amphibia/Anura/Hylidae/Lophyohylinae/Trachycephalus>>.

GARBINO, G. S. T. et al. Predation of treefrogs (Anura: Hylidae) with toxic skin secretions by the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*, Callitrichinae). **Primates**, v. 61, n. 4, p. 567–572, 2020.

HEATWOLE, H.; BARTHALMUS, G. T. **Amphibian biology. Volume 1: the integument**. [s.l.] Surrey Beatty & Sons, 1994.

HOUCK, L. D.; SEVER, D. M. Role of the skin in reproduction and behaviour. **Amphibian biology. Vol. 1**, n. October, p. 351–381, 1994.

INGENITO, L. Curadoria de Coleções Zoológicas. In: Anais do III SIMBIOMA - SIMPÓSIO SOBRE A BIODIVERSIDADE DA MATA ATLÂNTICA, Santa Teresa, ES. **Anais...** Santa Teresa, ES: 2014.

JARED, C. et al. Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. **Journal of Zoology**, v. 265, n. 1, p. 1–8, 2005.

JARED, C. et al. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, v. 54, n. 3, p. 197–207, set. 2009.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto & Atlas**. 12th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal cell biology**, v. 27, n. 2, p. 137–138, 1965.

KATCHBURIAN, E. et al. Mineralized dermal layer of the Brazilian tree-frog *Corythomantis greeningi*. **Journal of Morphology**, v. 248, n. 1, p. 56–63, abr. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmor.1020>>.

KIERNAN, J. A. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. **Microscopy Today**, v. 8, n. 1, p. 8–13, 14 jan. 2000. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1551929500057060/type/journal_article>. Acesso em: 5 jan. 2022.

LEMA, T. De; MARTINS, L. A. **Anfíbios do Rio Grande do Sul: Catálogo, Diagnoses, Distribuição, Iconografia**. Porto Alegre: ediPUCRS, 2011.

LUTZ, B. Biological Significance of Cutaneous Secretions in Toads and Frogs. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 1, p. 55–59, 1966.

MAILHO-FONTANA, P. L. et al. Passive and active defense in toads: The parotoid macroglands in *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 321, n. 2, p. 65–77, fev. 2014.

MAILHO-FONTANA, P. L. et al. Skin and poison glands in toads (*Rhinella*) and their role in defence and water balance. **Acta Zoologica**, v. 103, n. 1, p. 112–128, 1 jan. 2022. . Acesso em: 11 jan. 2022.

MENDES, V. A. A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo integrativo. p. 94, 2015.

MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2010.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th. ed. New York: W.H. Freeman, 2005.

NEWMAN, G. R.; HOBOT, J. A. Resins for combined light and electron microscopy: A half century of development. **Histochemical Journal**, v. 31, n. 8, p. 495–505, 1999.

RHODES, A. Fixation of tissues. In: **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 69–93.

RIGOLO, J. R.; ALMEIDA, J. A.; ANANIAS, F. Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura, Hylidae). **Micron**, v. 39, n. 1, p. 56–60, 2008.

SANTANA, D. O. et al. New records of *Trachycephalus mesophaeus* (Hensel, 1867) (Anura: Hylidae) from Atlantic forest in Sergipe state, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 9, n. October, p. 255–260, 2016.

SCHMIEDEBERG, L. et al. A Temporal Threshold for Formaldehyde Crosslinking and Fixation. **PLOS ONE**, v. 4, n. 2, p. e4636, 2009. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004636>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

SESSO, A. Fixação de Sistemas Biológicos. In: SOUZA, W. DE (Ed.). **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 3rd. ed. [s.l.: s.n.]p. 11–30.

SOLÉ, M. et al. Predation attempts on *Trachycephalus cf. mesophaeus* (Hylidae) by *Leptophis ahaetulla* (Colubridae) and *Ceratophrys aurita* (Ceratophryidae). **Salamandra**, v. 46, n. 2, p. 101–103, 2010.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A natural history of amphibians**. [s.l.] Princeton University Press, 1995.

THAVARAJAH, R. et al. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 16, n. 3, p. 400, 2012. Disponível em: <<http://www.jomfp.in/text.asp?2012/16/3/400/102496>>.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous Adaptations To Water Amphibians Balance. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 105A, n. 4, p. 593–608, 1993a.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. The calcified dermal layer in anurans. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 104, n. 3, p. 443–448, mar. 1993b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300962993904449>>.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1–29, 1995.

TONINI, L.; SILVA, J. P.; SARMENTO-SOARES, L. M. As Coleções Zoológicas do Instituto Nacional da Mata Atlântica - INMA : histórico e representatividade da biodiversidade da Mata Atlântica. v. 40, n. 2, p. 131–144, 2018.

VASCONCELOS, T. P. C. et al. A importância da curadoria de coleções zoológicas do Subfilo Vertebrata para à comunidade científica. **Revista Presença**, 2017.

ZAHER, H.; YOUNG, P. As coleções zoológicas brasileiras: panorama e desafios. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 24–26, 2003.

ANEXO I: INVOICE EMPRÉSTIMO COLEÇÃO HERPETOLÓGICA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
GABINETE DO SECRETÁRIO
INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO ESPECIAL DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS
COLEÇÃO HERPETOLÓGICA

1 de 3



Controle de empréstimos (Control of loans)

Data (Date): 27/01/2020 Devolução (Loan due): Documento Nº: 27012020

Enviado para (Sent to)

Pesquisador (Researcher): Carlos Jared

Instituição (Institution): Instituto Butantan

Departamento/Laboratório (Department/Laboratory): Laboratório de Biologia Celular

Endereço (Address): Av. Dr. Vital Brasil, 1.500, B* Butantã

Cidade (City): São Paulo

Estado (State): SP

País (Country): Brasil

CEP (ZIP): 05503-000

E-mail: carlos.jared@butantan.gov.br

Telefone (Telephone):

Para o uso de (For use by)

Encaminhado por (Shipped by): Valdir J. Germano

Empréstimo por (Loan for)

meses (months)

Permuta (Exchange);

Identificação (For identification)

Devolução (Returning);

Doação (Donation)

Sumário de envio

(Shipment summary)

Nº de espécimes (no. of specimens): -12

Nº de siquetas de tecido (no. of tissue subsamples): -

Nº de preparações (total no. of preparation): -

Nº total de objetos enviados (total no. of shipped objects)

Lista de envio (Shipment list):

* Veja lista do material em anexo (see attached shipment list)

Observações (Invoice notes):

* Por favor veja na última página nossa política e condições de empréstimo

* (Please, see in the last page our loan policy and conditions)

** Por favor, retornar o original assinado e datado, mantenha uma cópia para seus registros.

** (Please, sign and return original to Instituto Butantan, keep a copy for your records)

Recebido em (Date of receiving): 27.01.2020

Recebido por (Received by): ADRIANO BAUER

Condições do material recebido

Boas condições
(Good condition)

Exceto problemas detalhados
(Except detailed problems)

Autorizado por (Authorized by): Felipe Gobbi Graziotin

Assinatura (Signature):

Felipe Gobbi Graziotin
Coordenador da Coleção Herpetológica
Laboratório de Coleções Zoológicas
Instituto Butantan

Data (Date): 27/01/2020

Av. Dr. Vital Brasil, 1.500 – Butantã – São Paulo – SP – 05503-000

Fone: (11) 2527-8870

e-mail: lec.secretaria@butantan.gov.br

www.butantan.gov.br

ANEXO I: INVOICE EMPRÉSTIMO COLEÇÃO HERPETOLÓGICA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
GABINETE DO SECRETÁRIO
INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO ESPECIAL DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS
COLEÇÃO HERPETOLÓGICA

2 de 3



Controle de empréstimos (Control of loans)

Lista de envio (Shipment list): N°27012020

GENERO	ESPECIE	SUBESPECIE	IBSPCR	CIDADE	ESTADO
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3500	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3501	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3502	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3503	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3504	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3505	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3506	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3507	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3508	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3509	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3510	Ilhéus	BA
<i>Trachycephalus</i>	<i>mesophaeus</i>		3511	Ilhéus	BA

ANEXO I: INVOICE EMPRÉSTIMO COLEÇÃO HERPETOLÓGICA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
GABINETE DO SECRETÁRIO
INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO ESPECIAL DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS
COLEÇÃO HERPETOLÓGICA

3 de 3



Enviado para (Sent to)

Pesquisador (Researcher): Carlos Jared

Instituição (Institution): Instituto Butantan

Autorizado por (Authorized by): Felipe Gobbi Graziotin

Assinatura (Signature):

Felipe Gobbi Graziotin
Carimbo: Laboratório Especial de Coleções Zoológicas - Instituto Butantan

Data (Date): 27/01/2020

Av. Dr. Vital Brasil, 1.601 - Butantã - São Paulo - SP - 05503-000

Fone: (11) 2627-1870

e-mail: icc.secretaria@butantan.gov.br

www.butantan.gov.br

ANEXO I: INVOICE EMPRÉSTIMO COLEÇÃO HERPETOLÓGICA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
GABINETE DO SECRETÁRIO
INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO ESPECIAL DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS
COLEÇÃO HERPETOLÓGICA

4 de 3



Política e condições de empréstimo Loan policy and conditions

- Os empréstimos são realizados para instituições e não para pesquisadores. Sendo assim, o material não pode ser transferido ou transportado para outra instalação sem permissão prévia por escrito da Coleção Herpetológica do Laboratório de Coleções Zoológicas (LECZ) do Instituto Butantan. *Loans are made to institutions, not to researchers. Therefore, material must not be transferred or transported to other institution without prior express written permission from the Herpetology Collection of the Laboratory of Zoological Collections (LECZ) of the Butantan Institute.*
- O pesquisador requisitante e sua instituição, para o qual o empréstimo foi endereçado, são corresponsáveis e concordam em proteger e preservar o material em empréstimo. *The researcher and your institution, to whom the loan was addressed, share responsibility and agree to protect and preserve the loaned material.*
- O material emprestado deve retornar antes da data de devolução determinada no invoice. Se necessária, requisições de extensão devem ser solicitadas antes da data de devolução. *Loaned material must be returned before the loan's due date as indicated on the invoice. If necessary, request for extension should be made before loan's due date.*
- O não cumprimento de data de devolução ou a falta de resposta às solicitações da LECZ podem resultar no término imediato do empréstimo e na restrição do acesso futuro ao material da LECZ. *Failure to satisfy the loan's due date or its response to LECZ requests may result in the immediate termination of the loan and restriction on subsequent request of LECZ material.*
- Etiquetas e rótulos originais de espécimes não devem ser removidos ou alterados sem permissão prévia. *Original specimen tags and labels must not be removed or altered without prior permission.*
- O material emprestado não deve ser alterado ou separado sem expressa permissão prévia por escrito da LECZ. *Loaned material must not be altered or detached without express written permission from LECZ.*
- Sempre indicar a Coleção Herpetológica do LECZ do Instituto Butantan em qualquer publicação resultante do material examinado. Por favor, envie ao LECZ uma cópia (eletrônica ou física) de quaisquer publicações resultantes deste empréstimo. *Always acknowledge the Herpetology Collection of LECZ from Butantan Institute in any publications or reports based on the loaned material. Please, provide to LECZ a copy (electronic or physical) of any publication(s) resulting from this loan.*
- Qualquer produto ou preparação (e.g. lâminas de cariótipos, DNA extraído, hempiênis, etc) são considerados parte dos espécimes e devem retornar ao LECZ junto com o material emprestado. *Any product or preparation (e.g. karyotype slides, extracted DNA, hempiênis, etc) are considered part of the specimen and must be returned to LECZ together with the loaned material.*
- Por favor, retorne imediatamente uma cópia assinada do "Invoice". *Please, promptly return a signed copy of the loan invoice.*

Instruções para manuseio de material Instructions for handling material

- O material deve ser mantido no mesmo líquido no qual foi emprestado (e.g. espécimes em álcool 70%, tecido em etano PA 100%, etc). *The material should be preserved using the same fluid in which they were loaned (e.g. specimens in 70% ethanol, tissues in absolute ethanol, etc).*
- Por favor evite que os espécimes: a) desidratem, b) entrem em contato com fontes de calor, c) fiquem expostos à luz ultravioleta. *Please avoid that the specimens suffer from: a) dehydration, b) be in contact with any source of heat, c) be exposed to ultraviolet light.*
- Os retornos devem ser enviados usando empresas que dispõem de sistemas de resfriado (e.g. Sedex, FedEx, DHL, etc). *The return should be sent using carriers with cooling capacity (e.g. FedEx, DHL, etc).*
- Para instruções sobre o uso de amostras de tecido para estudos com DNA, isotópos, ou outras técnicas que envolvam métodos destrutivos, consultar também a "Política de Amostragem Destrutiva do LECZ". *For further instruction about the use of samples of tissues for DNA, isotopes or other destructive methods, consult also the "Destructive Sampling Policy from LECZ".*

Av. Dr. Vital Brasil, 1.500 – Butantã – São Paulo – SP – 05503-900
Fone: (11) 3827-3870
e-mail: lecz.secretaria@butantan.gov.br
www.butantan.gov.br