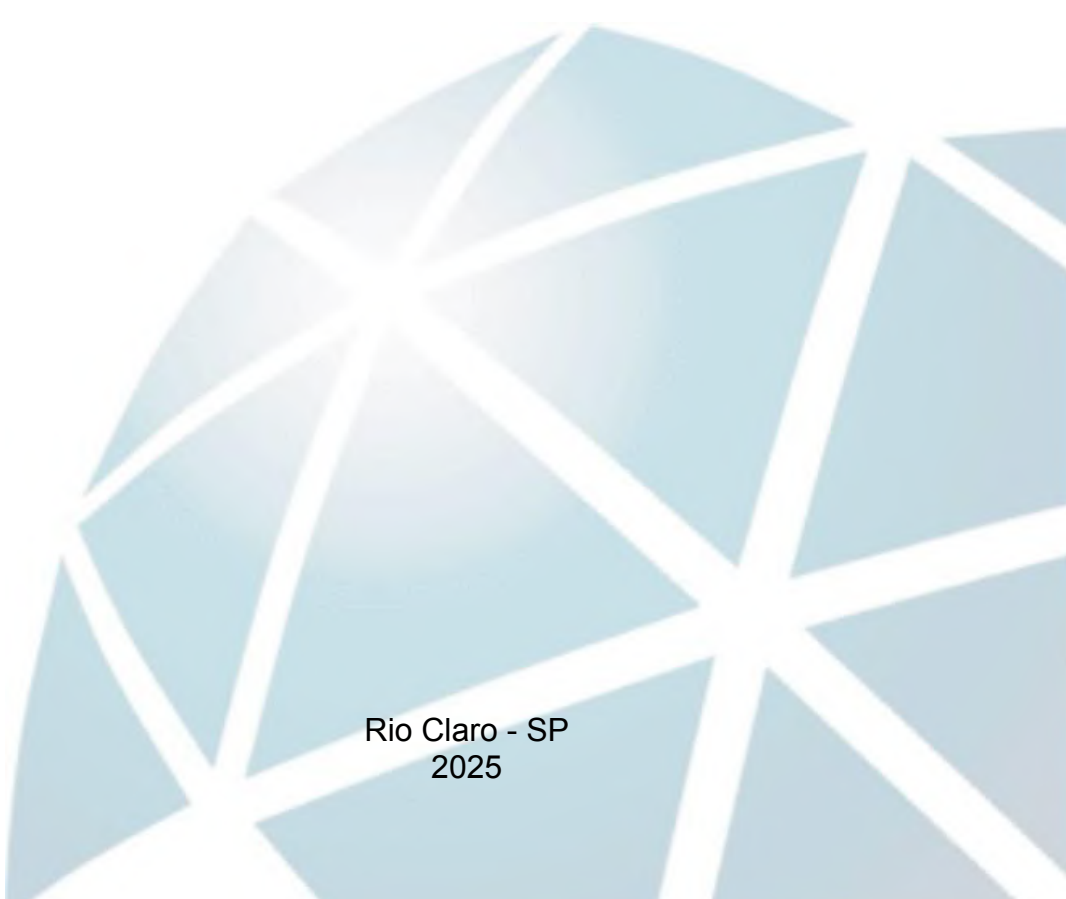

Ciências Biológicas

ANDRÉ RAIMUNDINI SEGURA Y GRIOLES

**ESTRUTURA MORFOLÓGICA DA PELE DE *HADDADUS BINOTATUS* E
ISCHNOCNEMA HENSELII E SUA RELAÇÃO COM A RESISTÊNCIA À INFECÇÃO
POR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS***



Rio Claro - SP
2025

ANDRÉ RAIMUNDINI SEGURA Y GRIOLLES

**ESTRUTURA MORFOLÓGICA DA PELE DE HADDADUS BINOTATUS
E ISCHNOCNEMA HENSELII E SUA RELAÇÃO COM A
RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR BATRACHOCHYTRIUM
DENDROBATIDIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador(a): Ananda Brito de Assis

Coorientador(a): Ariadne Fares Sabbag

Supervisor(a): Maria Izabel Souza Camargo

Rio Claro - SP
2025

S456e

Segura y Grioles, André Raimundini

Estrutura morfológica da pele de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii* e sua relação com a resistência à infecção por *Batrachochytrium dendrobatidis* / André Raimundini Segura y Grioles. -- Rio Claro, 2025

57 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Ananda Brito de Assis

Coorientador: Ariadne Fares Sabbag, Maria Izabel Camargo-Mathias

1. Morfologia da pele. 2. Quitridiomicose. 3. Resistência. 4. *Haddadus binotatus*. 5. *Ischnocnema henselii*. I. Título.

ANDRÉ RAIMUNDINI SEGURA Y GRIOLÉS

**ESTRUTURA MORFOLÓGICA DA PELE DE HADDADUS BINOTATUS
E ISCHNOCNEMA HENSELII E SUA RELAÇÃO COM A
RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR BATRACHOCHYTRIUM
DENDROBATIDIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas’.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Ananda Brito de Assis

Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad

Aprovado em: 07 de novembro de 2025

Assinatura do discente

Assinatura da orientadora

Assinatura da coorientadora

Assinatura da supervisora

*À minha querida mãe, Maristela, pelo amor e apoio incondicional
desde que eu me conheço como gente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às minhas orientadoras, Ananda e Ariadne, por me guiarem e orientarem com muito carinho ao longo de toda essa trajetória e por redespertarem o meu interesse no mundo acadêmico, me possibilitando enxergar um futuro na área. Agradeço também ao Prof. Dr. Célio Haddad, por me acolher em seu laboratório e me permitir utilizar do espaço e de sua coleção biológica, e a todos os integrantes do laboratório de herpetologia da UNESP de Rio Claro, por tornarem o ambiente acolhedor e amigável, além de me ajudarem quando precisei.

Agradeço aos meus amigos, tanto aqueles que já passaram pela minha vida, quanto aqueles que se mantiveram, pelos bons momentos que vivemos e por agregarem na minha formação pessoal. Agradeço em especial os meus amigos rio-clarenses Joana, Ana Carolina, Tito, Caio, Maria Vitória, Lívia, Gabriel e João pelo acolhimento e por todas as histórias que vivemos juntos. Também quero agradecer a todos os meus amigos de Jundiaí, em especial Henrique, Giovana, Matheus e Davi, pela grande amizade de anos.

Agradeço imensamente à minha família, às minhas irmãs Marília, Cecília e Júlia, às minhas sobrinhas, Olívia, Malu e Liz, aos meus avós, Vera e Theudes, e principalmente aos meus pais, Evandro e Maristela, por todo o apoio ao longo de minha vida. Agradeço em especial à minha mãe, por ser a minha melhor amiga, minha maior fonte de apoio e inspiração e por sempre torcer e acreditar em mim.

Agradeço ao Brazilian Central Studies of Ticks Morphology da UNESP, *campus* Rio Claro, pelo acesso às instalações e pela orientação durante todas as etapas da preparação das lâminas. Agradeço em especial à Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, pela generosidade em disponibilizar seu laboratório, bem como aos membros do laboratório, especialmente Odaiza da Silva, Davy Sapatini e Gerson Mello Souza, pelo suporte e ensinamentos no manuseio de equipamentos e corantes. Também agradeço à Mariana Gibim Paes de Almeida pela ilustração das regiões selecionadas nos exemplares.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processos nº 2021/12455-9, 2021/10639-5 e 2021/02414-3. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que se dedicam a divulgar e ensinar biologia, pois considero essa ciência uma verdadeira arte, capaz de revelar e explicar a maravilha que é a vida. Desde a infância, carrego comigo a paixão pela área, e hoje me sinto imensamente grato e realizado por poder trilhar esse caminho. A Biologia não apenas amplia nosso conhecimento sobre o mundo natural, mas também desperta em nós a capacidade de admirá-lo, respeitá-lo e preservá-lo. Dedico este trabalho a todos aqueles que, por meio de sua curiosidade, esforço e generosidade em compartilhar saberes, tornam possível que mais pessoas se encantem e se transformem pelo estudo da vida.

“Meu legado é que segui firme... do começo ao fim, porque acreditei em mim mesma.” (Tina Turner, 2013).

RESUMO

Os anfíbios enfrentam uma panzootia, desde a década de 50, provocada por uma doença infecciosa emergente, causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Esta doença é denominada quitridiomicose e está associada à redução populacional de mais de 500 espécies de anfíbios e à extinção de aproximadamente 90 espécies. A infecção atinge a pele dos anfíbios, comprometendo funções fisiológicas essenciais para a sobrevivência, tais como, respiração, osmorregulação e absorção de água, o que pode levar o hospedeiro à morte. Contudo, as espécies apresentam diferentes susceptibilidades à doença. Sabe-se que algumas espécies são altamente vulneráveis enquanto outras são resistentes ao patógeno. Uma das possíveis explicações para as variações na resistência ao Bd está na própria pele dos anfíbios, que tem mecanismos para combater a infecção. Peptídeos antimicrobianos, produzidos pelas glândulas granulares da derme, desempenham um papel fundamental na proteção dos anfíbios contra patógenos. Estudos anteriores observaram diferenças marcantes entre as espécies de desenvolvimento direto *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii* quanto à resistência à infecção por Bd, mesmo se tratando de espécies simpátricas, *I. henselii* apresenta altas cargas e prevalências do fungo em suas populações, enquanto não se detecta Bd nas populações de *H. binotatus*. Contudo, os mecanismos responsáveis por esse contraste ainda não foram elucidados. O presente estudo investigou a morfologia da pele de *H. binotatus* e *I. henselii*, com o objetivo de identificar diferenças estruturais que possam esclarecer as variações na resistência à infecção pelo fungo Bd. Foram realizados cortes transversais em seis regiões da pele de seis indivíduos por espécie. As secções foram desidratadas em uma série crescente de etanol, incluídas em Leica Historesin® e seccionadas a 5 µm em micrótomo LEICA RM2255. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e tricrômico de Mallory e observadas e fotografadas em microscópio Optika® B-510 BF com câmera CB-10+ e programa Proview. A histologia mostra uma estrutura da pele semelhante entre as duas espécies, porém com diferenças significativas de espessura: a epiderme e os estratos esponjoso e compacto de *H. binotatus* são mais espessos que os de *I. henselii*. Além disso, *H. binotatus* apresenta maior quantidade de glândulas mucosas distribuídas pelo corpo, enquanto *I. henselii* contém maior

quantidade de glândulas granulares. As análises também revelaram que, em ambas as espécies, a região ventral apresenta maior espessura epidérmica em comparação à dorsal, e que a região ventral femoral se destaca pela predominância de glândulas granulares, sugerindo um papel específico na proteção contra microrganismos. Por fim, observou-se que a região palmar é a mais espessa do corpo em ambas as espécies, caracterizando-se pela abundância de glândulas mucosas, enquanto a plantar apresenta glândulas de menor diâmetro, mas com presença relativamente maior de granulares em *I. henselii*.

Palavras-chave: Brachycephalidae, Craugastoridae, derme, epiderme, fungo, glândulas, pele, quitrídio, quitridiomicose.

ABSTRACT

Amphibians have been facing a panzootic since the 1950s, caused by an emerging infectious disease triggered by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). This disease, known as chytridiomycosis, is associated with population declines in more than 500 amphibian species and the extinction of approximately 90 species. The infection affects the skin of amphibians, impairing essential physiological functions for survival, such as respiration, osmoregulation, and water absorption, which can ultimately lead to the host's death. However, species exhibit different susceptibilities to the disease. Some species are known to be highly vulnerable, while others are resistant to the pathogen. One possible explanation for variations in resistance to Bd lies in the amphibians' skin itself, which has mechanisms to combat infection. Antimicrobial peptides, produced by the granular glands in the dermis, play a key role in protecting amphibians against pathogens. Previous studies have reported striking differences between the direct-developing species *Haddadus binotatus* and *Ischnocnema henselii* in their resistance to Bd infection. Even though they are sympatric species, *I. henselii* shows high fungal loads and prevalence in its populations, whereas Bd has not been detected in *H. binotatus* populations. Nonetheless, the mechanisms underlying this contrast remain unclear. The present study investigated the skin morphology of *H. binotatus* and *I. henselii* with the aim of identifying structural differences that could shed light on variations in resistance to Bd infection. Transverse sections were taken from six skin regions of six individuals of each species. The sections were dehydrated in a graded ethanol series, embedded in Leica Historesin®, and cut at 5 µm using a LEICA RM2255 microtome. Slides were stained with Hematoxylin–Eosin and Mallory's trichrome, and then observed and photographed under an Optika® B-510 BF microscope with a CB-10+ camera and Proview software. Histology revealed a similar general skin structure between the two species but with significant differences in thickness: the epidermis and both the spongy and compact dermal layers of *H. binotatus* were thicker than those of *I. henselii*. In addition, *H. binotatus* exhibited a greater number of mucous glands distributed throughout the body, whereas *I. henselii* contained a larger number of granular glands. Analyses also showed that in both species the ventral region had a thicker epidermis compared to the dorsal region, and that the ventral femoral region

was characterized by a predominance of granular glands, suggesting a specific role in protection against microorganisms. Finally, it was observed that the palmar region was the thickest skin area in both species, characterized by an abundance of mucous glands, whereas the plantar region showed glands of smaller diameter but with a relatively higher proportion of granular glands in *I. henselii*.

Keywords: Brachycephalidae, Craugastoridae, chytrid, chytridiomycosis, dermis, epidermis, fungus, glands, skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráficos de violino de carga de Bd.....	18
Figura 2 – Regiões dos cortes de pele dos anfíbios.....	19
Figura 3 – Secções da pele dorsal das duas espécies	24
Figura 4 – Secção transversal da pele ventral central de <i>H. binotatus</i>	25
Figura 5 – Secção transversal da pele ventral femoral de <i>H. binotatus</i>	26
Figura 6 – Secção transversal da pele ventral central de <i>I. henselii</i>	27
Figura 7 – Corte transversal da pele ventral femoral de <i>I. henselii</i>	28
Figura 8 – Corte transversal da pele palmar de <i>H. binotatus</i>	29
Figura 9 – Glândulas mucosas palmar de <i>H. binotatus</i>	30
Figura 10 – Secções da pele palmar de <i>I. henselii</i>	31
Figura 11 – Secção transversal da pele plantar de <i>H. binotatus</i>	32
Figura 12 – Corte transversal da pele plantar de <i>I. henselii</i>	33
Figura 13 – Gráficos comparativos – pele dorsal.....	35
Figura 14 – Gráficos comparativos – pele ventral central.....	37
Figura 15 - Gráficos comparativos - pele ventral femoral	39
Figura 16 – Gráficos comparativos – pele palmar.....	41
Figura 17 – Gráficos comparativos – pele plantar.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores médios da região dorsal.....	34
Quadro 2 – Valores médios da região ventral central.....	36
Quadro 3 – Valores médios da região ventral femoral.....	38
Quadro 4 – Valores médios da região palmar.....	41
Quadro 5 – Valores médios da região plantar.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Objetivo geral.....	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1. Coleta das amostras.....	19
2.2. Preparação do material para histologia.....	20
2.3. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa.....	20
2.5. Análise das lâminas.....	21
2.6. Análise dos dados.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1. Caracterização morfológica.....	22
3.1.1. Pele dorsal.....	22
3.2.2. Pele ventral.....	24
3.3.3. Palmar.....	27
3.3.4. Plantar.....	30
3.2. Comparação morfométrica entre as espécies.....	32
3.2.1. Pele dorsal.....	32
3.2.2. Pele ventral central.....	34
3.3.3. Pele ventral femoral.....	36
3.3.4. Pele Palmar.....	37
3.3.5. Pele Plantar.....	39
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais alarmantes da crise global da biodiversidade é a redução das populações de anfíbios, observada em escala mundial desde meados da década de 1950 (Houlahan *et al.*, 2000). Diversos fatores contribuem para essa perda, incluindo o comércio de anfíbios, a introdução de espécies exóticas ou invasoras, a expansão da ocupação humana, as mudanças climáticas e a disseminação de doenças infecciosas que afetam esses organismos (Collins; Crump, 2010). Contudo, nas últimas quatro décadas, as doenças infecciosas têm se configurado como um dos principais fatores responsáveis por esse declínio, especialmente devido à disseminação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) Longcore *et al* (1999), que está associada à redução populacional de mais de 500 espécies de anfíbios e à extinção de aproximadamente outras 90 espécies no mundo (Scheele *et al.*, 2019).

Batrachochytrium dendrobatidis, popularmente conhecido como quitrídio, é um fungo pertencente a uma linhagem basal do filo Chytridiomycota (Fisher; Garner; Walker, 2009). Ele se destaca por ser um parasita de vertebrados (Pessier *et al.*, 1999; Scheele *et al.*, 2019), e por ser a única espécie de fungo capaz de infectar e se desenvolver dentro das células da pele de anfíbios anuros, causando uma doença denominada quitridiomicose (Pessier *et al.*, 1999).

A infecção inicia-se quando os esporos do fungo, chamados zoósporos, entram em contato com a pele do anfíbio anuro, onde se desenvolvem em uma estrutura adulta denominada talo (Berger *et al.*, 2005). Cada talo produz uma única estrutura reprodutiva chamada zoosporângio (Berger *et al.*, 2005) que, quando madura, libera novos zoósporos flagelados, que podem infectar outras áreas do mesmo hospedeiro ou novos organismos (Rollins-Smith *et al.*, 2002). O desenvolvimento da quitridiomicose afeta principalmente as células epiteliais da epiderme, em especial as células queratinizadas (Berger *et al.*, 2005), danificando a pele do animal (Pessier *et al.*, 1999). Em casos mais graves, a doença pode induzir hiperqueratose, formando uma barreira impermeável capaz de comprometer a função cutânea e comprometendo processos fisiológicos essenciais, que podem levar o hospedeiro à morte (Pessier *et al.*, 1999).

A pele dos anuros é um órgão vital para esses organismos (Duellman; Trueb, 1994). Por ser altamente permeável, ela é responsável por processos fisiológicos, como a respiração, absorção de água e transporte de íons, que são essenciais para a sobrevivência desses organismos (Duellman; Trueb, 1994). Ela também desempenha um papel crucial na capacidade dos organismos de explorar nichos ecológicos e habitats diversos, além de ser a primeira linha de defesa contra predadores e patógenos que possam causar infecções e doenças (Clarke, 1997; Varga; Bui-Marinós; Katzenback, 2019). Morfologicamente, ela é composta por duas camadas principais: epiderme e derme (Duellman; Trueb, 1994). A epiderme é a camada mais superficial e é geralmente formada por uma única camada de células queratinizadas denominada estrato córneo e por uma camada basal mais espessa, chamada estrato granuloso (Duellman; Trueb, 1994; Guo; Hillyard; Fu, 2003). Já a derme é a camada mais profunda e é subdividida em estrato esponjoso e estrato compacto (Duellman; Trueb, 1994). A maioria dos processos fisiológicos da pele ocorre na derme, especialmente no estrato esponjoso, onde estão localizadas as duas principais glândulas responsáveis pela manutenção da homeostase cutânea: as glândulas mucosas e as glândulas granulares (Duellman; Trueb, 1994; Toledo; Jared, 1995). As glândulas mucosas são responsáveis pela produção e secreção de um muco que reveste e umedece a pele dos anfíbios, auxiliando na respiração, reprodução, termorregulação e osmorregulação desses organismos (Campantico; Guardabassi; Torasso, 1978; Toledo; Jared, 1995). Já as glândulas granulares produzem e secretam compostos tóxicos e biologicamente ativos, como aminas, proteínas, esteroides e alcaloides, que protegem os anfíbios de predadores (Daly, 1995; Daly; Wyers; Whittaker, 1987). As glândulas granulares também são parte do sistema imunológico, atuando como parte da resposta inata a microorganismos invasores (Daly, 1995; Myers *et al.*, 2012). Essas glândulas sintetizam peptídeos antimicrobianos (AMPs) na superfície da pele como forma de combater os organismos patogênicos (Rollins-Smith *et al.*, 2002; Rollins-Smith, 2009; Myers *et al.*, 2012).

Para combater a quitridiomicose, os anuros podem recorrer à componentes produzidos pela pele que sejam eficazes na inibição do desenvolvimento do patógeno (Greenberg; Palen; Mooers, 2017). O mucossoma, que consiste em um microecossistema do muco produzido pelas glândulas mucosas e pelas secreções das glândulas granulares, é composto por AMPs, anticorpos e alcaloides secretados,

assim como por metabólitos produzidos pela microbiota da pele (Woodhams *et al.*, 2014). Ele desempenha um papel fundamental na proteção dos anfíbios a patógenos externos, sendo inclusive capaz de inibir o desenvolvimento do Bd em algumas espécies (Woodhams *et al.*, 2007, 2014). Estudos como o de Rollins-Smith *et al.* (2002) mostram que, os AMPs do mucossoma de anuros ranídeos (Ranidae) são eficazes na inibição do crescimento do Bd, pois conseguem se reorganizar em estruturas anfipáticas helicoidais, que perfuram a bicamada lipídica da membrana e a parede celular do fungo (Barra; Simmaco, 1995; Rollins-Smith *et al.*, 2002; Rollins-Smith, 2009).

Embora seja eficaz, a ação do mucossoma não é uniforme entre os anuros (Searle *et al.*, 2011; Woodhams *et al.*, 2014). Espécies e populações de anfíbios diferem na forma como respondem à doença (Searle *et al.*, 2011). Por exemplo, *Rana pipiens* (Schreber, 1782) e *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) são resistentes à infecção, enquanto *Bufo boreas* (Baird and Girard, 1852) e *Alytes obstetricans* (Laurenti, 1768) são mais vulneráveis (Rollins-Smith *et al.*, 2002; Woodhams *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2006). As causas dessa variação não são totalmente conhecidas, mas diversos são os fatores que podem influenciar a susceptibilidade de uma espécie ao desenvolvimento da doença, como ecologia, biogeografia, história de vida e, sobretudo, secreções da pele (Woodhams *et al.*, 2006; Searle *et al.*, 2011; Greenberg; Palen; Mooers, 2017).

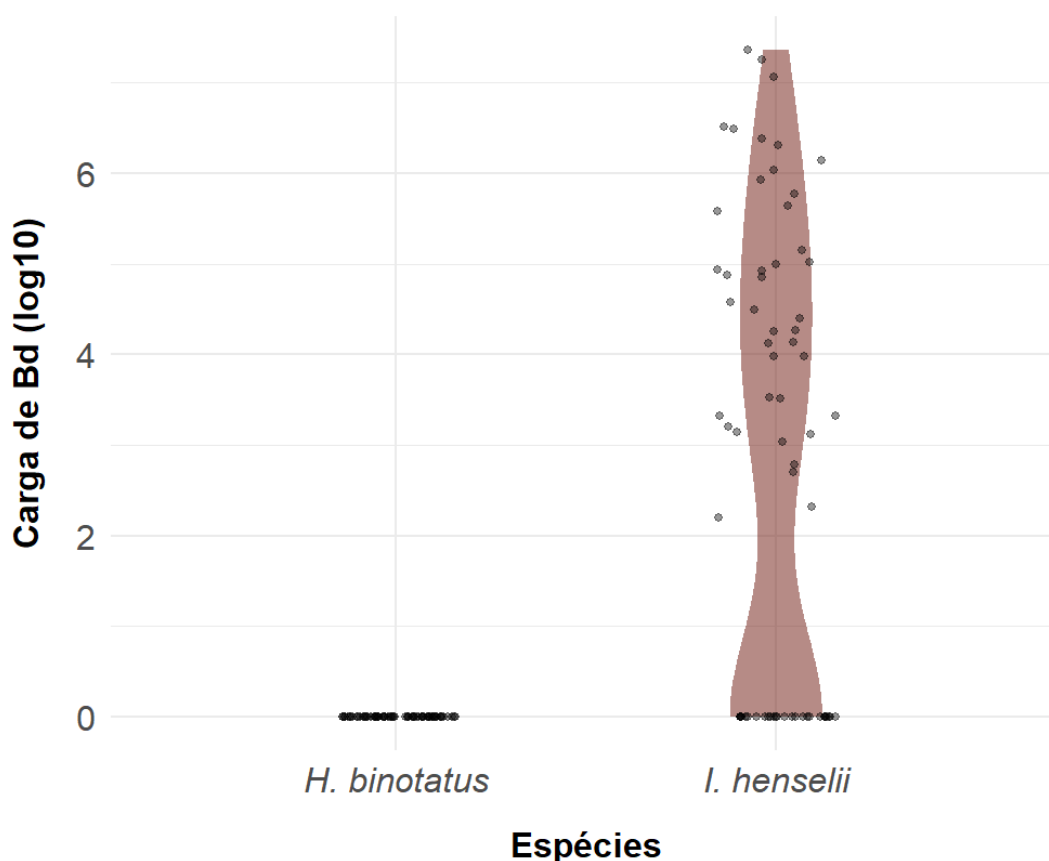
Em um estudo prévio de Assis *et al.*, (2025) intitulado “Environmental Detection of the Amphibian Chytrid Fungus in Water Bodies Predicts Host Infection Along a Deforestation Gradient”, observou-se a ausência total do Bd em populações de *Haddadus binotatus* (Spix, 1824). Ao mesmo tempo, altas prevalências desse mesmo patógeno foram observadas nas populações da espécie simpátrica *Ischnocnema henselii* (Peters, 1870) (Figura 1). Os resultados de Assis *et al.* (2025) corroboram com um estudo anterior publicado, em que se observou os mesmos padrões de infecção para as duas espécies (Martins *et al.*, 2022).

Haddadus binotatus é um anuro endêmico da Mata Atlântica brasileira (Coco *et al.*, 2014), com distribuição que se estende da Bahia ao Rio Grande do Sul (Hedges *et al.*, 2008; Haddad *et al.*, 2008, 2013). Já *I. henselii* também ocorre na Mata Atlântica, porém sua distribuição é mais restrita, abrangendo os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Haddad *et al.*, 2013). Ambas as espécies habitam áreas florestadas com cobertura vegetal abundante

(Haddad *et al.*, 2013) e se alimentam principalmente de pequenos artrópodes terrestres (Borges *et al.*, 2005; Dietl; Engels; Solé, 2009). Elas também apresentam hábito noturno e criptozoico, ou seja, permanecem escondidas durante o dia em pequenas galerias naturais ou sob a serrapilheira (Haddad *et al.*, 2013) e compartilham do mesmo modo reprodutivo, depositando ovos terrestres sem espuma no chão (Nunes-de-Almeida; Haddad; Toledo, 2021). Suas proles também dispõem de desenvolvimento direto, nutrição lecitotrófica, além da ausência de alimentação parental (Nunes-de-Almeida; Haddad; Toledo, 2021).

Se ambas as espécies apresentam uma ecologia similar, compartilhando os mesmos habitats, hábitos, alimentação e modo reprodutivo, então o que explica essa variação na suscetibilidade à quitridiomicose? Os padrões opostos de contaminação observados sugerem a existência de fatores intrínsecos às espécies relacionados à resistência à infecção. Neste estudo, buscamos investigar a estrutura morfológica da pele de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*, identificando diferenças estruturais que possam elucidar as variações na resistência à infecção pelo fungo Bd. Nossa primeira hipótese é que a pele de *H. binotatus* apresente maior espessura dos estratos epidérmicos e dérmicos em comparação com *I. henselii*. Nossa segunda hipótese é que *H. binotatus* tenha maior número de glândulas granulosas distribuídas pelas regiões, pois a espécie é mais resistente à infecção pelo quitrídio.

Figura 1 - Gráficos de violinos da carga de Bd em *H. binotatus* (n = 66) e *I. henselii* (n = 69), amostrados ao longo de oito regiões geográficas (Wilcoxon: W = 924, P -valor < 0,01, Assis *et al.*, 2025).



Fonte: Adaptado de Assis *et al.*, 2025.

1.1 Objetivo geral

Descrever e analisar comparativamente a estrutura da pele de *I. henselii* e *H. binotatus* para a identificação de padrões morfológicos que possam auxiliar no entendimento da vulnerabilidade dessas espécies ao fungo *B. dendrobatidis*. Este estudo fornecerá dados sobre a organização dos estratos da pele, suas espessuras médias, bem como sobre o número, o tipo e o tamanho das glândulas cutâneas de ambas as espécies.

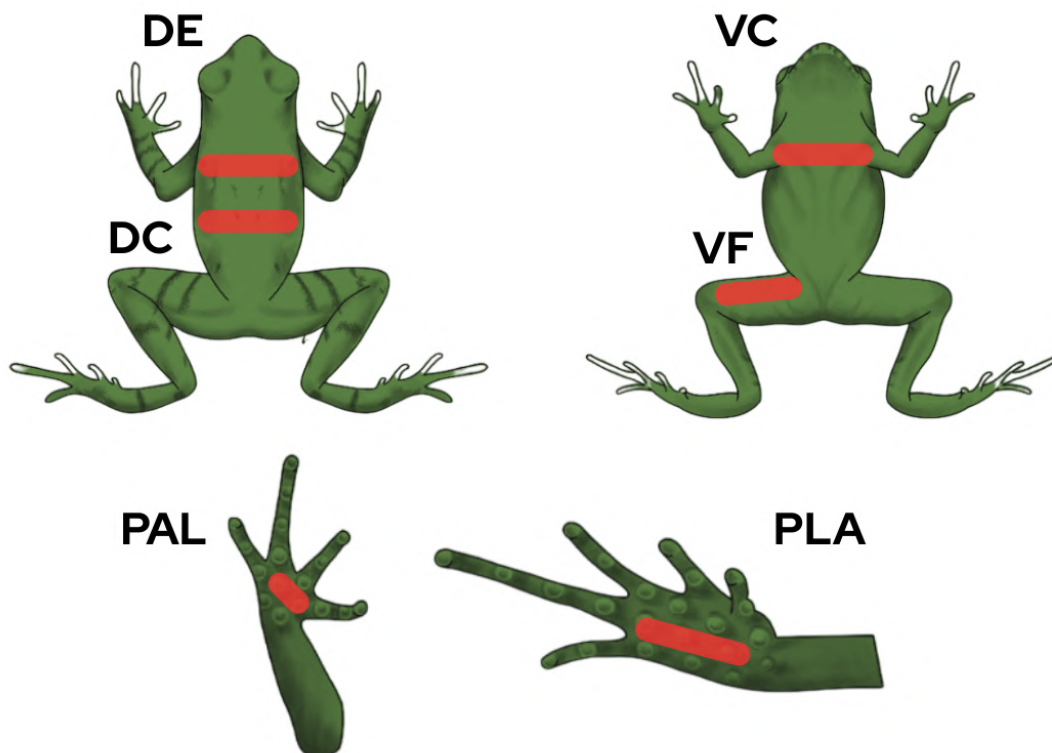
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

Para a realização da pesquisa, foram utilizados seis exemplares de *Haddadus binotatus* e seis exemplares de *Ischnocnema henselii* provenientes da Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad (CFBH), do Departamento de Biodiversidade do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Rio Claro, São Paulo, Brasil. Para *H. binotatus*, foram selecionados três machos e três fêmeas. A sexagem não foi possível de ser realizada em *I. henselii*.

Em cada animal, foram realizadas cortes macroscópicos, de tamanho médio de 4 mm, com bisturi nas seguintes regiões: dorsal central (DC), dorsal escapular (DE), ventral escapular (VE), ventral femoral (VF), palmar (PAL) e plantar (PLA) (Figura 2).

Figura 2 – Regiões dos cortes de pele nos anfíbios: dorsal central (DC), dorsal escapular (DE), ventral central (VC), ventral femoral (VF), palmar (PAL) e plantar (PLA).



Fonte: Imagem ilustrativa por Mariana Gibim Paes de Almeida.

2.2 Preparação do material para histologia

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em solução tampão de fosfato (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L) por 24 horas. Foi realizada a desidratação através de uma série crescente de concentrações de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 95%), com duração de 20 minutos por etapa. Posteriormente, as mesmas foram embebidas por três dias em moldes plásticos contendo historresina de embebição mais polimerizador Leica Histoiresin® (blocos histológicos).

Após esse período, os blocos foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255 (Leica®) com 5 µm de espessura, que foram recolhidos em lâminas de vidro previamente limpas e identificadas, e as secções armazenadas em estufa a 37 °C para secagem. Foram confeccionadas seis lâminas histológicas por região, cada uma contendo oito secções (Figura 2). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, para a visualização de estruturas basófilas e acidófilas, como núcleos, citoplasma e organelas (Junqueira, Junqueira, 1983).

2.3 Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983)

Para tanto, as secções foram reidratadas por um minuto em água destilada e coradas com hematoxilina de Harris por oito minutos. Depois foram lavadas em água corrente por três minutos e coradas com eosina aquosa por cinco minutos para, enfim, lavá-las novamente em água corrente. Finalmente as lâminas foram colocadas em suportes de madeira à temperatura ambiente para secarem e, posteriormente, cobertas com Entellan® e lamínula, para posterior observação e documentação fotográfica.

2.5 Análise das lâminas

As observações das lâminas permanentes foram realizadas sob Microscópio Trinocular B-510 BF, com auxílio do programa Proview, e as secções foram fotografadas com câmera CB-10+, todos da marca Optika®, no Laboratório de Herpetologia do Departamento de Biodiversidade do IB/UNESP/Rio Claro - SP.

2.6 Análise dos dados

Neste estudo, para cada indivíduo, foram determinados o número total e tamanho médio das glândulas por secção da pele e a espessura média dos estratos epidérmicos e dérmicos.

Os dados de espessura e diâmetro foram obtidos utilizando o programa Proview Optika® com uma ferramenta capaz de medir a distância entre dois pontos. Para a obtenção da espessura média da epiderme, do estrato esponjoso, da camada calcificada e do estrato compacto, cada fragmento analisado foi dividido em 10 partes iguais, nas quais se mediu a espessura de cada camada. Em seguida, foram calculados a média e o desvio padrão, resultando no valor médio de espessura para cada camada. A medida da espessura total foi determinada pela soma dos valores médios individuais de cada camada.

Para as glândulas, a contagem foi realizada inspecionando toda extensão da secção e separando as glândulas em mucosas e granulares. A identificação de glândulas mucosas e granulares utilizou os parâmetros estabelecidos por Brunetti, Herminda, Faivovich (2012) para diferenciação. Para a obtenção do diâmetro médio de cada tipo de glândula, foram mensuradas até cinco glândulas de cada categoria, e em seguida calculada a média dos valores obtidos.

Para as análises comparativas, foram considerados os seguintes parâmetros morfo-histológicos: espessura total da pele, espessura da epiderme, número total de glândulas mucosas e granulosas e o diâmetro médio de cada tipo de glândula. A espessura total da pele corresponde à soma da espessura da epiderme, do estrato esponjoso, do estrato compacto e da camada calcificada.

Os dados foram organizados em planilhas, contendo os valores individuais obtidos para cada espécie. A normalidade das distribuições foi inicialmente avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, o qual indicou que os dados não seguiam distribuição normal ($P < 0,05$). Dessa forma, para a análise estatística empregou-se o teste de Mann-Whitney U (Mann, Whitney, 1947), utilizado em comparações entre dois grupos independentes quando os dados não apresentam normalidade. Esse teste baseia-se na ordenação dos valores e avalia se as distribuições entre os grupos diferem significativamente. A hipótese nula (H_0) foi estabelecida como a ausência de diferença significativa entre os grupos analisados, e o nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados indicativos de rejeição da hipótese nula, sugerindo diferença estatisticamente significativa entre os grupos,

enquanto valores de $P > 0,05$ indicaram ausência de evidências suficientes para rejeitá-la.

As análises estatísticas, assim como os gráficos comparativos, foram feitos pelo aplicativo GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, 2023). Gráficos de caixas e de barras foram produzidos com base nos valores de medianas e médias, respectivamente, e na variação dos valores individuais para cada grupo.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização morfológica

O comprimento rostro-cloacal (CRC) médio dos indivíduos analisados neste estudo foi de: *H. binotatus* = 61,04 mm $\pm$ 4,00 mm (n = 6); *I. henselii* = 29,41 mm $\pm$ 1,04 mm (n = 6).

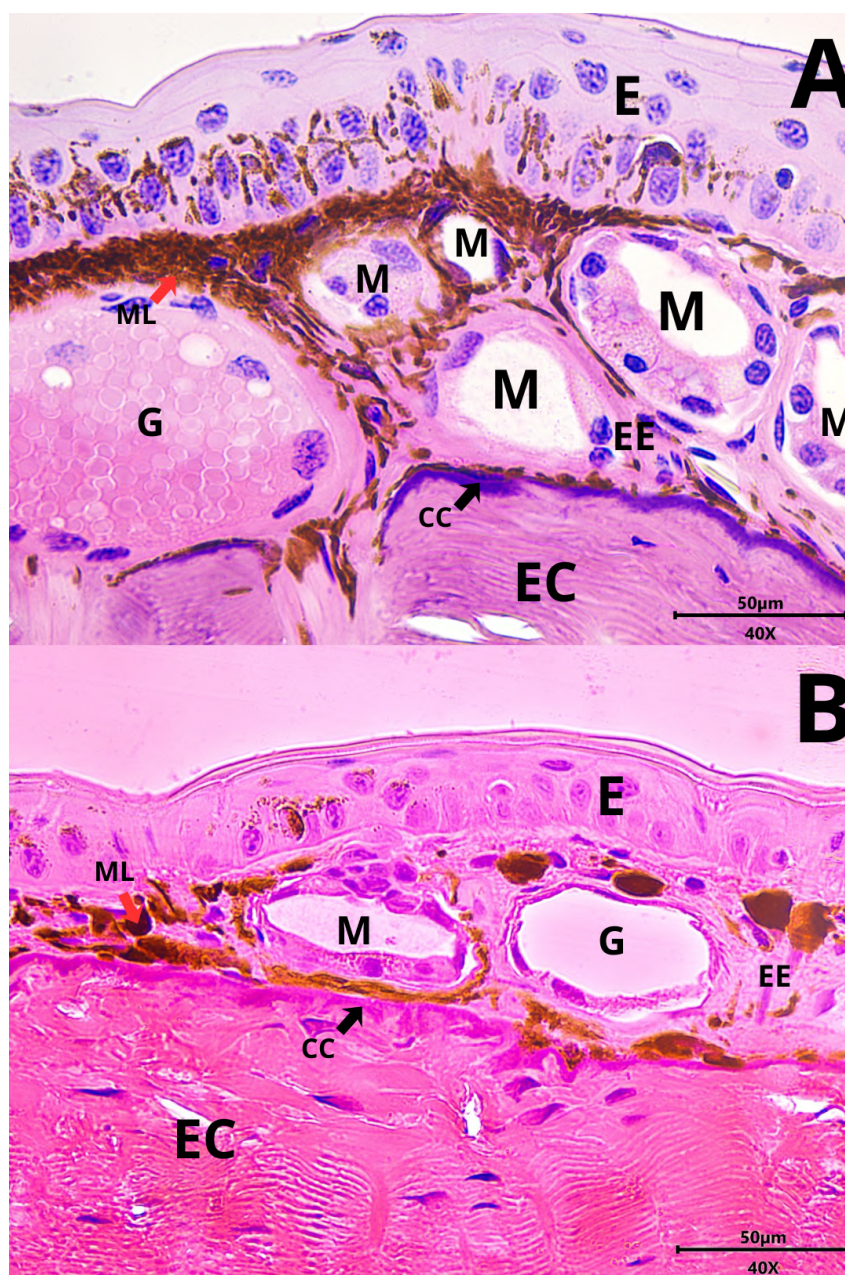
3.1.1 Pele dorsal

A pele dorsal de *H. binotatus* apresenta espessura média de 186,91 $\pm$ 31,56 μ m (Quadro 1) e é composta por uma camada única de células queratinizadas e por uma epiderme de espessura média de 38,90 $\pm$ 6,11 μ m (Quadro 1), formada por quatro a cinco camadas celulares. Abaixo da epiderme, encontra-se a derme dividida em estrato esponjoso e estrato compacto. O estrato esponjoso (45,85 $\pm$ 12,09 μ m) e o estrato compacto (98,26 $\pm$ 12,85 μ m), sendo este último formado por fibras de colágeno dispostas longitudinalmente. Uma camada calcificada (3,90 $\pm$ 0,51 μ m) é encontrada em praticamente toda a extensão dorsal da espécie, dividindo os estratos esponjoso e compacto. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de 74,44 $\pm$ 9,05 μ m (Quadro 1), formato acinar e são compostas por células túrgidas, com bordas bem delimitadas e lúmen. As glândulas granulosas (88,01 $\pm$ 14,61 μ m; Quadro 1) também possuem lúmen, mas são de formato sincicial. Ambas apresentam dutos epidérmicos formados por uma dupla camada de células (Figura 9) que conectam o lúmen ao exterior para a liberação de secreções -. A Figura 3A apresenta as estruturas morfológicas da pele dorsal de *H. binotatus*.

A pele dorsal de *Ischnocnema henselii* apresenta espessura média de 91,71 $\pm$ 21,38 μ m (Quadro 1). É formada por uma camada queratinizada, uma epiderme de duas a três camadas de células (14,32 $\pm$ 5,14 μ m; Quadro 1) e por uma derme também dividida em estrato esponjoso e estrato compacto (20,59 $\pm$ 6,80 μ m; 53,8 $\pm$ 8,8 μ m, respectivamente). A camada calcificada (2,45 $\pm$ 0,65 μ m) também está presente, dividindo os estratos da derme. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de 48,57 $\pm$ 8,47 μ m (Quadro 1), formato acinar e são compostas por células túrgidas, com bordas bem delimitadas e lúmen. As glândulas granulosas (61,90 $\pm$ 9,66 μ m; Quadro 1) também possuem lúmen, mas apresentam formato sincicial. Ambas apresentam dutos epidérmicos formados por uma dupla camada de

células que conectam o lúmen à superfície (Figura 9). As estruturas morfológicas da pele dorsal de *I. henselii* estão ilustradas na Figura 3B.

Figura 3 - Secções da pele dorsal de *Haddadus binotatus* (A) e *Ischnocnema henselii* (B) corados com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas mucosas (M); glândulas granulosas (G); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC), melanócitos (ML). A seta preta indica a camada calcificada, enquanto a vermelha indica a camada de melanócitos

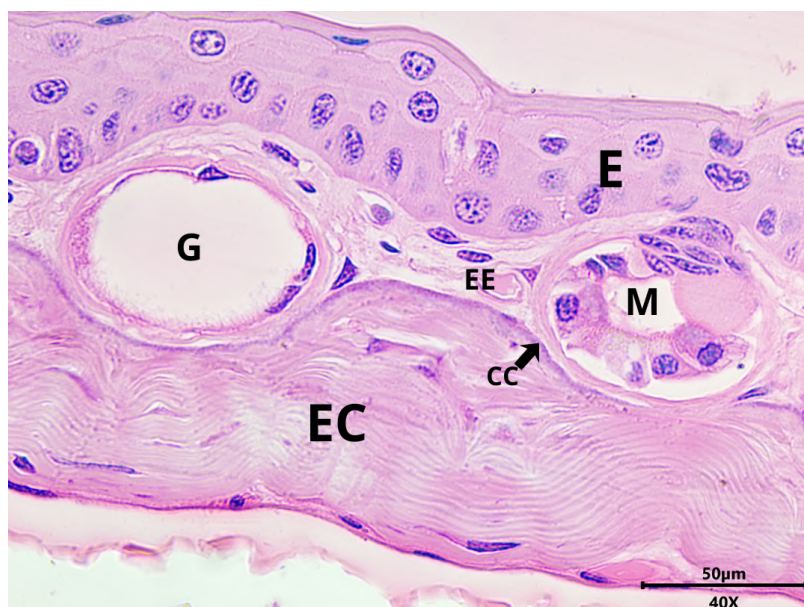


Fonte: imagens do autor.

3.2.2 Pele ventral

A pele ventral central de *H. binotatus* apresenta espessura média de $179,12 \pm 30,38 \mu\text{m}$. A epiderme é composta por três camadas celulares, com espessura média de $45,29 \pm 6,15 \mu\text{m}$. A derme é formada pelo estrato esponjoso ($43,43 \pm 9,81 \mu\text{m}$) e pelo estrato compacto ($87,63 \pm 13,67 \mu\text{m}$). Uma camada calcificada ($3,37 \pm 0,76 \mu\text{m}$) divide os estratos. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $69,20 \pm 7,13 \mu\text{m}$, enquanto as granulosas possuem diâmetro de $77,96 \pm 9,54 \mu\text{m}$. Ambas as glândulas são morfologicamente iguais às da pele dorsal. A região caracteriza-se pela ausência de melanócitos. Para a visualização das estruturas morfológicas da pele ventral central de *H. binotatus* e suas medidas morfométricas, consulte a Figura 4 e o Quadro 2, respectivamente.

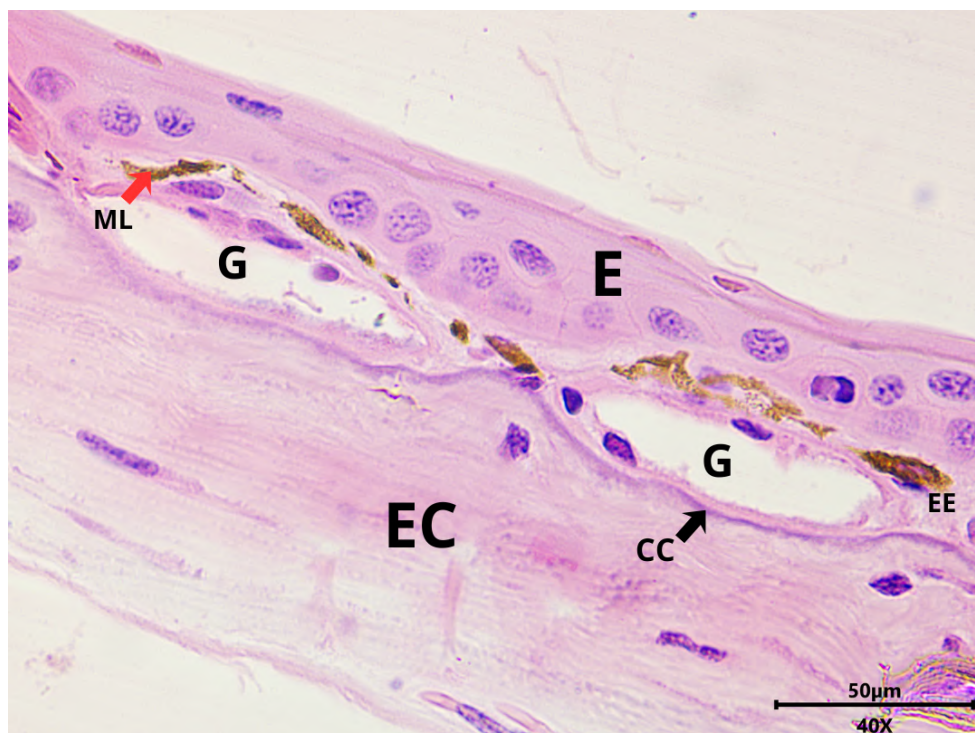
Figura 4 - Secção transversal da pele ventral central de *Haddadus binotatus* corada com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas mucosas (M); glândulas granulosas (G); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC). A seta preta indica a camada calcificada.



Fonte: imagem do autor.

A pele ventral femoral de *H. binotatus* possui espessura média de $122,84 \pm 30,34 \mu\text{m}$. A epiderme apresenta de duas a três camadas celulares (Figura 5), com espessura média de $26,28 \pm 5,20 \mu\text{m}$. A derme é composta pelos estratos esponjoso ($27,77 \pm 8,46 \mu\text{m}$) e compacto ($65,51 \pm 16,22 \mu\text{m}$). Entre eles, encontra-se a camada calcificada ($3,28 \pm 0,46 \mu\text{m}$). As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $68,19 \pm 5,72 \mu\text{m}$ e as granulosas $86,06 \pm 13,13 \mu\text{m}$, ambas morfologicamente semelhantes às da região dorsal. Melanócitos estão presentes de forma dispersa.-. Para a visualização das estruturas morfológicas da pele ventral femoral de *H. binotatus* e suas medidas morfométricas, consulte a Figura 5 e o Quadro 3, respectivamente.

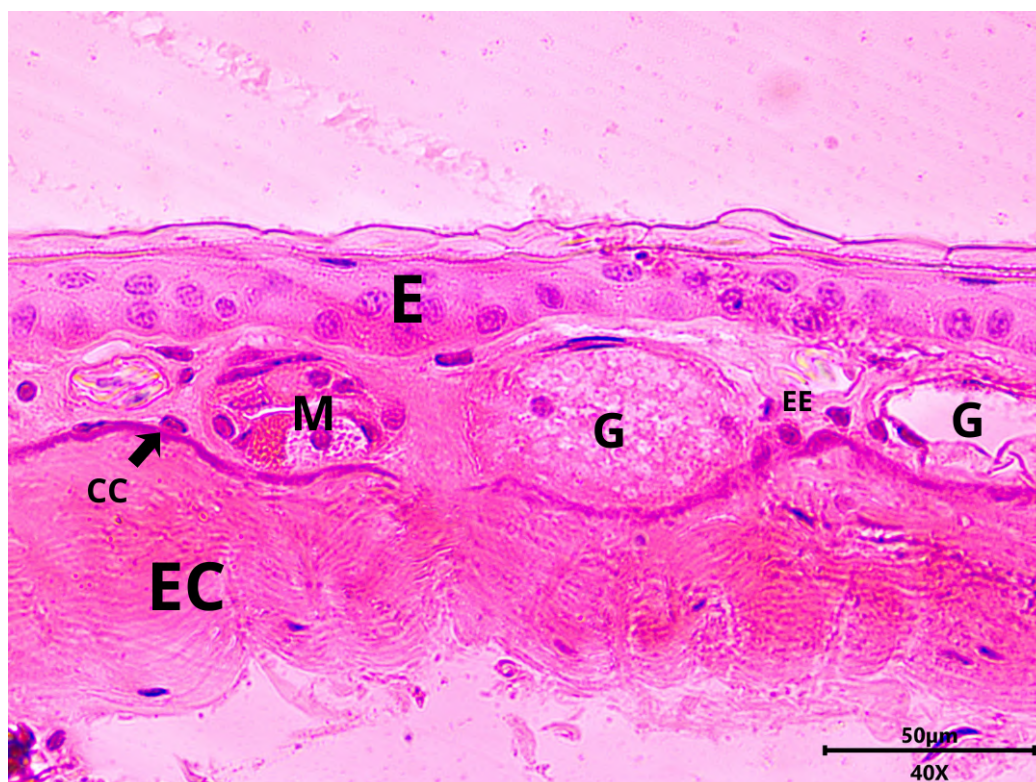
Figura 5 - Secção transversal da pele ventral femoral de *Haddadus binotatus* corada com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas granulosas (G); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC); melanócitos (ML). A seta preta indica a camada calcificada, enquanto a vermelha indica a camada de melanócitos.



Fonte: imagem do autor.

A pele ventral central de *I. henselii* apresenta espessura média de $105,28 \pm 16,22 \mu\text{m}$. A epiderme é composta por duas a três camadas celulares, com espessura média de $19,13 \pm 4,73 \mu\text{m}$. A derme também é formada pelo estrato esponjoso ($28,5 \pm 1,14 \mu\text{m}$) e pelo estrato compacto ($54,91 \pm 9,47 \mu\text{m}$). A camada calcificada ($2,74 \pm 0,88 \mu\text{m}$) está presente, separando os estratos. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $63,77 \pm 16,43 \mu\text{m}$ e as granulosa $53,47 \pm 14,02 \mu\text{m}$, mantendo a mesma morfologia da região dorsal. Não há melanócitos nesta região. As estruturas morfológicas da pele ventral central de *I. henselii* estão apresentadas na Figura 6, enquanto suas medidas morfométricas podem ser encontradas no Quadro 3.

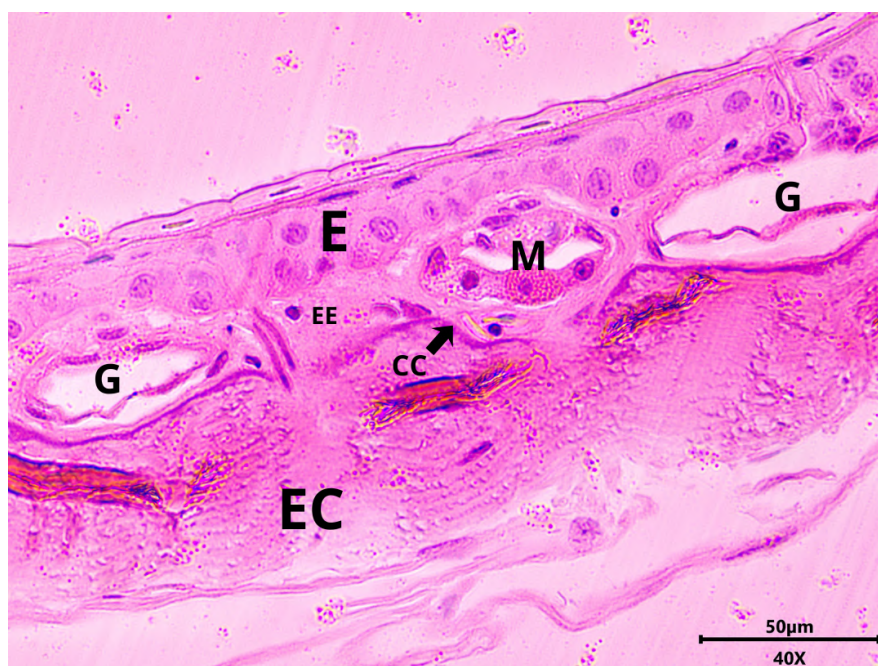
Figura 6 - Secção transversal da pele ventral central de *Ischnocnema henselii* corada com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas mucosas (M); glândulas granulosa (G); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC). A seta preta indica a camada calcificada.



Fonte: imagem do autor.

A pele ventral femoral de *I. henselii* caracteriza-se por espessura média de $97,45 \pm 24,74 \mu\text{m}$. A epiderme apresenta duas a três camadas celulares, com espessura média de $17,53 \pm 5,26 \mu\text{m}$. A derme é constituída pelos estratos esponjoso ($27,13 \pm 11,14 \mu\text{m}$) e compacto ($49,79 \pm 7,68 \mu\text{m}$). Entre eles, encontra-se a camada calcificada ($3,00 \pm 0,67 \mu\text{m}$). As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $57,78 \pm 4,52 \mu\text{m}$, enquanto as granulosas ($68,84 \pm 9,56 \mu\text{m}$). Melanócitos estão presentes de forma dispersa. A Figura 7 ilustra as estruturas morfológicas da pele ventral femoral de *I. henselii*, e o Quadro 3 reúne suas medidas morfométricas.

Figura 7 - Secção transversal da pele ventral femoral de *Ischnocnema henselii* corada com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas mucosas (M); glândulas granulosas (G); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC). A seta preta indica a camada calcificada.

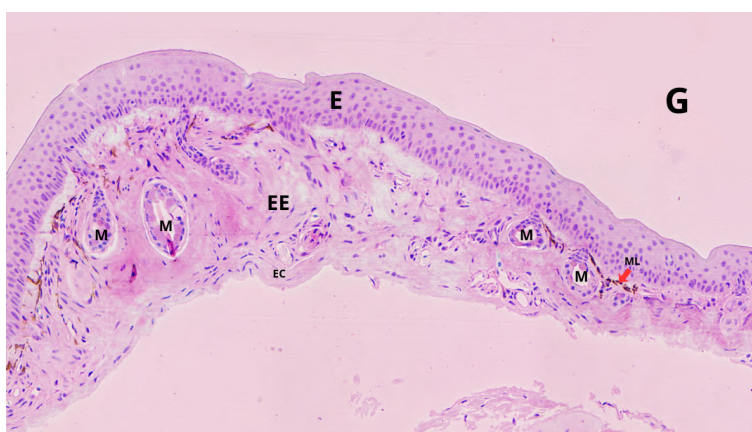


Fonte: imagem do autor.

3.3.3. Palmar

A pele palmar de *H. binotatus* caracteriza-se por espessura média de $317,24 \pm 117,20 \mu\text{m}$, oscilando em função da presença de tubérculos. Nos tubérculos, a epiderme é formada por cinco a seis camadas celulares, com espessura média de $84,82 \pm 11,57 \mu\text{m}$. A derme nessa região é composta por um volumoso estrato esponjoso ($162,38 \pm 89,38 \mu\text{m}$) e por um estrato compacto reduzido ($66,19 \pm 14,70 \mu\text{m}$). Nos tubérculos, a camada calcificada é ausente, e os melanócitos apresentam distribuição descontínua. Fora dos tubérculos, a epiderme é mais delgada, com cerca de quatro camadas celulares. A derme apresenta estrato esponjoso menos desenvolvido e estrato compacto proporcionalmente mais espesso. A camada calcificada ($3,85 \pm 1,54 \mu\text{m}$) está presente apenas nas regiões fora dos tubérculos, de forma parcial e descontínua, enquanto melanócitos distribuem-se de maneira contínua pelo estrato esponjoso. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $103,15 \pm 8,07 \mu\text{m}$ e as granulosas ($96,47 \pm 4,21 \mu\text{m}$), ambas situadas no estrato esponjoso e morfológicamente semelhantes às da região dorsal. Para detalhes sobre as estruturas morfológicas da pele palmar de *H. binotatus*, ver Figura 8; para as medidas morfométricas, ver Quadro 4.

Figura 8 - Secção transversal da pele palmar de *Haddadus binotatus* corada com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas mucosas (M); estrato compacto (EC); melanócitos (ML). A seta vermelha indica a camada de melanócitos.



Fonte: imagem do autor.

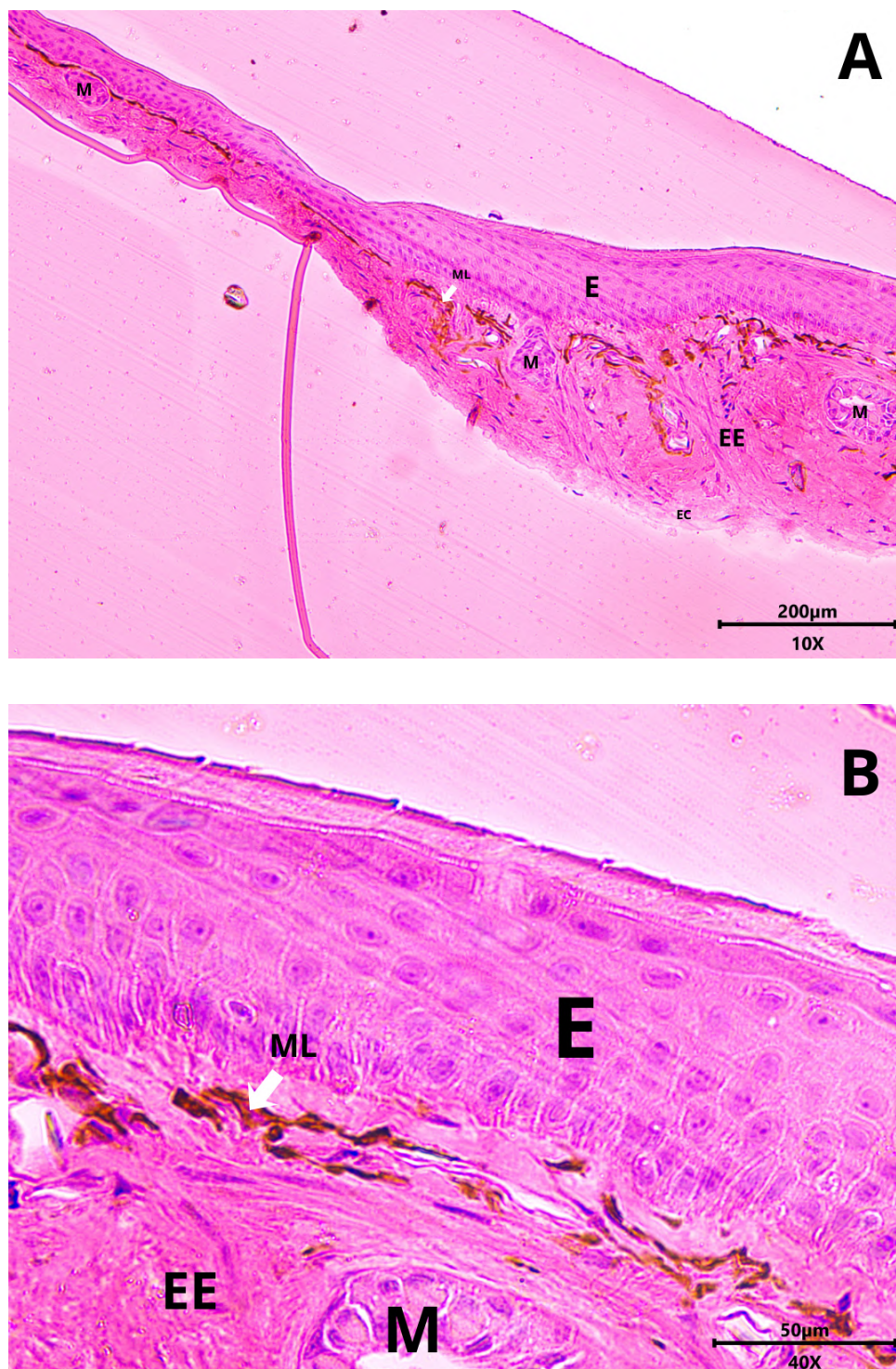
Figura 9 - Secção transversal da pele palmar de *Haddadus binotatus* corado com Hematoxilina-Eosina evidenciando glândula mucosa (M) e epiderme (E).



Fonte: imagem do autor.

A pele palmar de *I. henselii* caracteriza-se por espessura média de $145,46 \pm 65,39 \mu\text{m}$, variando em função da presença de tubérculos. Nos tubérculos, a epiderme é formada por três camadas celulares, com espessura média de $43,58 \pm 25,86 \mu\text{m}$, e a derme é composta predominantemente pelo estrato esponjoso ($70,79 \pm 27,42 \mu\text{m}$) e por um estrato compacto reduzido ($28,91 \pm 12,10 \mu\text{m}$). Nessa região, a camada calcificada é ausente, e os melanócitos distribuem-se de forma dispersa. Fora dos tubérculos, a epiderme é mais delgada, com duas camadas celulares. A derme acompanha essa redução, com estrato esponjoso menos desenvolvido e estrato compacto mais espesso. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $79,50 \pm 10,43 \mu\text{m}$ e as granulosa ($77,37 \pm 25,40 \mu\text{m}$), mantendo a mesma morfologia descrita para o restante do organismo. Para detalhes sobre as estruturas morfológicas da pele palmar de *I. henselii*, ver Figura 10; para as medidas morfométricas, ver Quadro 4.

Figura 10 - Secções transversais da pele palmar de *Ischnocnema henselii* coradas em Hematoxilina-Eosina no aumento de 10x (A) e 40x (B). Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândulas mucosas (M); estrato compacto (EC); melanócitos (ML). A seta branca indica a camada de melanócitos.

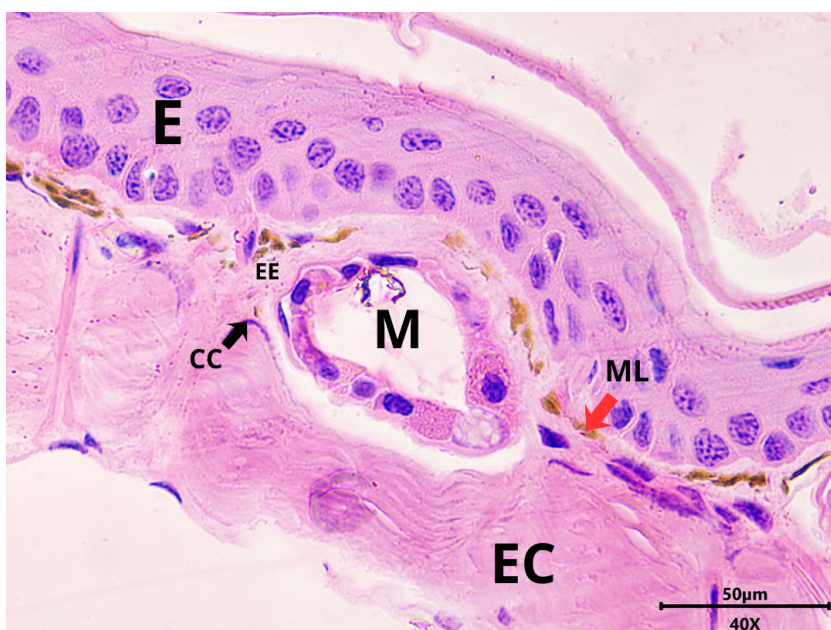


Fonte: imagens do autor.

3.3.4. Plantar

A pele plantar de *H. binotatus* apresenta espessura média de $154,18 \mu\text{m} \pm 39,47 \mu\text{m}$, semelhante ao palmar, mas em menor proporção, já que possui tubérculos de menor tamanho. A epiderme é composta por quatro camadas celulares, com espessura média de $54,52 \mu\text{m} \pm 11,57 \mu\text{m}$. A derme é constituída pelos estratos esponjoso ($42,09 \mu\text{m} \pm 13,11 \mu\text{m}$) e compacto ($54,32 \mu\text{m} \pm 13,79 \mu\text{m}$). Entre eles, encontra-se a camada calcificada ($3,26 \mu\text{m} \pm 1,01 \mu\text{m}$), contínua em toda a região. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $89,72 \mu\text{m} \pm 14,19 \mu\text{m}$ e as granulosas ($83,96 \mu\text{m} \pm 27,85 \mu\text{m}$), ambas localizadas no estrato esponjoso. Uma delgada camada de melanócitos distribui-se regularmente ao longo do estrato esponjoso. Para detalhes sobre as estruturas morfológicas da pele palmar de *H. binotatus*, ver Figura 11; para as medidas morfométricas, ver Quadro 5.

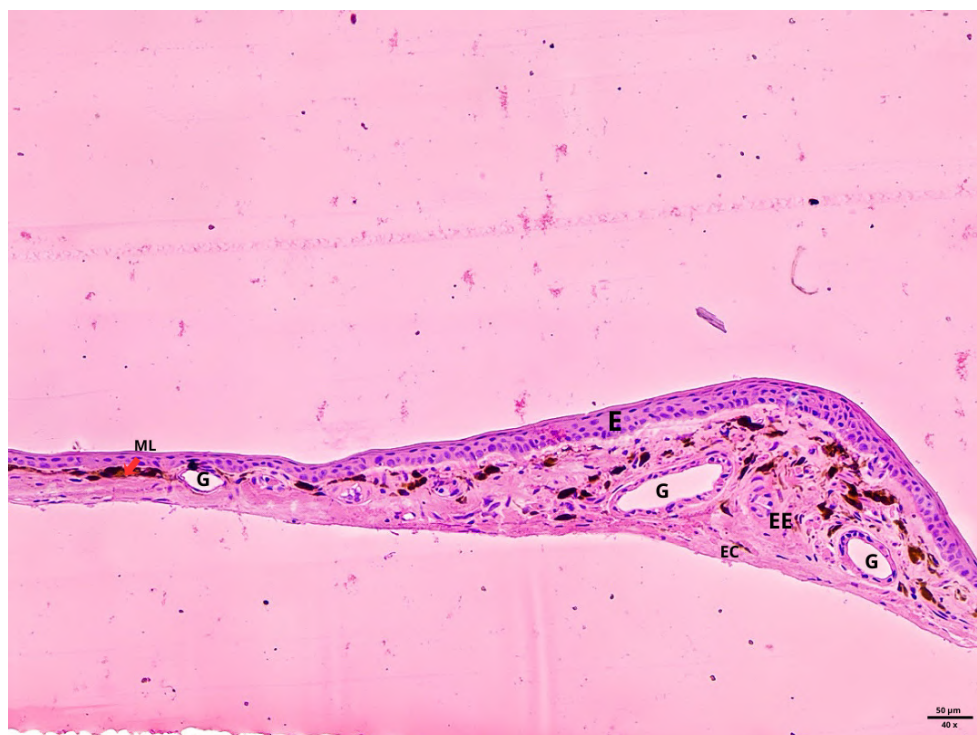
Figura 11 - Secção transversal da pele plantar de *Haddadus binotatus* corado com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândula mucosas (M); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC); melanócitos (ML). A seta preta indica a camada calcificada, enquanto a vermelha indica a camada de melanócito.



Fonte: imagem do autor.

A pele plantar de *I. henselii* caracteriza-se por espessura média de $78,74 \pm 32,68 \mu\text{m}$. A epiderme é composta por três camadas celulares nos tubérculos e por duas nas regiões remanescentes, com espessura média de $23,97 \pm 11,80 \mu\text{m}$. A derme divide-se em estrato esponjoso ($20,85 \pm 13,14 \mu\text{m}$) e compacto ($30,85 \pm 6,34 \mu\text{m}$). A camada calcificada ($3,07 \pm 1,40 \mu\text{m}$) está presente, separando os estratos. As glândulas mucosas apresentam diâmetro médio de $68,50 \pm 24,35 \mu\text{m}$ e as granulosas ($61,31 \pm 11,03 \mu\text{m}$). Os melanócitos distribuem-se de forma dispersa nos tubérculos e contínua nas áreas mais delgadas. Para detalhes sobre as estruturas morfológicas da pele palmar de *I. henselii*, ver Figura 12; para as medidas morfométricas, ver Quadro 5.

Figura 12 - Secção transversal da pele plantar de *Ischnocnema henselii* corado com Hematoxilina-Eosina. Legenda: epiderme (E); estrato esponjoso (EE); glândula granulosa (G); camada calcificada (CC); estrato compacto (EC); melanócitos (ML). A seta preta indica a camada calcificada, enquanto a vermelha indica a camada de melanócito.



Fonte: imagem do autor.

3.2. Comparação morfométrica entre as espécies

3.2.1 Pele dorsal

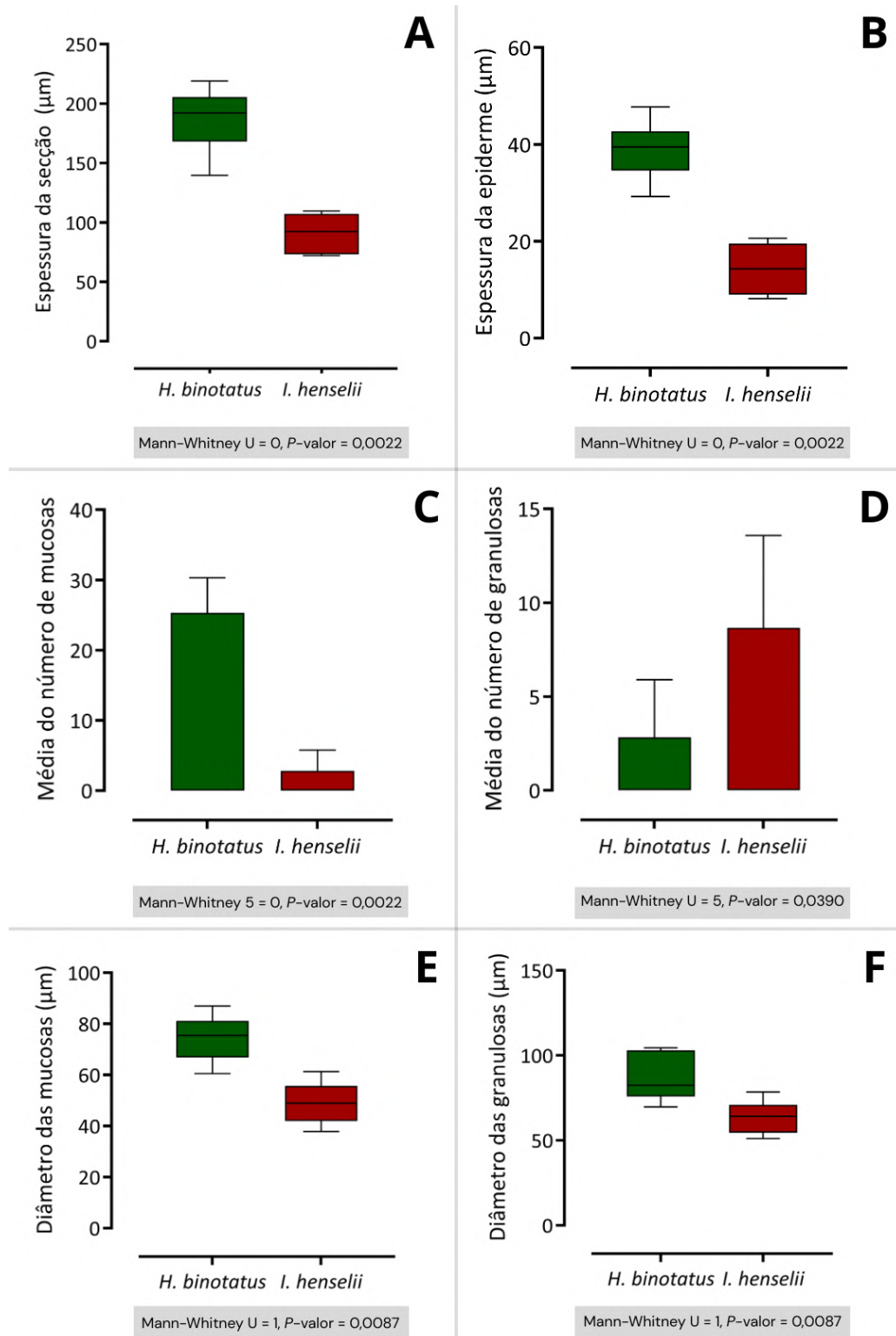
A pele dorsal de *H. binotatus* é marcadamente mais espessa que a de *I. henselii*, tanto na epiderme (Mann-Whitney = 0, P -valor = 0,002; Figura 13A), quanto na espessura total (Mann-Whitney = 0, P -valor = 0,002; Figura 13B). *Ischnocnema henselii* apresenta maior número de glândulas granulosas (Mann-Whitney = 5; P = 0,039; Figura 13D), embora o diâmetro dessas estruturas seja inferior ao observado em *H. binotatus* (Mann-Whitney = 1; P = 0,008; Figura 13F). Em contraste, as glândulas mucosas são significativamente mais numerosas em *H. binotatus* (Mann-Whitney = 0; P = 0,002; Figura 13C) e também exibem maior diâmetro nessa espécie (Mann-Whitney = 5; P = 0,009; Figura 13E).

Quadro 1 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região dorsal de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.

Variáveis	<i>H. binotatus</i>	<i>I. henselii</i>
Espessura total	186,91 $\pm$ 31,56 μ m	91,17 $\pm$ 21,38 μ m
Espessura da epiderme	38,90 $\pm$ 6,11 μ m	14,32 $\pm$ 5,14 μ m
Número de mucosas	25,33 $\pm$ 4,97	3,83 $\pm$ 3,87
Diâmetro das mucosas	74,44 $\pm$ 9,05 μ m	48,57 $\pm$ 8,47 μ m
Número de granulosas	2,83 $\pm$ 3,06	10 $\pm$ 6,99
Diâmetro das granulosas	88,01 $\pm$ 14,61 μ m	61,90 $\pm$ 9,66 μ m

Fonte: autoral.

Figura 13 - Gráficos de caixas comparativos entre os valores médios da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares na região dorsal de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.



Fonte: autoral.

3.2.2 Pele ventral central

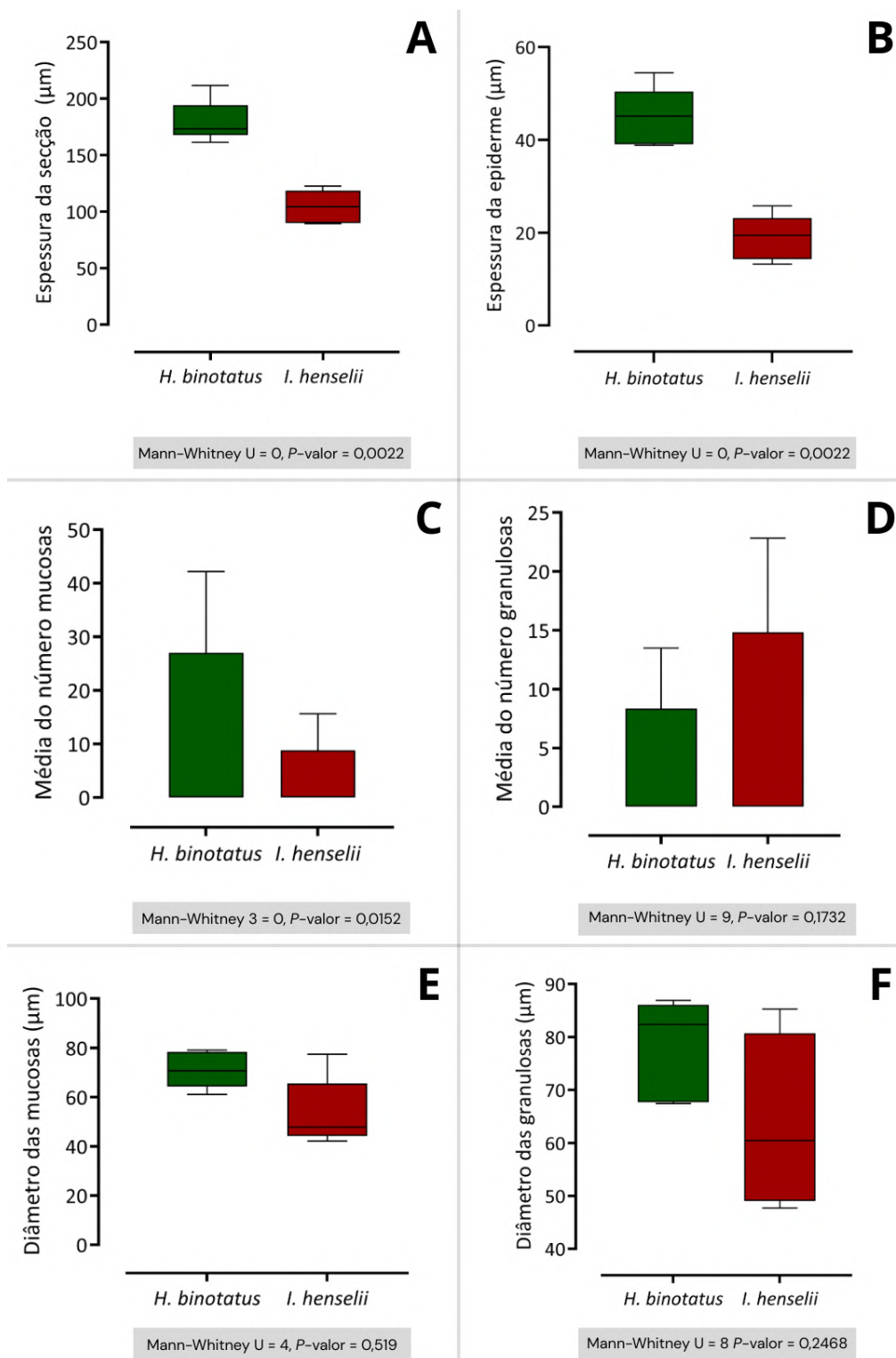
Na região ventral central, *H. binotatus* apresenta pele (Mann-Whitney = 0, *P*-valor = 0,002; Figura 14A) e epiderme (Mann-Whitney = 0, *P*-valor = 0,002; Figura 14B) mais espessas que *I. henselii*. Não foram observadas diferenças no número de glândulas granulosas entre as espécies (Mann-Whitney = 9, *P*-valor = 0,173; Figura 14D), assim como no diâmetro dessas glândulas (Mann-Whitney = 8, *P*-valor = 0,246; Figura 14F). As glândulas mucosas em *I. henselii* são menos numerosas (Mann-Whitney = 3, *P*-valor = 0,015; Figura 14C), mas não apresentam diferenças no diâmetro em relação a *H. binotatus* (Mann-Whitney = 4, *P*-valor = 0,519; 14E).

Quadro 2 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares na região ventral central de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.

Variáveis	<i>H. binotatus</i>	<i>I. henselii</i>
Espessura total	179,12 $\pm$ 30,38 μ m	105,28 $\pm$ 16,22 μ m
Espessura da epiderme	45,29 $\pm$ 6,15 μ m	19,13 $\pm$ 1,14 μ m
Número de mucosas	27 $\pm$ 15,18	8,83 $\pm$ 6,79
Diâmetro das mucosas	69,20 $\pm$ 7,13 μ m	53,47 $\pm$ 14,02 μ m
Número de granulosas	8,33 $\pm$ 5,16	14,83 $\pm$ 7,99
Diâmetro das granulosas	77,96 $\pm$ 9,54 μ m	63,77 $\pm$ 16,43 μ m

Fonte: autoral.

Figura 14 - Gráficos de caixas comparativos entre os valores médios da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região ventral central de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.



Fonte: autoral.

3.3.3 Pele ventral femoral

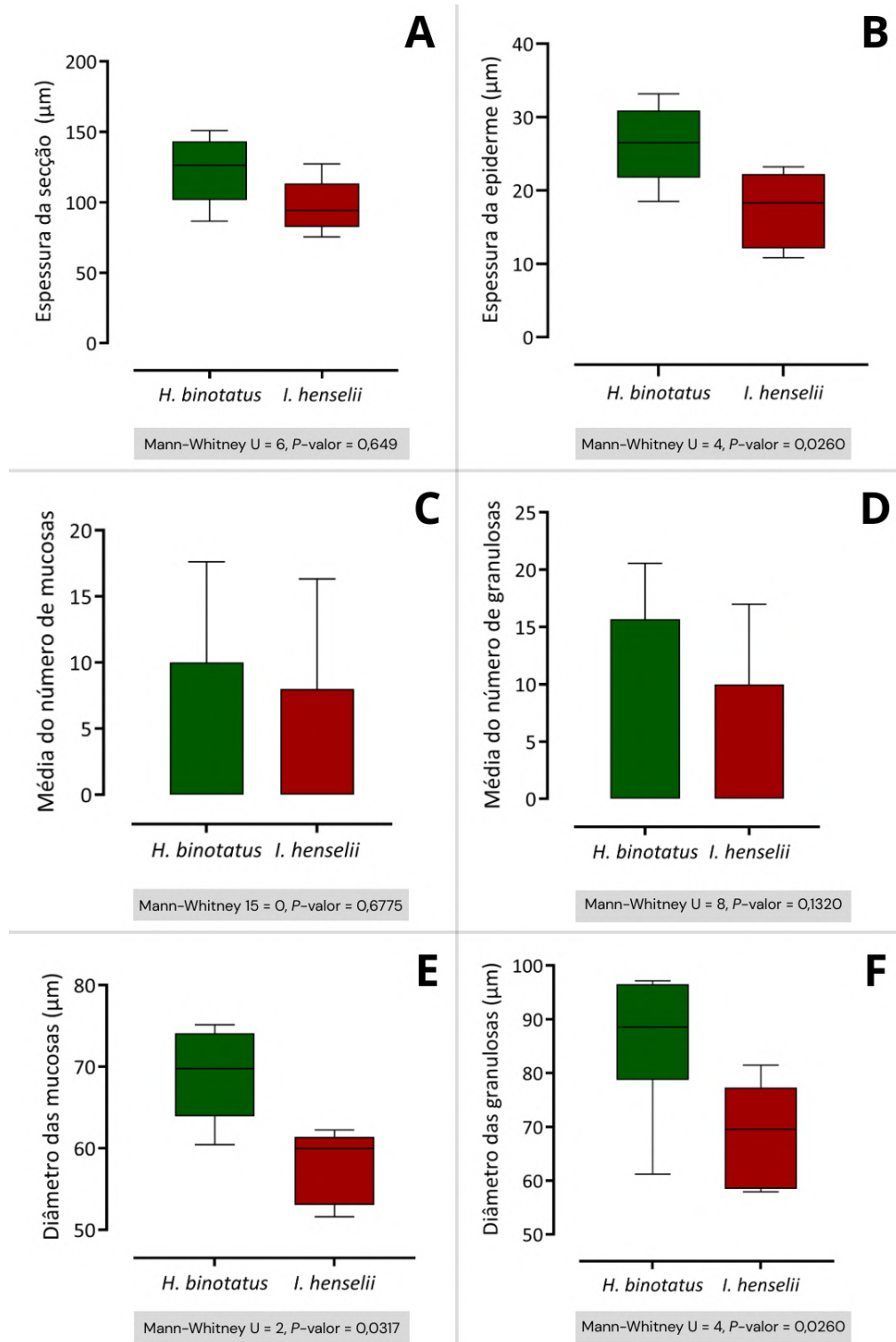
As peles ventrais femorais de *H. binotatus* e de *I. henselii* não apresentam diferenças na espessura total (Mann-Whitney = 6, *P*-valor = 0,649; Figura 15A), apenas a epiderme, que é mais espessa em *H. binotatus* (Mann-Whitney = 4, *P*-valor = 0,026; Figura 15B). Não há diferenças no número de glândulas granulosas entre as espécies (Mann-Whitney = 8, *P*-valor = 0,132; Figura 15D), mas o diâmetro médio destas glândulas é maior em *H. binotatus* (Mann-Whitney = 4, *P*-valor = 0,026; Figura 15F). Já para as glândulas mucosas, também não há diferenças no número para ambas as espécies (Mann-Whitney = 15, *P*-valor = 0,677; Figura 15C), apenas no diâmetro médio, que é menor em *I. henselii* (Mann-Whitney = 2, *P*-valor = 0,031; Figura 15E).

Quadro 3 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região ventral femoral de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.

Variáveis	<i>H. binotatus</i>	<i>I. henselii</i>
Espessura total	122,84 $\pm$ 30,34 μ m	97,45 $\pm$ 24,74 μ m
Espessura da epiderme	26,28 $\pm$ 5,20 μ m	17,53 $\pm$ 5,26 μ m
Número de mucosas	10 $\pm$ 7,62	8 $\pm$ 6,32
Diâmetro das mucosas	69,18 $\pm$ 5,72 μ m	57,78 $\pm$ 4,52 μ m
Número de granulosas	15,67 $\pm$ 4,89	19,17 $\pm$ 11,02
Diâmetro das granulosas	86,06 $\pm$ 13,13 μ m	68,84 $\pm$ 9,52 μ m

fonte: autoral.

Figura 15 - Gráficos de caixas comparativos entre os valores médios da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região ventral femoral de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.



Fonte: autoral.

3.3.4 Pele palmar

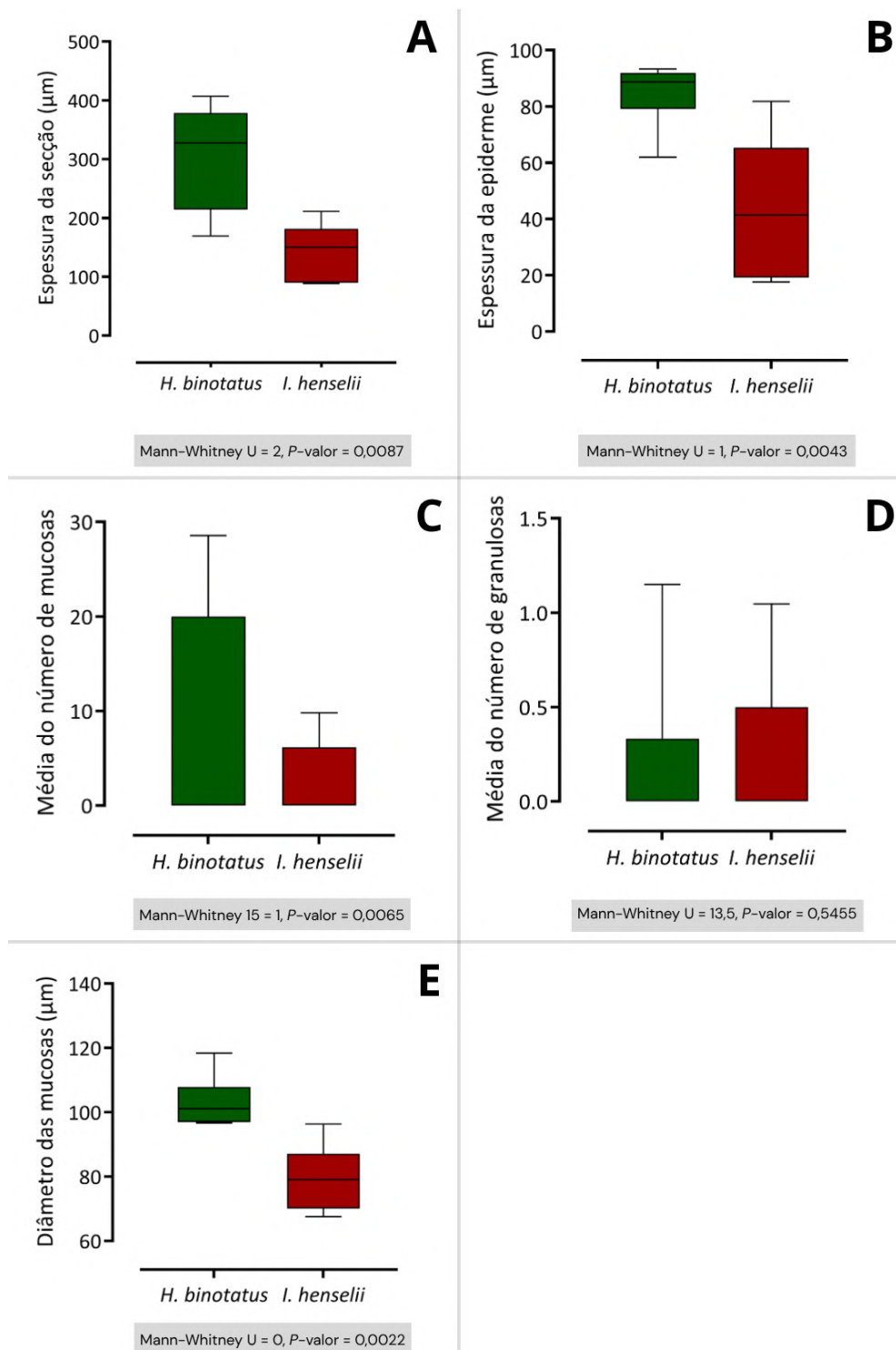
Na pele palmar, *H. binotatus* apresenta maior espessura total (Mann-Whitney = 2, *P*-valor = 0,008; Figura 16A) e de epiderme em comparação a *I. henselii* (Mann-Whitney = 1, *P*-valor = 0,004; Figura 16B). O número médio de glândulas granulosas não é diferente entre as espécies (Mann-Whitney = 13,5, *P*-valor = 0,545; Figura 16C). As glândulas mucosas também são mais numerosas (Mann-Whitney = 1, *P*-valor = 0,006; Figura 16D) e maiores em *H. binotatus* (Mann-Whitney = 0, *P*-valor = 0,002; Figura 16E). Não foi possível realizar o teste estatístico para o diâmetro de glândulas granulares, pois o número de glândulas granulosas na região palmar foi muito baixo nas duas espécies, tendo sido identificado um total de três para os indivíduos de *H. binotatus* (n = 6) e de três para *I. henselii* (n = 6).

Quadro 4 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região palmar de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.

Variáveis	<i>H. binotatus</i>	<i>I. henselii</i>
Espessura total	317,24 $\pm$ 117,20 μ m	145,46 $\pm$ 63,39 μ m
Espessura da epiderme	84,82 $\pm$ 11,57 μ m	43,58 $\pm$ 25,86 μ m
Número de mucosas	20 $\pm$ 8,56	6,17 $\pm$ 3,66
Diâmetro das mucosas	103,15 $\pm$ 8,07 μ m	79,5 $\pm$ 10,43 μ m
Número de granulosas	0,40 $\pm$ 0,82	0,5 $\pm$ 0,55
Diâmetro das granulosas	96,47 $\pm$ 4,21 μ m	77,37 $\pm$ 25,40 μ m

Fonte: autoral

Figura 16 - Gráficos de caixas comparativos entre os valores médios da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região palmar de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.



Fonte: autoral

3.3.5 Pele Plantar

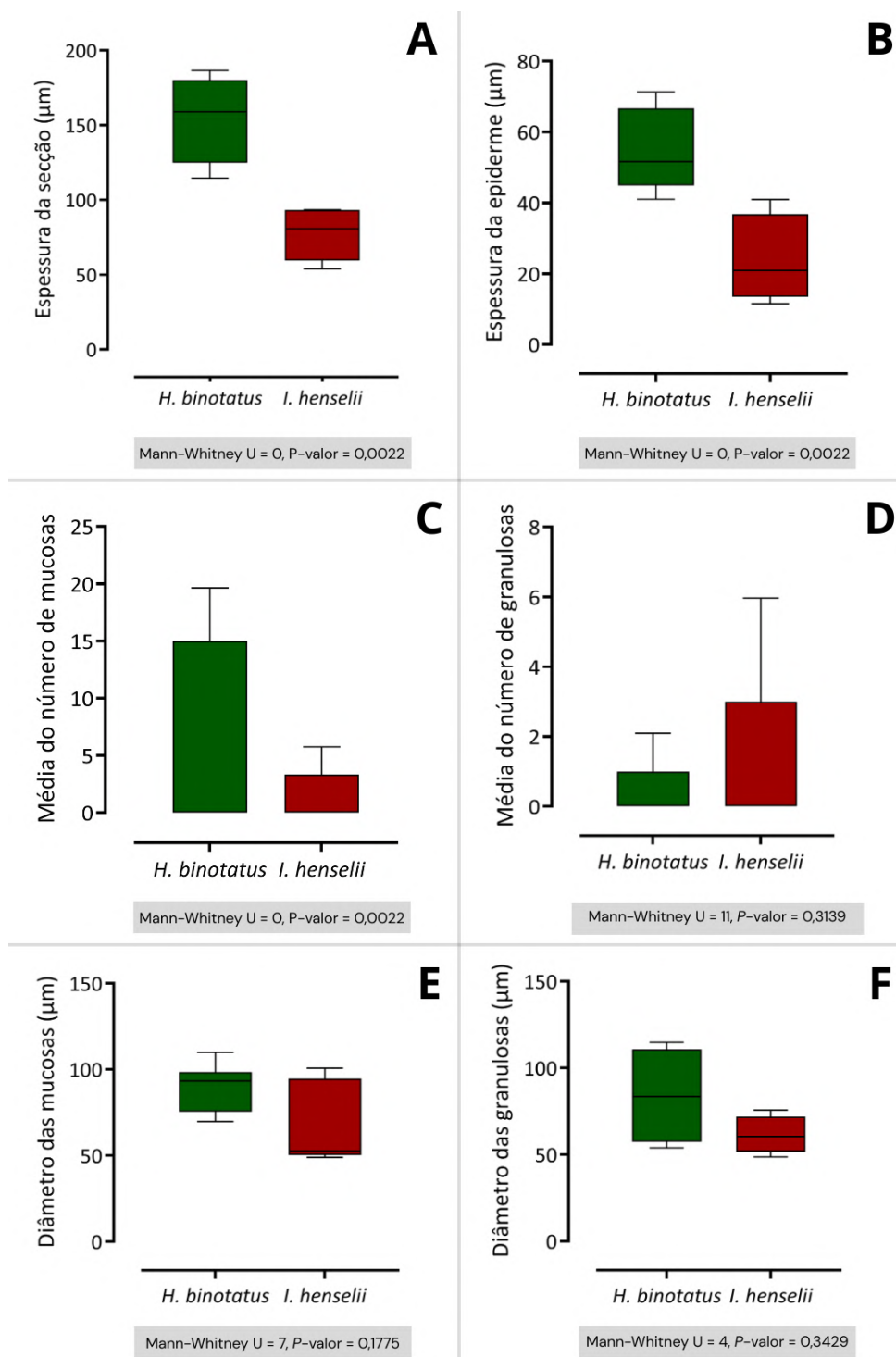
A pele plantar de *H. binotatus* apresenta maior espessura total (Mann-Whitney = 0, *P*-valor = 0,002; Figura 17A) e de epiderme (Mann-Whitney = 0, *P*-valor = 0,002; Figura 17B) em relação a *I. henselii*. Quanto às glândulas granulares, não foram observadas diferenças entre as espécies, tanto no número (Mann-Whitney = 11, *P*-valor = 0,313; Figura 17D), quanto no diâmetro (Mann-Whitney = 4, *P*-valor = 0,342; Figura 17F). Para as glândulas mucosas, elas são mais abundantes em *H. binotatus* (Mann-Whitney = 7, *P*-valor = 0,002; Figura 17C), porém não apresentam diferenças no diâmetro em comparação com *I. henselii* (Mann-Whitney = 1, *P*-valor = 0,177; Figura 17E).

Quadro 5 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região plantar de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.

Variáveis	<i>H. binotatus</i>	<i>I. henselii</i>
Espessura total	154,18 $\mu\text{m} \pm 39,47 \mu\text{m}$	78,74 $\mu\text{m} \pm 32,08 \mu\text{m}$
Espessura da epiderme	54,52 $\mu\text{m} \pm 11,57 \mu\text{m}$	23,97 $\mu\text{m} \pm 11,80 \mu\text{m}$
Número de mucosas	20 $\mu\text{m} \pm 4,65$	3,33 $\pm 2,42$
Diâmetro das mucosas	89,72 $\mu\text{m} \pm 14,19 \mu\text{m}$	68,50 $\mu\text{m} \pm 24,35 \mu\text{m}$
Número de granulosas	3,29 $\pm 1,01$	9 $\pm 2,97$
Diâmetro das granulosas	83,96 $\mu\text{m} \pm 27,85 \mu\text{m}$	61,31 $\mu\text{m} \pm 11,03 \mu\text{m}$

Fonte: autoral

Figura 17 - Gráficos de caixas comparativos entre os valores médios da espessura da epiderme, espessura total da pele e características glandulares da região plantar de *Haddadus binotatus* e *Ischnocnema henselii*.



Fonte: autoral

4 DISCUSSÃO

Como previsto na hipótese deste estudo, tanto a epiderme quanto a derme de *H. binotatus* são mais espessas que as de *I. henselii*. Isso ocorre provavelmente, porque quanto maior for uma espécie, mais espessa tende a ser a pele (Wada *et al.*, 2024). *Haddadus binotatus*, cujos indivíduos deste estudo apresentam CRC médio de $61,04 \pm 4,00$ mm, é maior que *I. henselii*, cujos indivíduos apresentam CRC médio de $29,41 \pm 1,04$ mm, corroborando as observações de Wada *et al.* (2024). Estes resultados levantam novas hipóteses sobre a relação entre o tamanho corpóreo dos anfíbios e a sua susceptibilidade à quitridiomíose. Desse modo, indivíduos de maior porte poderiam apresentar uma epiderme proporcionalmente mais espessa, o que potencialmente ofereceria uma barreira física mais eficiente contra a penetração e infecção pelo patógeno.

Espécies do clado Brachycephaloidea (Günther, 1858), especialmente da família Brachycephalidae (Günther, 1858), a família de *I. henselii*, apresentam uma epiderme relativamente delgada, composta por poucas camadas celulares. *Brachycephalus rotenbergae* (Nunes *et al.*, 2021) e *Brachycephalus pitanga* (Alves, 2009) possuem epiderme composta por uma a duas camadas celulares (Medina, 2023). De forma semelhante, *Ischnocnema parva* (Girard, 1853) e *Eleutherodactylus johnstonei* (Barbour, 1914) apresentam três a quatro camadas em ambas as regiões (Medina, 2023). Nesse contexto, *I. henselii* possui um padrão intermediário, com duas a três camadas celulares tanto na região dorsal quanto na ventral. Esses dados sugerem que uma epiderme delgada possa representar um padrão conservado no grupo.

Em *H. binotatus*, a epiderme se mostrou consideravelmente mais delgada quando comparada com espécies filogeneticamente próximas. Anuros do gênero *Pristimantis* (de la Espada, 1870) apresentam epiderme que varia de cerca de 50 μ m, como em *P. cryptomelas* (Lynch, 1979), *P. huicundo* (Guayasamin *et al.*, 2004) e *P. ocreatus* (Lynch, 1981), e até cerca de 620 μ m, como em *P. andinogigas* (Yáñez-Muñoz *et al.*, 2019; Sánchez-Nivicela, 2023). Em comparação, a espessura da epiderme em *H. binotatus* para as regiões dorsal e ventral é de 38,90 μ m e 45,29 μ m, respectivamente. Assim, embora apresente uma pele mais delgada em comparação às espécies mais próximas, *H. binotatus* mantém uma epiderme mais

espessa que *I. henselii*, o que reforça a possibilidade de trajetórias evolutivas distintas entre as duas espécies de estudo.

Uma possível explicação para a maior infecção em *I. henselii* é a menor espessura da pele na região ventral, comparada a *H. binotatus*. A pele do ventre é especializada na absorção de água e mantém contato constante com o substrato úmido, propício para o contato e penetração do fungo através da pele (Toledo, Jared, 1993), especialmente se considerarmos que a transmissão deste patógeno acontece a partir do contato do anfíbio com corpos de água (Longcore, Pessier, Nichols, 2019). Assim, como a região é uma das mais afetadas quando contaminadas com o Bd (Pessier *et al.*, 1999), é possível que a maior espessura de *H. binotatus* sirva como uma forma de proteção mecânica à infecção.

Nossa segunda hipótese previa que *H. binotatus* apresentaria maior quantidade de glândulas granulares distribuídas pelo corpo, uma vez que essa espécie demonstra maior resistência à infecção pelo quitrídio. Essas glândulas secretam peptídeos antimicrobianos (AMPs), conhecidos por atuar no combate ao Bd (Rollins-Smith *et al.*, 2002), o que inicialmente sugeriu maior abundância em *H. binotatus*. Entretanto, os resultados revelaram o oposto: em comparação com *I. henselii*, *H. binotatus* apresentou maior abundância de glândulas mucosas do que granulares. Isso sugere que outros fatores podem estar envolvidos na resistência de *H. binotatus* ao fungo.

A alta quantidade de glândulas mucosas pode influenciar na resistência de *H. binotatus* ao Bd, provavelmente devido ao mucossoma. O mucossoma, como dito anteriormente, é um microecossistema formado pelo muco produzido pelas glândulas mucosas e pelas secreções das glândulas granulares (Woodhams *et al.*, 2014). Ele contém AMPs, anticorpos, alcaloides e metabólitos da microbiota cutânea, desempenhando papel crucial na proteção contra patógenos externos (Woodhams *et al.*, 2014). Em um estudo anterior Martins *et al.* (2022) observaram que o bacterioma de *H. binotatus* apresenta alta diversidade taxonômica e estruturação de comunidade microbiana. Considerando que *H. binotatus* apresenta maior quantidade de glândulas mucosas em relação às granulares, é possível supor que uma maior produção e secreções mucosas possa favorecer uma microbiota mais diversa, que atuaria inibindo a colonização pelo fungo Bd.

Ischnocnema henselii apresentou maior abundância de glândulas granulares. Essa espécie parece seguir um padrão de distribuição de glândulas diferente de

outros Brachycephalidae. Clemente-Carvalho (2009) mostra que representantes de *Brachycephalus* (Fitzinger, 1826) apresentam predominância de glândulas mucosas em relação às granulares, o inverso do padrão encontrado em *I. henselii* neste estudo.

A região palmar revelou características relevantes que merecem destaque. Para ambas as espécies, ela é caracterizada por variações na espessura, com aumento do estrato esponjoso e do estrato compacto na área dos tubérculos em comparação com a pele adjacente. No que se refere às glândulas, ambas as espécies apresentam predominância de glândulas mucosas nessa região, característica também observada em outros anuros (Luna, McDiarmid, Faivovich, 2018). As glândulas granulares, por sua vez, foram pouco representativas nesta região. Esses resultados, em conjunto, sugerem que a região palmar está menos relacionada a mecanismos de defesa químicos; e, apesar do espessamento observado, essa região pode estar mais susceptível à infecção devido à preferência do patógeno por áreas queratinizadas (Longcore, Pessier, Nichols, 2019).

A ausência da camada calcificada na região palmar também levanta importantes considerações sobre o papel dessa área na absorção e regulação hídrica. A camada calcificada é descrita como um componente dérmico associado à proteção contra a desidratação (Toledo, Jared, 1993). O espessamento acentuado da epiderme e da derme palmar pode atuar como uma barreira física adicional, reduzindo a perda de água por evaporação e, ao mesmo tempo, regulando sua absorção a partir do substrato úmido (Alexander *et al.*, 2018). Dessa forma, essas camadas mais espessas de pele poderiam suprir, ao menos em parte, a função de proteção contra o ressecamento que seria desempenhada pela camada calcificada, tornando sua presença menos necessária para o equilíbrio hídrico..

Os resultados obtidos neste estudo oferecem contribuições significativas, mas revelam aspectos que merecem atenção em investigações futuras. A sexagem das espécies não foi realizada, o que impede a análise de possíveis diferenças morfológicas relacionadas ao sexo. A utilização de apenas um tipo de corante restringiu a visualização de certas estruturas cutâneas, limitando a caracterização completa das camadas da pele e das glândulas presentes. Além disso, nossos achados não permitem a afirmação de uma relação causal entre as características da pele de *H. binotatus* e *I. henselii* e suas vulnerabilidades à quitridiomicose.

Diante disso, recomenda-se que estudos futuros explorem esses aspectos, possibilitando uma análise mais abrangente, profunda e integrada das estruturas cutâneas e seus papéis na resistência às doenças dérmicas de anfíbios. Por fim, estudos subsequentes também devem investigar a composição das glândulas mucosas e granulosas, bem como suas atividades biológicas, buscando compreender como estas podem interagir com o Bd. Além disso, é essencial avaliar experimentalmente como a pele das duas espécies responde à infecção pelo Bd e quais alterações morfológicas ocorrem ao longo de um processo infeccioso, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da resistência e vulnerabilidade desses anuros frente a esse agente patogênico.

5 CONCLUSÃO

- *Haddadus binotatus* apresentou pele mais espessa em comparação com *Ischnocnema henselii*.
- *Haddadus binotatus* apresentou predominância de glândulas mucosas em praticamente todas as regiões do corpo, exceto na região ventral femoral.
- *Ischnocnema henselii* apresentou maior quantidade de glândulas granulares distribuídas pelo corpo em comparação com *Haddadus binotatus*.
- A região palmar contém o tegumento com maior espessura e o maior diâmetro de glândulas para ambas as espécies, em comparação com as outras regiões.
- As diferenças observadas entre as duas espécies podem indicar estratégias distintas de organização tegumentar e permitem elaborar hipóteses sobre como cada uma lida com a infecção pelo quitrídio.
- A resistência de *Haddadus binotatus* à infecção pelo Bd pode estar relacionada ao mucossoma da pele, dada a predominância de glândulas mucosas.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, H.; BROWN, S.; DANBY, S.; FLOHR, C. Research techniques made simple: transepidermal water loss measurement as a research tool. **Journal of Investigative Dermatology**, Estados Unidos da América, v. 138, n. 11, p. 2295-2300, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.09.001>. Acesso em: 30. set. 2025.
- ASSIS, A. B., RODRÍGUEZ, D., NEELY, W., LOPES, C. M., PRIST, P., NAVAS, C. A., MARTINS, R. A., HADDAD, C. F. B., BECKER, C. G. Environmental detection of the amphibian chytrid fungus in water bodies predicts host infection along a deforestation gradient. In prep.
- BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Trends in Biotechnology**, Inglaterra, v. 13, n. 6, p. 205-209, Jun. 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)88947-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)88947-7). Acesso em: 6. mai. 2025.
- BERGER, L.; HYATT, D. A.; SPEARE, R.; LONGCORE, E. J. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Alemanha, v. 68, n. 1, p. 51-63, dez. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3354/dao068051>. Acesso em: 31. mar. 2025.
- CAMPANTICO, E.; GUARDABASSI, A.; TORASSO, L. Histological changes in *Xenopus laevis* Daudin adult specimens kept under dry conditions, then moved back to their natural aquatic environment. II. Skin, kidney and interrenal tissue. **Archivio di scienze biologiche**, Italia, v. 62, n. 1, p. 63-76, Jan. 1978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/318018>. Acesso em: 6. mai. 2025.
- CAREY, C.; BRUZGUL, E. J.; LIVO, J. L.; WALLING, L. M.; KUEHL, A. K.; DIXON, F. B.; PESSIER, P. A.; ALFORD, A. R.; ROGERS, B. K. Experimental Exposures of Boreal Toads (*Bufo boreas*) to a Pathogenic Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). **EcoHealth**, Estados Unidos da América, v. 3, n. 1, p. 5-21, Mar. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-005-0006-4>. Acesso em: 2. abr. 2025.
- CLARKE, T. B. The Natural History Of Amphibian Skin Secretions, Their Normal Functioning And Potential Medical Applications. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Inglaterra, v. 72, n. 3, p. 365-379, ago. 1997. Disponível em: doi: 10.1017/s0006323197005045. Acesso em: 26. mar. 2025.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; HADDAD, C. F. B.; ALVES, A. C. R.; ROCHA, A. H.; PEREIRA, G. R.; OLIVEIRA, F. D.; LOPES, T. R.; DOS REIS, S. F. Hyperossification in Miniaturized Toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): Microscopic Structure and Macroscopic Patterns of Variation. **Journal of Morphology**, Estados Unidos da América, v. 270, n. 11, p. 1285-1295, nov. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmor.10755>. Acesso em: 28. set. 2025.

COCO, L.; JUNIOR, N, T, B, V.; FUSINNATO, A, L.; KIEFER, C, M.; OLIVEIRA, C, F, J.; ARAUJO, G, P.; COSTA, M, B.; SLUYS, V, M.; ROCHA, D, F. Feeding habits of the leaf litter frog *Haddadus binotatus* (Anura, Craugastoridae) from two Atlantic Forest areas in southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 239-249, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-37652014113012>. Acesso em: 1. abr. 2025.

COLLINS, P, J. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of Aquatic Organisms**, Alemanha, v. 92, n. 2, p. 93-99, Nov. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/dao02307>. Acesso em: 1. abr. 2025.

DALY, J, W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **National Academy of Sciences. Washington**, DC, v. 92, n. 1, p. 9-13, Jan. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.9>. Acesso em: 6. mai. 2025.

DALY, J, W; MYERS, C, W; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from Neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the Amphibia. **Toxicon**: official journal of the International Society on Toxinology. Inglaterra, v. 25, n. 10, p. 1023-1095, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90265-0). Acesso em: 6. mai. 2025.

DIETL, J.; ENGELS, W.; SOLÉ, M. Diet and feeding behaviour of the leaf-litter frog *Ischnocnema henselii* (Anura: Brachycephalidae) in Araucaria rain forests on the Serra Geral of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of Natural History**, Brasil, v. 43, n. 23-24, p. 1473- 1483, mai. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00222930902898709>. Acesso em: 1. abr. 2025.

DUELLMAN, E, W.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1994.

ELKAN, E. Mucopolysaccharides in the anuran defence against desiccation. **Journal of Zoology**, Londres, v. 155, n. 1, p. 19-53, mai. 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1469-7998.1968.tb03028.x>. Acesso em: 28. set. 2025.

FISHER, C, M.; GARNER, W, J, T.; WALKER, F, S. Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. **Annual review of microbiology**, Estados Unidos da América, v. 63, n.1, p. 291-310, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>. Acesso em: 31. mar. 2025.

FOOT, N, C. The Masson Trichrome Staining Methods Routine Laboratory Use. **Stain Technology**, Nova Iorque, v. 8, n. 3, p. 101-110, jul. 1933. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10520293309116112>. Acesso em: 26. mar. 2025.

GREENBERG, A, D.; PALEN, J, W.; MOOERS, Ø, A. Amphibian species traits, evolutionary history and environment predict *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns, but not extinction risk. **Evolutionary applications**, Inglaterra, v. 10, n. 10, p. 1130- 1145, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/eva.12520>. Acesso em: 1. abr. 2025.

GUO, P.; HILLYARD, S. D.; FU, B. M. A two-barrier compartment model for volume flow across amphibian skin. *American journal of physiology. **Regulatory, integrative and comparative physiology***, Estados Unidos da América, v. 1, n. 6, p. 1384–1394, ago. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00168.2003>. Acesso em: 26. mar. 2025.

HADDAD, F. B. C.; TOLEDO, F. L.; PRADO, P. C.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, L. J.; SAZIMA, I. **Guia dos anfíbios anuros da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia**. São Paulo: Anolisbooks, 2013.

HEDGES, B. S.; DUELLMAN, E. W.; HEINICKE, P. M. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. **Zootaxa**, Nova Zelândia, v. 1737, n. 1, p. 1-182, mar. 2008.

HOULAHAN, E. J.; FINDLAY, S. C.; SCHMIDT, R. B.; MEYER, H. A.; KUZMIN, L. S. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, Inglaterra, v. 404, n. 1, p. 752–755, abr. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/35008052>. Acesso em: 1. abr. 2025.

JUNQUEIRA, C. U. L.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, v. 123, 1983.

KOHNO, S.; FUJIME, M.; KAMISHIMA, Y.; IGUCHI, T. Sexually Dimorphic Basal Water Absorption at the Isolated Pelvic Patch of Japanese Tree Frog, *Hyla japonica*. **Journal of Experimental Zoology**, Estados Unidos da América, v. 301, n. 5, p. 428-438, mai. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jez.a.20067>. Acesso em: 27. set. 2025.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. Batrachochytrium dendrobatidis gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219–227, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061011>. Acesso em: 30. set. 2025.

LUNA, M. C.; MCDIARMID, R. W.; FAIVOVICH, J. From erotic excrescences to pheromone shots: structure and diversity of nuptial pads in anurans. **Biological Journal of Linnean Society**. Inglaterra, v. 124, n. 3, 403-446, mai. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly048>. Acesso em: 29. set. 2025.

MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1979.

MARTINS, R. A., GREENSPAN, S. E., MEDINA, D., BUTTIMER, S., MARSHALL, V. M., W. J., SIOMKO, S., LYRA, M. L., CÉLIO F. B. HADDAD, C. F. H., SÃO-PEDRO, V., BECKER, C. G. (2022). Signatures of functional bacteriome structure in a tropical direct- developing amphibian species. **Animal Microbiome**, v. 40, n. 4, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00188-7>. Acesso em: 29. set. 2025.

MEDINA, A, S, C. **The real secret of the frog's heart: comparative analysis of the cardiorespiratory system of four Brachycephaloidea (Amphibia, Anura), with emphasis in *Brachycephalus rotenbergae***. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2023.1397551>. Acesso em: 27. set. 2025.

MYERS, M, J.; RAMSEY, P, J.; BLACKMAN, L, A.; NICHOLS, E, A.; MINBIOLE, P, C, K.; HARRIS, N, R. Synergistic Inhibition of the Lethal Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The Combined Effect of Symbiotic Bacterial Metabolites and Antimicrobial Peptides of the Frog *Rana muscosa*. **Journal of chemical ecology**, Nova Iorque, v. 38, n. 8, p. 958-965, aug. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0170-2>. Acesso em: 1. abr. 2025.

NUNES-DE-ALMEIDA, C, H, L.; HADDAD, C, F, B.; TOLEDO, L, F. A revised classification of the amphibian reproductive modes. SALAMANDRA - German **Journal of Herpetology**, Alemanha, v. 57, n. 3, p. 413-427, ago. 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/354006635_A_revised_classification_of_the_amphibian_reproductive_modes. Acesso em: 25. mar. 2025.

PESSIER, P, A.; NICHOLS, K, D.; LONGCORE, E, J.; FULLER, S, M. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). **Journal of veterinary diagnostic investigation**: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, Estados Unidos da América, v. 11, n. 2, p. 194-199, mar. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/104063879901100219>. Acesso em: 1. abr. 2025.

ROLLINS-SMITH, A, L.; CAREY, C.; LONGCORE, J.; DOERSAM, K, J.; BOUTTE, A.; BRUZGAL, E, J.; CONLON, M, J. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. **Developmental and comparative immunology**, Estados Unidos da América, v. 26, n. 5, p. 471-479, jun. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00088-x](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00088-x). Acesso em: 26. mar. 2025.

ROLLINS-SMITH, A, L.; RAMSEY, P, J.; REINERT, K, L.; WOODHAMS, C, D.; LIVO, J, L.; CAREY, C. Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Frontiers in bioscience**, Singapura, v. 1, n. 1, p. 68-91, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/s8>. Acesso em: 26 mar. 2025.

ROLLINS-SMITH, A, L. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, v. 1788, n. 8, p. 1593-1599, ago. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.008>. Acesso em: 26. mar. 2025.

SÁNCHEZ-NIVICELA, J. C. Patrones ecológicos funcionales asociados a macroglándulas dermales en ranas de desarrollo directo del género *pristimantis* (anura: strabomantidae) en los páramos de los Andes del norte de Suramérica. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Nacional da Colômbia, Cidade, 2023. Disponível em: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstreams/4facb3bd-8acc-465c-8874-490b97e1ea3d/download>. Acesso em: 27. set. 2025.

SCHEELE, C. B.; PASMANS, F.; SKERRAT, F. L.; BERGER, L.; MARTEL, A.; BEUJEMA, W.; ACEVEDO, A. A.; BURROWES, A. P.; CARVALHO, T.; CATENAZZI, A.; DE LA RIVA, I.; FISHER, C. M.; FLECHAS, V. S.; FOSTER, N. C.; FRÍAS-ÁLVAREZ, P.; GARNER, W. J. T.; GRATWICKE, B.; GUAYASAMIN, M. J.; HIRSCHFELD, M.; KOLBY, E. J.; KOSCH, A. T.; LA MARCA, E.; LINDENMAYER, B. D.; LIPS, R. K.; LONGO, V. A.; MANEYRO, R.; MCDONALD, A. C.; MENDELSON III, J.; PALACIOS-RODRIGUEZ, P.; PARRA-OLEA, G.; RICHARDS-ZAWACKI, L. C.; RODEL, O. M.; ROVITO, M. S.; SOTO-AZAT, C.; TOLEDO, F. L.; VOYLES, J.; WELDON, C.; WHITFIELD, M. S.; WILKINSON, M.; ZAMUDIO, R. K.; CANESSA, S. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, Nova Iorque, v. 363, n. 6434, pg. 1459-1463, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>. Acesso em: 31. mar. 2025.

SEARLE, L. C.; GERVASI, S.; HUA, J.; HAMMOND, I. J.; RELYEA, A. R.; OLSON, H. D.; BLAUSTEIN, A. R. Differential Host Susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an Emerging Amphibian Pathogen. **Conservation biology**: the journal of the Society for Conservation Biology, Estados Unidos da América, v. 25, n. 5, p. 965-974, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01708.x>. Acesso em: 1. abr. 2025.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, Inglaterra, v. 111, n. 1, p. 1-29, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I). Acesso em: 6. mai. 2025.

TOLEDO, C. R.; JARED, C. The calcified dermal layers in anurans. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 3, p. 443-448. jun, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90444-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90444-9). Acesso em: 26. set. 2025.

VARGA, F. A. J.; BUI-MARINOS, P. M.; KATZENBACK, A. B. Frog Skin Innate Immune Defences: Sensing and Surviving Pathogens. **Frontier in immunology**, Suíça, v. 9, n. 3128, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128>. Acesso em: 1. abr. 2025.

WOODHAMS, C. D.; VOYLES, J.; LIPS, R. K.; CAREY, C.; ROLLINS-SMITH, A. L. Predicted Disease Susceptibility in a Panamanian Amphibian Assemblage Based on Skin Peptide Defenses. **Wildlife Disease Association**, Estados Unidos da América, v. 42, n. 2, p. 207-218, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.207>. Acesso em: 1. abr. 2025.

WOODHAMS, C, D.; BRANDT, H.; BAUMGARTNER, S.; KIELGAST, J.; KÜPFER, E.; TOBLER, U.; DAVIS, R, L.; SCHMIDT, R, B.; BEL, C.; HODEL, S.; KNIGHT, R.; MCKENZIE, V. Interacting Symbionts and Immunity in the Amphibian Skin Mucosome Predict Disease Risk and Probiotic Effectiveness. **PloS one**, Estados Unidos da América, v. 9, n. 4, abr. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096375>. Acesso em: 1. abr. 2025.

WOODHAMS, C, D.; VREDENBURG, T, V.; SIMON, A, M.; BILLHEIMER, D.; SHAKHTOUR, B.; SHYR, Y.; BRIGGS, J, C.; ROLLINS-SMITH, A, L.; HARRIS, N, R. Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow- legged frog, *Rana muscosa*. **Biological conservation**, Estados Unidos da América, v. 138, n. 4. p. 390-398. set. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.004>. Acesso em: 1. abr. 2025.

TOLEDO, C, R.; JARED, C. The calcified dermal layers in anurans. **Comparative Biochemistry and Physiology**., v. 104, n. 3, p. 443-448. jun, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90444-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90444-9). Acesso em: 26. set. 2025.

WADA, N.; USHIRODA, S.; SATOH, R.; SAKURAI, M.; KAWADA, S.; LUZIGA, C.; ICHIWAKA, H. Allometric scaling of skin weight and thickness to body weight in relation to taxonomic orders and habitats. **Anatomy, histology, embryology**, Berlin, v. 53, n. 1, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ahe.12967>. Acesso em: 30. set. 2025