

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

Anatomia comparativa da vascularização e
conformação do trato gastrointestinal e morfometria
do ducto colédoco no gênero *Pseudis*
(Anura, Hylidae, Hylinae)

Essa dissertação é parte das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em Biologia Animal.

Patrícia Souza Wanderley

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sebben

Brasília, maio de 2008

*À minha família.
Aos meus pais, Roberto e Flávia,
que mesmo não apresentando o menor
interesse nos anfíbios, sempre me
apoiaram e desejaram o meu sucesso.
À minha irmã Letícia, minha estagiária
honorária, pela ajuda nas dissecações e
conselhos de médica veterinária.
Ao meu namorado Daniel, pela constante
ajuda por todas as fases deste trabalho e
principalmente pelo seu amor que me
sustentou nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Antonio Sebben, Dr. Hélio Silva e Dr. Osmino Rodrigues Pires Jr. pelo apoio, conselhos e acesso a bibliografia.

Aos alunos do LACV especialmente Mestre Leandro Ambrósio, Mestre Pedro Ivo Molina Pellicano e futuro Mestre Thompson Tomatieli pelo apoio.

À turma de Biologia de Anfíbios 2/2005, Mariana Zatz, Lindomar, Elder, Zé Roberto, Marília Lión, Jarbas Ten Caten, Luis André da Silva Couto e Flávio Brandão pelo auxílio em coletas.

À Prof^a. Dra. Rosana e ao técnico de laboratório Cleilson pelo empréstimo de látex e auxílio na técnica.

Ao biólogo Dr. Adrian Antônio Garda pelo auxílio em coleta, fotografia e conselhos.

Aos biólogos Vinícius Pereira e Gabriel Horta pelo auxílio em campo, fotografia, laboratório e revisão do texto.

Ao médico Dr. Roberto Ferreira Wanderley e à psicóloga Dr^a. Flávia Reis e Souza Wanderley pela revisão do texto.

À médica veterinária Dr^a. Letícia Souza Wanderley pelo auxílio em dissecações e revisão do texto.

Ao biólogo Daniel Silva Diniz pelo auxílio em campo, revisão de texto e elaboração do programa Treepy.

Todas as ilustrações e fotos são da autora exceto:

Figuras: 2 (D, F, G - I, M), 5 - 8 e 14 - 16.

ÍNDICE

RESUMO.....	3
Palavras-chave.....	4
ABSTRACT.....	5
Keywords.....	6
INTRODUÇÃO GERAL.....	7
Gênero <i>Pseudis</i>	7
Caracteres alternativos.....	9
Objetivos gerais.....	10
METODOLOGIA GERAL.....	11
Espécies amostradas.....	11
Coleta e empréstimo.....	11
Eutanásia.....	12
Capítulo 1:.....	14
Vascularização do trato gastrointestinal no gênero <i>Pseudis</i>	14
INTRODUÇÃO.....	14
Descrição das árvores vasculares.....	14
Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares ...	15
METODOLOGIA.....	17
Dissecação e injeção de corante.....	17
Descrição das árvores vasculares.....	17
Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares ...	19
RESULTADOS.....	24
Descrição das árvores vasculares.....	24
Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares ...	39
DISCUSSÃO.....	41
Descrição das árvores vasculares.....	41
Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares ...	45
CONCLUSÕES.....	47
Descrição das árvores vasculares.....	47
Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares ...	47
Capítulo 2:.....	48
Conformação gastrointestinal e ducto colédoco no gênero <i>Pseudis</i>	48

INTRODUÇÃO	48
METODOLOGIA	50
Conformação gastrointestinal e morfometria do ducto colédoco	50
RESULTADOS.....	53
Conformação gastrointestinal.....	53
Morfometria do ducto colédoco	57
DISCUSSÃO.....	59
Conformação gastrointestinal.....	59
Morfometria do ducto colédoco	64
CONCLUSÕES	65
Conformação gastrointestinal.....	65
Morfometria do ducto colédoco	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

No primeiro capítulo são descritas as vascularizações arterial e venosa do trato gastrointestinal de quatro espécies do gênero *Pseudis* e outras quatro espécies de hilíneos, com dados das variações inter e intraespecíficas. Os animais foram injetados com nanquim ou látex com corante após eutanásia e sob solução salina. Os tratos gastrointestinais foram então retirados nos espécimes fixados e analisados. As descrições vasculares se mostraram semelhantes nas espécies analisadas, com pouca variação intraespecífica. No entanto, houve muita variação em relação a descrições vasculares para outros táxons encontradas na literatura.

Ainda no mesmo capítulo, foram feitas comparações entre as árvores vasculares do trato gastrointestinal encontradas nesses animais. Nas análises foram usados número de segmentos das árvores, maior ordem Strahler e índice de assimetria. Esses dados foram comparados ainda com medidas de comprimento rostro-cloacal (CRC) e sexo dos animais. Como resultado, foram observadas nas árvores arteriais relações significativas entre número de segmentos, CRC e índice de assimetria. As árvores venosas não apresentaram tais relações, talvez devido à maior variação encontrada no sistema venoso. Mas tanto as árvores arteriais como venosas obedeceram à lei de Horton para número de segmentos e, portanto, são consideradas auto-similares.

No segundo capítulo, foram descritos dois novos modelos de conformação gastrointestinal em nove espécies do gênero *Pseudis* e quatro

outras espécies de hilíneos. Os dois modelos diferem do modelo conhecido para anuros na posição do pâncreas em relação aos intestinos e dos ligamentos mesentéricos. Apenas os espécimes de *Pseudis caraya*, *Pseudis limellum* e *Pseudis laevis* e das espécies de hilíneos não pertencentes ao gênero *Pseudis* apresentaram o modelo clássico já descrito para anuros. Na filogenia, os modelos de conformação gastrointestinal coincidiram com os clados das espécies de rãs paradoxais, mas é necessário um estudo de mapeamento filogenético.

No mesmo capítulo, foram analisadas as relações morfométricas entre o comprimento do ducto colédoco (DC) e o CRC das mesmas espécies. As análises estatísticas de regressão linear apontaram relações significativas entre essas medidas para o grupo das espécies analisadas, mas não explicaram discrepâncias entre o DC de espécimes de tamanho semelhante. Essas relações podem representar uma sinapomorfia do gênero *Pseudis*. Também foi encontrada uma relação significativa entre o DC e o CRC de três espécies com conformações gastrointestinais distintas, onde as espécies com modelos novos apresentaram relações semelhantes.

Palavras-chave

vascularização, trato gastrointestinal, ducto colédoco, *Pseudis*.

ABSTRACT

In the first chapter, the author describes the arterial and venous blood supply of the gastrointestinal tract of four species from genus *Pseudis* and four other species from Hylinae subfamily, including individual and species variations. The specimens were injected with India Ink or dyed latex after euthanasia procedure, and studied under saline solution. The gastrointestinal tracts were then removed from the fixed specimens for analysis. The vascular descriptions were similar to each other, with little individual variation. However, there was a great amount of variation when these descriptions were compared with those available in literature.

In the same chapter, comparisons were made between the vascular trees that supply the gastrointestinal tract of the analyzed specimens. For the analysis the following parameters were used: number of segments in the trees, biggest Strahler order and tree asymmetry index. These data were then compared with measures of snout-vent length (SVL) and animal's sex. As a result, significant relations between number of segments, SVL and tree asymmetry were found in arterial trees. In venous trees there were no such relations, maybe due to a greater variation found in the venous system. Both arterial and venous trees follow the law of Horton for the number of segments and, thus, are considered self-similar.

In the second chapter, two new models of gastrointestinal conformation were described in nine species of the genus *Pseudis* and four other species of the Hyalinae subfamily. These two models differ from the known model for anurans in the position of the pancreas in relation to the intestines and mesenteric ligaments. The classic model was found only in specimens of *Pseudis caraya*, *Pseudis limellum* e *Pseudis laevis*, and in specimens from the Hyalinae subfamily which don't belong to the genus *Pseudis*. In phylogeny, the models for gastrointestinal conformation coincided with the clades of the paradoxal frog species, but a phylogenetic mapping study is necessary.

On the same chapter, the morfometric relations between the length of the common bile duct (CBD) and the SVL of the same specimen were analyzed. The statistical analysis of linear regression have shown significant relationship between these measures for the group of the analyzed species, but did not explain the differences between the CBD length of specimens of similar sizes. These relations can represent a synapomorphy of the genus *Pseudis*. There were also found a significant relationship between the CBD length and the SVL of three species with distinct gastrointestinal conformation, while the species with new models have presented similar relations.

Keywords

blood supply, gastrointestinal tract, common bile duct, *Pseudis*.

INTRODUÇÃO GERAL

Gênero *Pseudis*

O gênero *Pseudis* é composto por anfíbios anuros aquáticos e semi-aquáticos de distribuição restrita à América do Sul e que habitam poças temporárias ou permanentes onde haja grande quantidade de vegetação aquática (Kwet, 2000; Brandão *et al*, 2003). A morfologia externa dessas espécies é adaptada à vida aquática com características como: uma posição mais dorsal dos olhos, a existência de polegares opositores (usados para agarrar na vegetação aquática (Brandão *et al*, 2003)), membros posteriores robustos e grandes membranas interdigitais que facilitam a propulsão do animal na água (Duellman & Trueb, 1994). Ainda como característica singular do gênero, estes animais possuem girinos que atingem tamanhos maiores que o dos adultos das próprias espécies, tendo algumas dessas espécies os maiores girinos conhecidos no mundo (Garman, 1877; Emerson, 1988). A relação incomum entre o maior tamanho do girino e o tamanho dos adultos rende ao grupo o nome vulgar de “rãs paradoxais”.

O gênero *Pseudis* é parte da subfamília Hyliinae da família Hylidae, família que agrupa a grande maioria dos anfíbios anuros conhecidos vulgarmente como pererecas (Faivovich *et al*, 2005). São onze as espécies do gênero: *Pseudis bolbodactyla* Lutz 1925, *Pseudis boliviana* Gallardo 1961, *Pseudis caraya* Gallardo 1964, *Pseudis cardosoi* Kwet 2000, *Pseudis fusca* Garman 1883, *Pseudis laevis* Parker 1935, *Pseudis limellum* Cope 1862, *Pseudis minuta* Günther

1858, *Pseudis paradoxa* Linnaeus 1758, *Pseudis platensis* Gallardo 1961 e *Pseudis tocantins* Caramaschi & Cruz 1998 (Frost, 2007). Segundo recentes filogenias, as espécies de rãs paradoxais se dividem em três clados, como pode ser observado na Figura 1 (Aguiar Jr. *et al*, 2007; Garda & Cannatella, 2007).

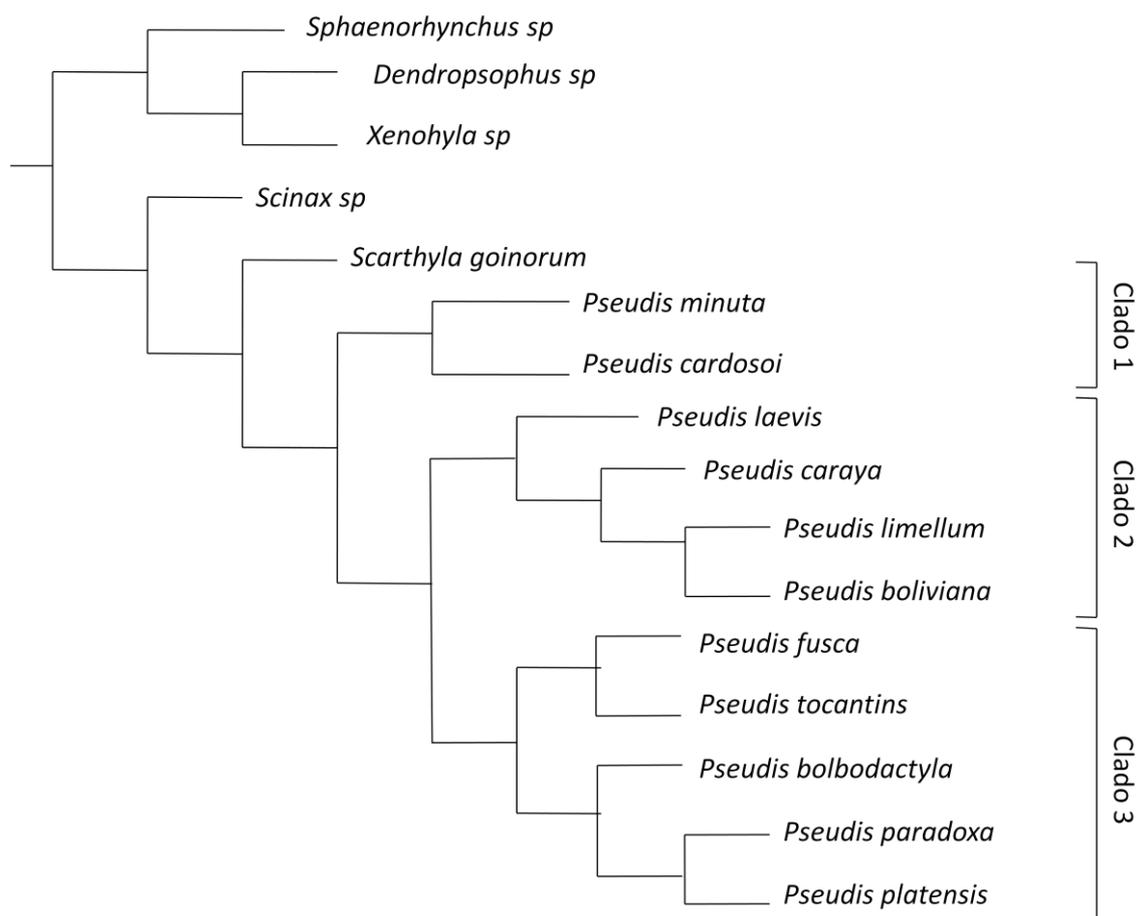


Figura 1. Árvore filogenética da tribo Dendropsophini com destaque para as espécies do gênero *Pseudis* e seus três clados (adaptado de Faivovich *et al*, 2005 e Aguiar Jr. *et al*, 2007).

Caracteres alternativos

Atualmente, existe uma forte tendência a se realizar estudos filogenéticos incluindo dados moleculares ou tão somente com eles, pois essas novas técnicas tendem a oferecer um número maior de caracteres do que as técnicas tradicionais (Faivovich *et al*, 2005). No entanto, não são todos os trabalhos que estabelecem relações conclusivas entre os táxons analisados. O que nos leva a crer que a descrição de caracteres alternativos e a sua utilização em trabalhos de filogenia podem auxiliar na construção de hipóteses ou resolução de hipóteses de relação de parentesco mal resolvidas.

Em relação aos caracteres alternativos de morfologia em anfíbios, já foram feitos trabalhos com a ultra-estrutura de espermatozóides (Garda *et al*, 2004), caracteres larvais de pigmentação e topologia da veia caudal em girinos (Haas, 2003), neuroanatomia e morfologia espermática (Wake, 1993), entre outros. Faivovich *et al* (2005) usaram uma combinação de caracteres para determinar relações filogenéticas dentro do gênero *Scinax* que incluía pigmentação testicular, pigmentação externa de girinos e eixo de dobramento do intestino larval. No entanto, caracteres alternativos, principalmente de anatomia visceral, ainda são raramente usados em estudos filogenéticos.

Como todos os anfíbios, o grupo das rãs paradoxais carece de estudos em morfologia interna de adultos e larvas. Devido à morfologia externa conservada do grupo, acreditamos que o aumento do conhecimento sobre caracteres alternativos possibilitará, além de uma melhor percepção das relações filogenéticas, uma maior compreensão das questões fisiológicas, ecológicas e

ontogenéticas inerentes à incomum estratégia de desenvolvimento do gênero *Pseudis*.

Objetivos gerais

1. Descrever a vascularização do trato gastrointestinal de quatro espécies do gênero *Pseudis* (*Pseudis tocantins*, *Pseudis fusca*, *Pseudis bolbodactyla* e *Pseudis caraya*) e quatro espécies da subfamília Hylinae (*Scinax fuscovarius*, *Dendropsophus minutus*, *Trachycephalus venulosus* e *Hypsiboas albopunctatus*), além das suas variações inter e intraespecíficas.
2. Apresentar uma descrição topológica e uma comparação quantitativa das árvores vasculares arteriais e venosas do trato gastrointestinal das mesmas espécies citadas no item 1, exceto *Pseudis fusca*.
3. Descrever e comparar as conformações gastrointestinais encontradas em nove espécies do gênero *Pseudis* (*P. tocantins*, *P. fusca*, *P. bolbodactyla*, *P. platensis*, *P. caraya*, *P. limellum*, *P. laevis*, *P. cardosoi* e *P. minuta*) e quatro espécies da subfamília Hylinae (*Scinax fuscovarius*, *Dendropsophus minutus*, *Trachycephalus venulosus* e *Hypsiboas albopunctatus*).
4. Apresentar uma morfometria comparada do ducto colédoco das espécies citadas no item 3.

METODOLOGIA GERAL

Espécies amostradas

No gênero *Pseudis* foram amostradas todas as espécies, exceto *Pseudis boliviana* e *Pseudis paradoxa*. A princípio, todas as espécies do gênero tinham sido coletadas até uma recente mudança taxonômica (Aguiar Jr *et al*, 2007). Seguindo a mais recente filogenia de Hylidae (Faivovich *et al*, 2005), foram amostradas espécies de três tribos da subfamília Hylinae que ocorrem no Distrito Federal. Da tribo Cophomantini foram coletados exemplares de *Hypsiboas albopunctatus* e da tribo Lophiohylini um exemplar de *Trachycephalus venulosus*. Já na tribo Dendropsophini (Figura 1) que agrupa os gêneros *Pseudis*, *Dendropsophus*, *Scinax*, *Xenohyla*, *Sphaenorhynchus* e a espécie *Scarthyla goinorum*, só não foram amostrados os três últimos.

Coleta e empréstimo

Sob as licenças de coleta de material biológico de números 045/07 - IBAMA/RAN e 092/07 - ICMBio/RAN, foram coletados dez indivíduos adultos de *Pseudis bolbodactyla* no município de Flores de Goiás-GO e cinco em Buritizeiros-MG, dezenove indivíduos de *Pseudis tocantins* em Britânia-GO, três em Aruanã-GO, um em Formoso do Araguaia-TO e um em Sandolândia-TO. Vinte e sete espécimes de *Pseudis caraya* foram coletados no município de Aruanã-GO e dois em Britânia-GO. Em Araçuaí-MG foram coletados quatro espécimes de *Pseudis fusca*. Já em Brasília-DF, foram coletados seis indivíduos

de *Dendropsophus minutus*, seis de *Hypsiboas albopunctatus* e três de *Scinax fuscovarius*.

Após a eutanásia e o procedimento de dissecação, todos esses espécimes foram fixados em formalina 4%, tombados e depositados na Coleção do Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados (LACV-UnB). Para complementar a amostra, foram utilizados dois exemplares adultos de cada uma das seguintes espécies: *Pseudis platensis* e *Pseudis laevis* (LACV-UnB), *Pseudis cardosoi*, *Pseudis minuta* e *Pseudis limellum* (Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília - CHUnB). Foi utilizado, ainda, um espécime de *Trachycephalus venulosus* procedente de Monte Alegre-GO (Anexo e Figura 2).

Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por sobredose dos anestésicos Cloridrato de Bupivacaína (Neocaína® 0,5%) ou Cloridrato de Lidocaína (Xylestesin® 2%), ambos sem vasoconstritor, em volumes de 0,1 a 0,5 ml por via intracraniana. Em animais muito pequenos, ao invés da anestesia por via intracraniana, foi aplicada lidocaína em gel 2% no abdômen. Para garantir o coma irreversível e a ausência de sofrimento para o animal, foi efetuada também dupla secção da medula espinhal, conforme recomendado na Resolução nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e pela Associação Americana de Médicos Veterinários (AVMA Panel on Euthanasia, 2001; CFMV, 2002). O procedimento descrito acima foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (UNBDOC nº 9835/2007).

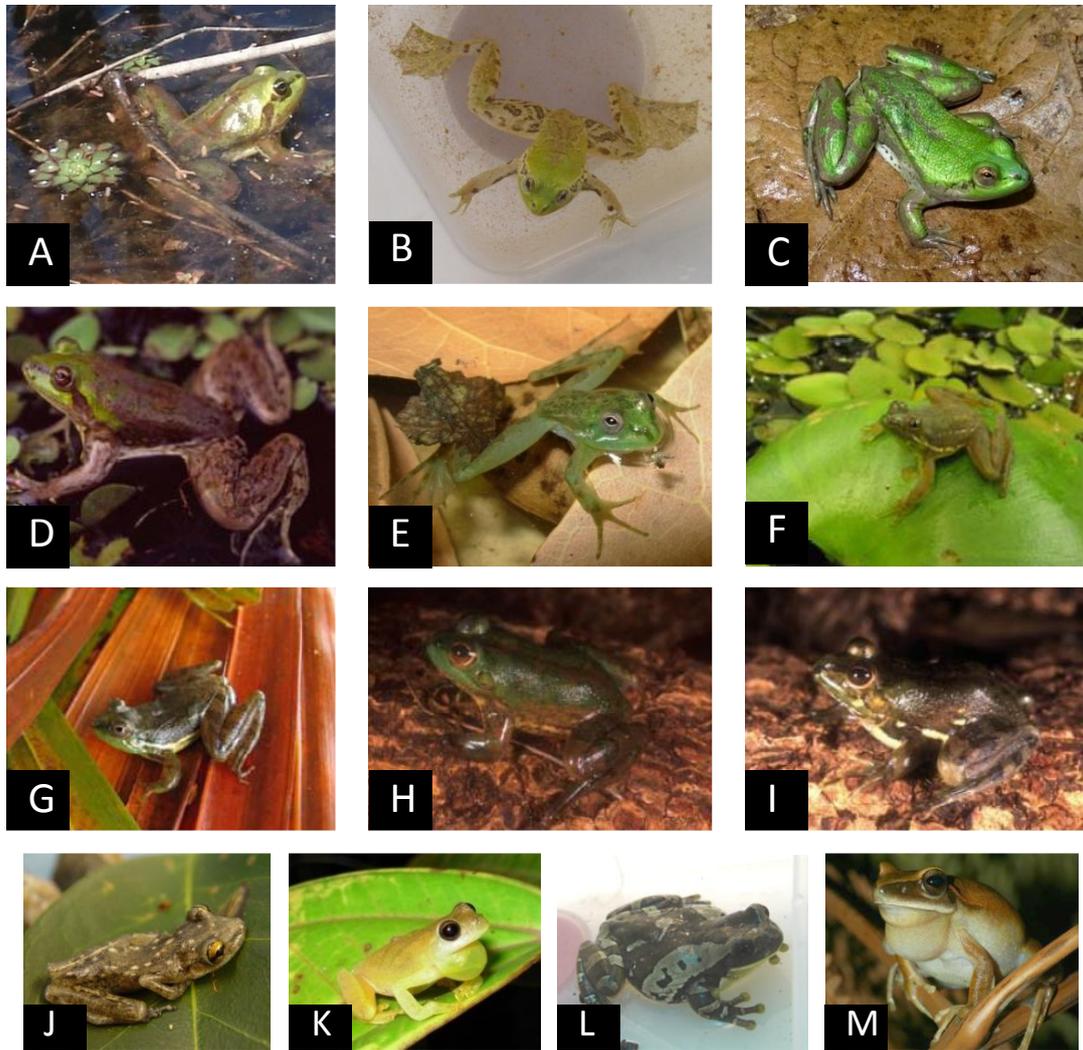


Figura 2. Fotos das espécies do gênero *Pseudis* e de outros hilíneos analisados nesse trabalho. Legenda: A - *Pseudis tocantins*, B - *Pseudis fusca*, C - *Pseudis bolbodactyla*, D - *Pseudis platensis*, E - *Pseudis caraya*, F - *Pseudis limellum*, G - *Pseudis laevis*, H - *Pseudis cardosoi*, I - *Pseudis minuta*, J - *Scinax fuscovarius*, K - *Dendropsophus minutus*, L - *Trachycephalus venulosus*, M - *Hypsiboas albopunctatus*. Fotos: D, F e G a I de Adrian Antônio Garda e M de Gabriel Horta.

Capítulo 1:

Vascularização do trato gastrointestinal no gênero *Pseudis*

INTRODUÇÃO

Descrição das árvores vasculares

As descrições do sistema circulatório, assim como todos os trabalhos em anatomia visceral dos anuros, são antigas e abordam poucas espécies. O livro “The Anatomy of The Frog” escrito por Alexander Ecker, médico alemão, e traduzido para o inglês em 1889, é a grande referência em anatomia de anfíbios e a obra mais citada. Nele é descrita toda a anatomia de *Rana esculenta* e *Rana temporaria*, duas rãs européias usadas na época em experimentos fisiológicos. Até hoje, algumas das descrições contidas neste livro são generalizadas para todas as espécies de anfíbios.

Posteriormente a essa publicação, morfologias vasculares gerais foram apresentadas para *Xenopus laevis* (Millard, 1941) e *Leiopelma hochstetteri* (Stephenson & Elsie, 1947). Além de usar espécies de anfíbios que não ocorrem no Brasil, esses estudos possuem outras semelhanças: da vascularização do canal alimentar são descritos apenas os maiores vasos e nenhuma variação intraespecífica é apresentada. A vascularização do trato gastrointestinal de *Bufo*

bufo foi descrita por Pác, Krahulec & Merta (1973) e nela foram feitos alguns comentários quanto à variação, mas pouco detalhados.

Naomi Millard (1942), pouco depois de descrever a vascularização de *Xenopus laevis*, relatou anomalias e variações dos vasos dessa espécie, mas apenas como estudos de caso, sem apresentar porcentagem de ocorrência para as características descritas. Ichimura *et al* (2001) descreveram a distribuição e ramificação da artéria mesentérica cranial de *Lithobates catesbeianus*, com detalhes e ênfase na variação individual. No entanto, novamente, nenhuma comparação quantitativa foi feita nesse trabalho, apesar de todas as árvores dos dez espécimes analisados serem apresentadas.

No presente capítulo, descrevemos a vascularização do trato gastrointestinal de quatro espécies do gênero *Pseudis* e de quatro espécies próximas da subfamília Hyalinae, detalhando os menores vasos e relatando suas variações inter e intraespecíficas. Porcentagens das ocorrências de características vasculares também são informadas.

Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares

Estruturas arbóreas ou bifurcadas são freqüentemente encontradas na Natureza, desde o formato de rios até a distribuição de capilares em tecidos animais. Estudos dessas estruturas envolvem a descrição topológica; comparações morfométricas; comparações entre árvores reais e modelos digitais; estudos de variabilidade, de desenvolvimento e das implicações da forma na função. Trabalhos como estes já foram feitos em diversas áreas como

hidrologia e botânica (Pelletier & Turcotte, 2000), astogenia (Sánchez *et al*, 2003), neurologia (Van Pelt & Schierwagen, 2004) e angiologia (Marxen & Henkelman, 2003; Stéphanou *et al*, 2005).

As descrições topológicas são a base de todos os estudos com árvores vasculares. Comparações puramente topológicas podem determinar, por exemplo, que as árvores com um grande número de bifurcações podem possuir um sistema melhor de controle de fluxo de sangue ou que a heterogeneidade de fluxo regional pode não ser explicada pela variação topológica dos vasos no tecido, mas pelas necessidades metabólicas das células desse último (Karch *et al*, 2003).

Dos existentes para a análise topológica de árvores, o método de Horton-Strahler de ordenamento de segmentos (região entre dois pontos de bifurcação sucessivos) é o mais usado para estudos vasculares (Yen *et al*, 1983; Koller *et al*, 1987). Originalmente criado para o estudo de afluentes de rios, o método é usado em adição a dados morfométricos na descrição de árvores vasculares usadas em análises fisiológicas.

Ainda nessa linha, um método preciso para comparação fina de árvores é o índice de assimetria, que há muitos anos é usado para analisar ramificações dendríticas de neurônios (Van Pelt & Uylings, 1999; Van Pelt & Schierwagen, 2004). Mas apesar de demonstrar resultados consistentes, aparentemente nunca foi usado para comparar estruturas vasculares.

Neste trabalho, apresentaremos uma descrição topológica e uma comparação quantitativa das árvores vasculares do trato gastrointestinal,

incluindo ordenamento de segmentos, cálculo de índice de assimetria e comparação entre espécies do gênero *Pseudis* e outras espécies de hilíneos.

METODOLOGIA

Dissecação e injeção de corante

Logo após a eutanásia, os animais foram mantidos em solução salina isotônica para anfíbios (NaCl 0,65%) para dissecação sob lupa estereomicroscópica (Olympus SZ40 40x e Tecnival SQF-F 80x), segundo o método de microdissecação *a fresco* (Sebben, 2007). Foi injetada em todo o sistema circulatório a tinta nanquim ou o látex líquido (Altamira LTDA) adicionado à corante vermelho (Corante Xadrez - SHERWIN WILLIANS BRASIL). A injeção que preencheu todo o sistema circulatório se deu pela veia abdominal em animais grandes (30,05mm a 71,75mm) e através do ventrículo em animais pequenos (11,90mm a 24,68mm). Os tratos gastrointestinais foram retirados do espécime para melhor visualização das estruturas.

Descrição das árvores vasculares

Os tratos gastrointestinais dos espécimes injetados e fixados (Tabela 1) foram retirados e observados submersos em água destilada sob lupa, para aliviar o peso dos órgãos uns sobre os outros e facilitar a visualização dos vasos. Na análise foram feitos desenhos esquemáticos das árvores vasculares do trato gastrointestinais, arterial e venosa, e registros fotográficos digitais através das

objetivas da lupa estereomicroscópica, utilizando uma máquina fotográfica digital modelo Nikon Coolpix L1. Os dados vasculares foram compilados em tabelas para posterior análise das variações intra e interespecíficas e das relações entre os vasos.

Ao longo do trabalho foi constatado que a tinta nanquim não preenche muito bem vasos mais calibrosos e, como não coagula, extravasa se algum vaso for rompido no animal fixado. Logo, optou-se apenas pelo uso do látex e o uso da solução salina se tornou então mais importante, pois fez com que o látex emergisse e impediu que esse encobrisse os órgãos abdominais e coagulasse sobre eles.

Tabela 1. Relação do número de indivíduos por espécies que foi usado em cada etapa do trabalho. Legenda: A - Descrição das árvores vasculares, B - Comparação quantitativa das árvores vasculares, C - Descrição da conformação gastrointestinal, D - Morfometria do ducto colédoco.

ESPÉCIE	TOTAL	A	B	C	D
<i>Pseudis tocantins</i>	21	8	3	6	21
<i>Pseudis fusca</i>	4	4	0	3	4
<i>Pseudis bolbodactyla</i>	15	8	3	8	13
<i>Pseudis platensis</i>	2	0	0	2	2
<i>Pseudis caraya</i>	29	10	4	26	29
<i>Pseudis limellum</i>	2	0	0	2	2
<i>Pseudis laevis</i>	2	0	0	2	2
<i>Pseudis cardosoi</i>	2	0	0	2	2
<i>Pseudis minuta</i>	2	0	0	2	2
<i>Scinax fuscovarius</i>	3	3	3	3	2
<i>Dendropsophus minutus</i>	6	4	3	6	5
<i>Trachycephalus venulosus</i>	1	1	1	1	1
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	6	3	3	6	3

Injeções incompletas foram freqüentes, em parte devido a variações do efeito anestésico nos espécimes. Animais de tamanho e peso semelhantes, injetados com a mesma quantidade de anestésico, tiveram respostas cardíacas diferentes: alguns apresentando batimento cardíaco baixo demais na dissecação, ou mesmo nenhum, o que dificultou o fluxo do látex. Além disso, em animais pequenos, a injeção deu-se com certa dificuldade, já que alguns ventrículos mediam aproximadamente 1,7mm.

Desta forma, para oito indivíduos de *P. tocantins* injetados, apenas três apresentaram árvores completas o suficiente para os estudos comparativos. A relação de espécimes injetados e adequados para comparação em outras espécies se deu da seguinte forma: *P. fusca* (três injetados, nenhum adequado), *P. bolbodactyla* (oito injetados, três adequados), *P. caraya* (vinte e quatro injetados, quatro adequados), *S. fuscovarius* (três injetados, três adequados), *D. minutus* (cinco injetados, três adequados), *T. venulosus* (um injetado, um adequado), *H. albopunctatus* (três injetados, três adequados).

Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares

Para a análise quantitativa, foram mapeadas as árvores formadas pela distribuição da artéria mesentérica cranial (AMCr) e da veia mesentérica direita (VMD), os vasos analisados que apresentaram maior rede, e foram desconsiderados os vasos conectados ao baço. Assumiu-se que todas as árvores vasculares, quando analisadas em detalhe, são binárias (possuem apenas bifurcações).

Os desenhos feitos durante a dissecação foram transformados em esquemas de árvores binárias no programa Tulip (Auber, 2003), um software livre criado para facilitar a visualização e análise de árvores e redes. No mesmo programa foi também calculado o número de segmentos de cada árvore e a ordem de cada segmento segundo o método de ordenamento de Strahler.

O método de Strahler funciona da seguinte maneira: todo segmento terminal recebe ordem 1; a junção de dois segmentos de ordem n dá origem a um segmento de ordem $n+1$; e a junção de um segmento n e outro de ordem $n-1$ ou menos dá origem a um segmento de ordem n (Yekutieli & Mandelbrot, 1994; Nash, 2005). Os segmentos de ordem 1 foram determinados como sendo os segmentos que tocam o órgão, e as bifurcações seguintes foram ignoradas. Além disso, atribuiu-se uma notação para regiões de anastomose de vasos: esta conexão entre vasos foi cortada logo após o primeiro segmento de ordem Strahler 1, ficando assim apenas dois segmentos terminais (Figura 3).

As árvores vasculares foram então ordenadas segundo o método de Horton (Rothnie *et al*, 2006), o que é feito após a ordenação dos segmentos segundo Strahler. Neste método, substitui-se as ordens da maior seqüência de segmentos pela maior ordem existente nessa seqüência (Figura 4). Esta regra é então aplicada a todas as outras seqüências.

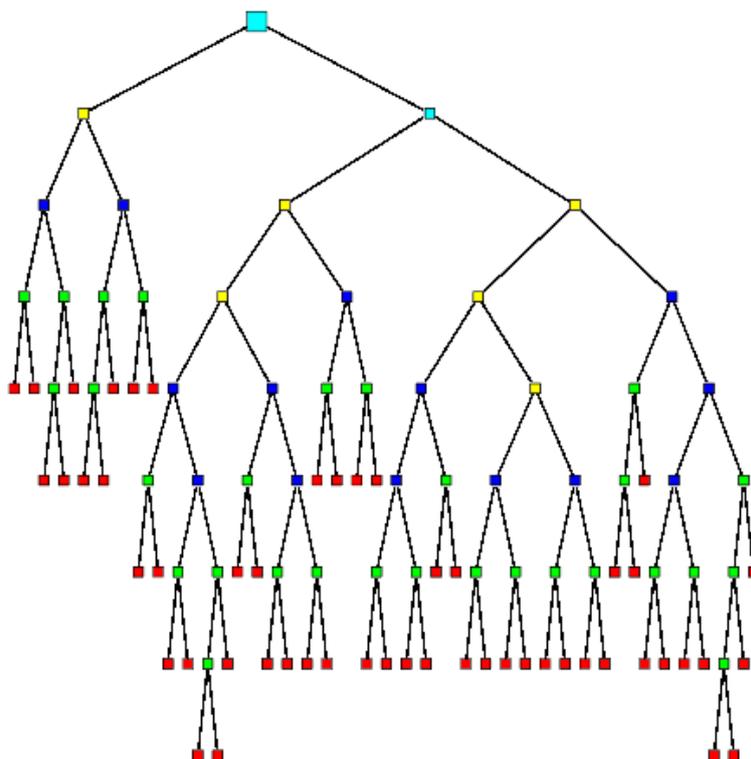


Figura 3. Árvore esquemática da artéria mesentérica cranial de um indivíduo de *Hypsiboas albopunctatus* gerada no programa Tulip. Os quadrados representam os nós da árvore binária (região de bifurcação, com exceção dos quadrados vermelhos). As cores dos quadrados representam a ordem Strahler do segmento logo acima do nó, sendo a legenda: vermelho - ordem 1, verde - ordem 2, azul escuro - ordem 3, amarelo - ordem 4, azul claro - ordem 5.

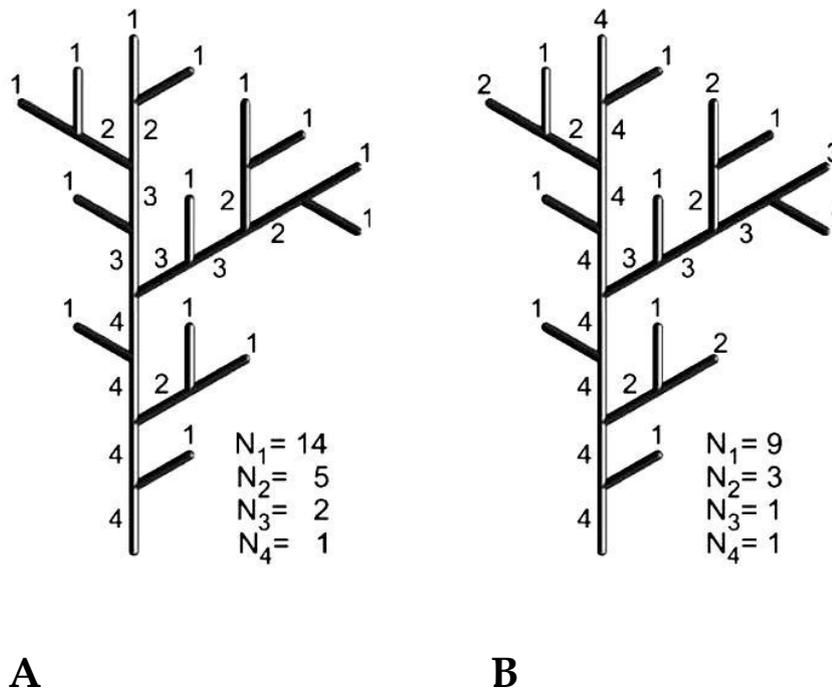


Figura 4. Esquema de ordenação de árvores binárias: A - método de Strahler, B - método de Horton. Os números representam as ordens de cada segmento e N_i é o número de segmentos de ordem i . Figura adaptada de Rothnie *et al* (2006).

Para comparação, ainda foi testado se os dados se adequavam à lei Horton para número de segmentos (Pidwirny, 2006; Rothnie *et al*, 2006). Essa lei diz que: se a razão (R_s) entre o número de segmentos de ordem i (N_i) e a própria ordem i for constante para todas as ordens, então a árvore é auto-similar ou fractal. Uma estrutura é dita auto-similar quando pode ser dividida em partes e cada uma das partes é semelhante à estrutura original. O teste da lei de Horton foi aplicado tanto para a ordenação de Horton, como para a de Strahler, e R_s foi obtido pela inclinação da reta da regressão linear entre \log de N_i e i (Koller *et al*, 1987; Lapia, Marchiafava & Colantuoni, 2008).

Em complementação, foi utilizado um índice de assimetria criado para analisar árvores formadas pelas ramificações dendríticas de neurônios (Van Pelt & Uylings, 1999; Van Pelt & Schierwagen, 2004). Este índice de assimetria (A_t) de uma dada árvore α^n com n segmentos terminais e $n-1$ pontos de bifurcação, é calculado pelo somatório das assimetrias das partições dessa árvore (A_p), onde r e s são os números de segmentos terminais (direitos e esquerdos) de cada partição. $A_p(1,1) = 0$ por definição.

$$A_p(r, s) = \frac{|r - s|}{r + s - 2}$$

Desta forma, o índice de assimetria (A_t) de uma dada árvore α^n é calculado pela seguinte equação, onde j é o número de cada bifurcação em uma seqüência. $A_t = 0$ para toda árvore completamente simétrica e tende a 1 conforme aumenta o grau de assimetria.

$$A_t(\alpha^n) = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^{n-1} A_p(r_j, s_j)$$

Para aplicar a ordenação de Horton, testar a lei de número de segmentos desse e calcular os índices de assimetria foi usado um segundo programa chamado Treepy (Diniz & Wanderley, 2008). Este programa foi criado na linguagem Phyton especialmente para este estudo. Para as análises estatísticas foram usados a planilha eletrônica Excel (Microsoft®) e o programa estatístico

GraphPad Prism 5. O primeiro para cálculo de média, mediana, desvio padrão e transformação logarítmica e o segundo para cálculo da regressão linear. O comprimento rostro-cloacal (medido com paquímetro de precisão 0,01mm) e o sexo dos espécimes também foram investigados para a análise de relação com a complexidade das árvores vasculares. Para as análises, os dados de número de segmentos, índice de assimetria e comprimento rostro-cloacal foram log transformados (base 10).

RESULTADOS

Descrição das árvores vasculares

Para a descrição vascular os animais foram divididos em três grupos: Grupo A - *Pseudis bolbodactyla*, *Pseudis tocantins* e *Pseudis fusca*; Grupo B - *Pseudis caraya*; Grupo C - *Dendropsophus minutus*, *Scinax fuscovarius*, *Hypsiboas albopunctatus* e *Trachycephalus venulosus*. As Figuras 5 e 6 apresentam esquemas ilustrativos das vascularização do trato gastrointestinal arterial e venosa, respectivamente. As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os dados vasculares coletados para cada indivíduo analisado. A descrição a seguir apresenta as relações entre os vasos, a área que esses irrigam ou drenam e as suas variações intra e interespecíficas.

GRUPO A

Vascularização arterial do trato gastrointestinal

1. Artéria celíaco-mesentérica (ACM)

Irriga estômago, baço, pâncreas, fígado, intestino delgado e grosso. Em todos os casos se origina na junção dos arcos aórticos e se bifurca em artéria celíaca e artéria do trato gastrointestinal cranial.

a. Artéria celíaca (AC)

Irriga estômago, pâncreas (pelas artérias gástricas) e fígado. Em 15,0% dos casos emitiu um ramo extra para o pâncreas, sendo dois casos em *P. bolbodactyla* e um em *P. tocantins*.

i. Artéria gástrica dorsal (AGD)

Irriga a face dorsal do estômago. Em 100,0% dos espécimes lançou ramos para o dorso do pâncreas.

ii. Artéria gástrica ventral(AGV)

Irriga a face ventral do estômago. Em 20,0% dos casos emitiu um ramo para o pâncreas antes dar origem à artéria hepática (dois *P. bolbodactyla*, um *P. tocantins* e um *P. fusca*) e em 30,0% dos casos emitiu ramos para o pâncreas após esta bifurcação (um *P. bolbodactyla*, quatro *P. tocantins* e dois *P. fusca*).

1. Artéria hepática (AH)

Irriga o fígado.

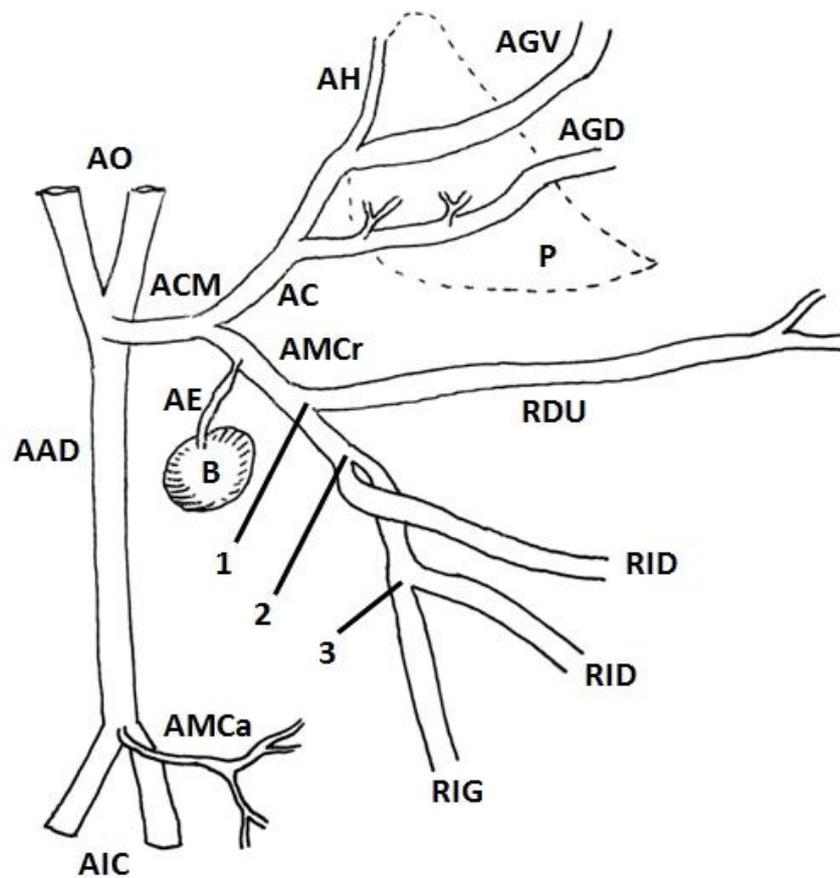


Figura 5. Esquema apenas ilustrativo da vascularização arterial do trato gastrointestinal (não corresponde a um espécime). Legenda: AO - arcos aórticos, AAD - artéria aorta dorsal, AC - artéria celíaca, ACM - artéria celíaco-do trato gastrointestinal, AE - artéria esplênica, AGD - artéria gástrica dorsal, AGV - artéria gástrica ventral, AH - artéria hepática, AIC - artérias ilíacas comuns, AMCa - artéria do trato gastrointestinal caudal, AMCr - artéria do trato gastrointestinal cranial, B - baço, P - pâncreas, RDU - ramo duodenal da AMCr, RID - ramos da AMCr para o intestino delgado (exceto duodeno), RIG - ramo da AMCr para o intestino grosso. Bifurcações da AMCr: 1, 2 e 3.

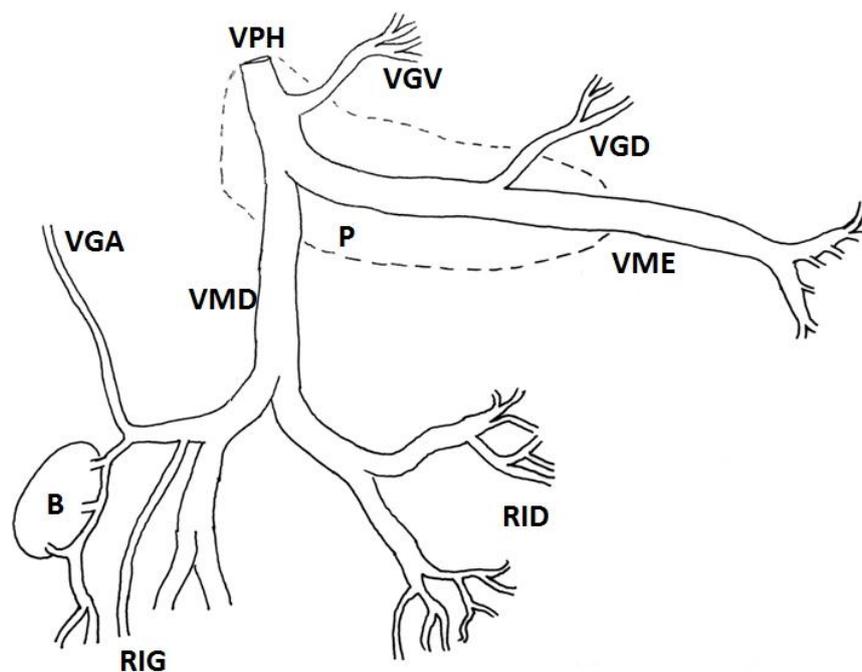


Figura 6. Esquema apenas ilustrativo da vascularização venosa do trato gastrointestinal (não corresponde a um espécime). Legenda: B - baço, RID - ramos da VMD para o intestino delgado, RIG - ramos da VMD para o intestino grosso, VGCr - veia gástrica cranial, VGD - veia gástrica dorsal, VGV - veia gástrica ventral, VMD - veia do trato gastrointestinal direita, VME - veia do trato gastrointestinal esquerda, VPH - veia porta-hepática, P - pâncreas.

b. Artéria do trato gastrointestinal cranial (AMCr)

Irriga baço, intestino delgado e intestino grosso.

i. Artéria esplênica (AE)

Irriga o baço. Em todos os *P. bolbodactyla* e *P. fusca*, a AE foi a primeira bifurcação da AMCr. Em um indivíduo de *P. tocantins* a AE se originou do ramo duodenal da AMCr e em outro se originou da AC.

A seguir descrição dos ramos originados pelas bifurcações da AMCr (ignorando-se a AE).

i. Primeira bifurcação: ramo duodenal

Todos as três espécies apresentaram o ramo duodenal como primeiro ramo da AMCr.

ii. Segunda e terceira bifurcações

Em *P. bolbodactyla* (87,5%) e *P. fusca*, a segunda bifurcação da AMCr deu origem a um ramo que se dirige à porção ileal e jejunal do intestino delgado e a terceira bifurcação deu origem a um ramo para as mesmas regiões do intestino delgado e outro para o intestino grosso (ver Figura 3). Já em *P. tocantins*, a segunda bifurcação da AMCr acontece da mesma forma que nas outras duas espécies, mas não existe uma terceira bifurcação que emita grandes ramos.

2. Artéria mesentérica caudal (AMCa)

Irriga a porção final do intestino grosso e reto. É uma artéria muito pequena e de difícil visualização principalmente se a injeção de látex não tiver sido perfeita ou se o espécime for uma fêmea em estado reprodutivo. Neste grupo, a AMCa não foi encontrada em 35,0% dos animais analisados (três *P. bolbodactyla*, um *P. tocantins* e três *P. fusca*). É possível que nesses casos a AMCa tenha origem em porções mais caudais das artérias ilíacas comuns direita e esquerda ou em outras áreas, pois esta parece ser muito variável quando à sua origem. Nos 13 espécimes em que foi visualizada, a AMCa teve origem na região da bifurcação da artéria aorta dorsal em artérias ilíacas comuns direita e esquerda (46,2%); em uma porção mais anterior da artéria aorta dorsal (30,8%); ou na artéria ilíaca comum direita (23,1%). Em 55,0% dos espécimes a AMCa emitiu ramos para o rim esquerdo e em 45,0% para o rim direito.

Vascularização venosa do trato gastrointestinal

1. Veia porta-hepática (VPH)

Drena estômago, baço, pâncreas, intestino delgado e grosso. São quatro as principais tributárias da VPH que se conectam em diferentes configurações:

a. Veia mesentérica esquerda (VME)

Drena a região duodenal.

b. Veia mesentérica direita (VMD)

Drena baço, as regiões ileal e jejunal do intestino delgado e o intestino grosso. Em 35,0% dos animais foi encontrada uma tributária de VMD que drenava o sangue da parte anterior do estômago, a veia gástrica cranial (três *P. bolbodactyla* e três *P. tocantins*). Trata-se de um vaso fino na maioria das vezes, que pode não ter sido preenchido por látex ou nanquim ou ter sido rompido em outros espécimes.

c. Veia gástrica ventral (VGV)

Drena a face ventral do estômago. A VGV foi encontrada como tributária direta de VPH (80,0%) ou tributária de VME (15,0% dos casos, sendo todos em *P. tocantins*).

d. Veia gástrica dorsal (VGD)

Drena a face dorsal do estômago. Foi tributária de VME em 40,0% das vezes (três *P. bolbodactyla*, três *P. tocantins*, dois *P. fusca*), de VMD em 30,0% (um *P. bolbodactyla*, três *P. tocantins*, dois *P. fusca*) e em um indivíduo de *P. tocantins* foi tributária direta da VPH. Como a conexão de VGD com as outras veias acontece dentro do tecido pancreático, em 25,0% dos casos essa conexão não pode ser visualizada (três *P. bolbodactyla* e um *P. tocantins*).

GRUPO B

Vascularização arterial do trato gastrointestinal

1. Artéria celíaco-mesentérica (ACM)

Irriga estômago, baço, pâncreas, fígado, intestino delgado e grosso. Em todos os casos se origina na junção dos arcos aórticos e se bifurca em artéria celíaca e artéria mesentérica cranial.

a. Artéria celíaca (AC)

Irriga estômago, pâncreas e fígado. Em nenhum espécime esta artéria emitiu ramos para o pâncreas.

i. Artéria gástrica dorsal (AGD)

Irriga a face dorsal do estômago. Em todos os casos lançou ramos para o dorso do pâncreas.

ii. Artéria gástrica ventral (AGV)

Irriga a face ventral do estômago. Em 20,0% das vezes emite um ramo para o pâncreas antes de dar origem à artéria hepática, e em 30,0% emite ramos para o pâncreas após está bifurcação.

1. Artéria hepática (AH)

Irriga o fígado através do pâncreas.

b. Artéria mesentérica cranial (AMCr)

Irriga baço, intestino delgado e intestino grosso.

i. Artéria esplênica (AE)

Irriga o baço. Originou-se na primeira bifurcação da AMCr (70,0%), do ramo duodenal da AMCr (20,0%) ou da AC (10,0%).

A seguir descrição dos ramos originados pelas bifurcações da AMCr (ignorando-se a AE).

i. Primeira bifurcação: ramo duodenal

Todos os espécimes apresentaram o ramo duodenal como primeiro ramo da AMCr.

ii. Segunda e terceira bifurcações

Em todos os espécimes a segunda bifurcação da AMCr deu origem a um ramo que se dirige ao intestino delgado, e a terceira bifurcação deu origem a um ramo para o intestino delgado e outro para o intestino grosso.

2. Artéria mesentérica caudal (AMCa)

Irriga a porção final do intestino grosso e reto. A AMCa teve origem na região de bifurcação da artéria aorta dorsal nas artérias ilíacas comuns direita e esquerda (30,0%), em uma porção mais anterior da artéria aorta dorsal (40,0%), na artéria ilíaca comum direita (20,0%) ou na artéria ilíaca comum esquerda (10,0%). Em 40,0% dos espécimes a AMCa emitiu ramos para o rim esquerdo e também em 40,0% deles para o rim direito.

Vascularização venosa do trato gastrointestinal

1. Veia porta-hepática (VPH)

Drena estômago, baço, pâncreas, intestino delgado e grosso. São quatro as principais tributárias da VPH que se conectam em diferentes configurações:

a. Veia mesentérica esquerda (VME)

Drena a região duodenal.

b. Veia mesentérica direita (VMD)

Drena baço, intestino delgado e grosso.

c. Veia gástrica ventral (VGV)

Drena a face ventral do estômago. A VGV foi encontrada como tributária direta da VPH (70,0%) ou tributária da VME (30,0%).

d. Veia gástrica dorsal (VGD)

Drena a face dorsal do estômago. Foi tributária da VME em 60,0% das vezes, da VMD em 30,0% das vezes e em um indivíduo foi tributária direta da VPH. Não foi encontrada a veia gástrica cranial (VGCr) em nenhum espécime.

GRUPO C

Vascularização arterial do trato gastrointestinal

1. Artéria celíaco-mesentérica (ACM)

Irriga estômago, baço, pâncreas, fígado, intestino delgado e grosso. Em todos os casos se origina na junção dos arcos aórticos e se bifurca em artéria celíaca e artéria do trato gastrointestinal cranial.

a. Artéria celíaca (AC)

Irriga estômago, pâncreas e fígado. Em nenhum espécime esta artéria emitiu ramos para o pâncreas.

i. Artéria gástrica dorsal (AGD)

Irriga a face dorsal do estômago. Lançou ramos para o dorso do pâncreas em todas as espécies, menos em *T. venulosus*.

ii. Artéria gástrica ventral (AGV)

Irriga a face ventral do estômago. Emitiu um ramo para o pâncreas antes de dar origem à artéria hepática em apenas dois indivíduos (50,0%) de *D. minutus*. Em 72,7% das vezes emitiu ramos para o pâncreas após esta bifurcação (dois indivíduos de *D. minutus*, dois de *S. fuscovarius*, o único de *T. venulosus* e três de *H. albopunctatus*).

1. Artéria hepática (AH)

Irriga o fígado através do pâncreas.

b. Artéria mesentérica cranial (AMCr)

Irriga baço, intestino delgado e intestino grosso.

i. Artéria esplênica (AE)

Irriga o baço. Originou-se na primeira bifurcação da AMCr em 63,6% dos espécimes (um *D. minutus*, o único de *T. venulosus* e dois *H. albopunctatus*). O restante se originou do ramo duodenal da AMCr.

A seguir descrição dos ramos originados pelas bifurcações da AMCr (ignorando-se a AE).

i. Primeira bifurcação: ramo duodenal

Todos os espécimes apresentaram o ramo duodenal como primeiro ramo da AMCr.

ii. Segunda e terceira bifurcações

Em todos os indivíduos de *D. minutus* e *T. venulosus* a segunda bifurcação da AMCr deu origem a um ramo que se dirige ao intestino delgado e a terceira bifurcação deu origem a um ramo para o intestino delgado e outro para o intestino grosso. Já em *S. fuscovarius* e *H. albopunctatus*, a segunda bifurcação da AMCr acontece da mesma forma que nas outras duas espécies, mas não existe uma terceira bifurcação que emita grandes ramos.

2. Artéria do trato gastrointestinal caudal (AMCa)

Irriga a porção final do intestino grosso e reto. É uma artéria muito pequena, de difícil visualização e não foi encontrada em um indivíduo de *S. fuscovarius* e outro de *H. albopunctatus* por serem ambos fêmeas em estado reprodutivo, com ovários de tamanho bastante aumentado e porções dilatadas no final dos ovidutos. É possível que, nesses casos, a AMCa tenha origem em porções mais caudais das artérias ilíacas comuns direita e esquerda ou em outras áreas, pois esta parece ser muito variável quando à sua origem. A AMCa teve origem na região de bifurcação da artéria aorta dorsal nas artérias ilíacas comuns direita e esquerda (36,3%) ou em uma porção mais anterior da artéria aorta dorsal (45,5%). Em

18,2% dos casos a AMCa emitiu ramos para o rim esquerdo, mas em nenhum emitiu ramos para o rim direito.

Vascularização venosa do trato gastrointestinal

1. Veia porta-hepática (VPH)

Drena estômago, baço, pâncreas, intestino delgado e grosso. São quatro as principais tributárias da VPH que se conectam em diferentes configurações:

a. Veia mesentérica esquerda (VME)

Drena a região duodenal.

b. Veia mesentérica direita (VMD)

Drena baço, intestino delgado e grosso.

c. Veia gástrica ventral (VGV)

Drena a face ventral do estômago. A VGV foi encontrada como tributária direta da VPH (72,7%) ou tributária da VME (18,2%).

Em um indivíduo de *S. fuscovarius* ela não foi visualizada porque o látex não preencheu nenhuma veia deste animal.

d. Veia gástrica dorsal (VGD)

Drena a face dorsal do estômago. Foi tributária da VME em 18,2% das vezes e da VMD em 63,6% das vezes. A veia gástrica cranial (VGCr) não foi encontrada em nenhum espécime. Em um indivíduo de *D. minutus* e em outro de *S. fuscovarius* a VGD não foi visualizada, ambas as vezes por mau preenchimento do látex.

Tabela 2. Características da vascularização do trato gastrointestinal analisadas e seus estados.

CARACTERÍSTICA	ESTADOS
A. Derivação da artéria celíaco-mesentérica:	0: Da região da junção dos arcos aórticos. 1: Do arco aórtico esquerdo (Ecker, 1889; Millard, 1941)
B. Ramificações da artéria celíaca para o Pâncreas:	0: Não. 1: Sim.
C. Ramificações da artéria gástrica ventral (AGV) para o Pâncreas (antes da bifurcação em artéria hepática - AH):	0: Não. 1: Sim.
D. Ramificações da AGV para o Pâncreas (depois da bifurcação da AH):	0: Não. 1: Sim.
E. Ramificações da artéria gástrica dorsal para o Pâncreas:	0: Não. 1: Sim.
F. Derivação da artéria esplênica (AE):	0: Da artéria mesentérica cranial (AMCr). 1: De um ramo da AMCr. 2: Da artéria celíaca.
G. Ignorando-se a AE, a primeira bifurcação da AMCr lança um ramo para a região do duodeno:	0: Não. 1: Sim.
H. Ignorando-se a AE, a segunda bifurcação da AMCr lança:	0: Um ramo para o intestino delgado e um para o intestino grosso. 1: Dois ramos para o intestino delgado e um para o intestino grosso.
I. Derivação da artéria mesentérica caudal (AMCa):	0: Na região de bifurcação da artéria aorta dorsal (AAD) em artérias ilíacas comuns. 1: Na AAD, fora da região de bifurcação. 2: Na artéria ilíaca comum direita. 3: Na artéria ilíaca comum esquerda.
J. Ramificações da AMCa para o Rim Esquerdo:	0: Não emite ramos. 1: Emite ramos.
K. Ramificações da AMCa para o Rim Direito:	0: Não emite ramos. 1: Emite ramos.
L. A veia mesentérica direita (VMD) além de receber tributárias do IG e baço:	0: Não recebe tributárias do intestino delgado. 1: Recebe.
M. A veia gástrica ventral (VGV) é tributária da:	0: Veia porta-hepática (VPH). 1: Veia mesentérica esquerda (VME).
N. A veia gástrica dorsal (VGD) é tributária da:	0: VPH. 1: Veia mesentérica direita (VMD). 2: VME.
O. Possui veia gástrica cranial:	0: Não. 1: Sim.

Tabela 3. Estados das características vasculares (A - O) apresentados por cada espécime das quatro espécies analisadas dentro do gênero *Pseudis*. As características vasculares estão descritas na Tabela 2. O ponto de interrogação representa informação ausente.

Espécime	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>Pseudis Tocantins</i>															
AS 2595	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	2	0
AS 2599	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	2	0
AS 2600	0	0	0	0	1	0	1	0	?	?	?	1	0	2	1
AS 2604	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
AS 2605	0	1	0	1	1	0	1	0	2	1	1	1	0	?	0
AS 2655	0	0	0	1	1	2	1	0	0	1	0	1	1	1	1
AS 2656	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
AS 2657	0	0	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	0	0	1
<i>Pseudis fusca</i>															
AS 2601	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	2	0
AS 2602	0	0	1	1	1	0	1	1	?	?	?	1	0	1	0
AS 2603	0	0	0	0	1	0	1	1	?	?	?	1	0	2	0
AS 2606	0	0	0	0	1	0	1	1	?	?	?	1	0	1	0
<i>Pseudis bolbodactyla</i>															
AS 2594	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	?	1
AS 2623	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	1	1	0	?	0
AS 2624	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0
AS 2625	0	0	0	0	1	0	1	?	1	1	1	1	0	?	0
AS 2626	0	1	0	1	1	0	1	1	?	?	?	1	0	2	0
AS 2627	0	0	0	0	1	0	1	1	?	?	?	1	0	?	1
AS 2628	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	2	1
AS 2629	0	1	1	0	1	0	1	1	?	?	?	1	0	1	0
<i>Pseudis caraya</i>															
AS 2643	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	1	1	0	0	0
AS 2644	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	1	0	1	0
AS 2646	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0
AS 2647	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AS 2648	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	2	0
AS 2649	0	0	0	1	1	2	1	1	3	0	1	1	1	2	0
AS 2650	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	2	0
AS 2651	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	0
AS 2652	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
AS 2653	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	2	0

Tabela 3 – continuação.

Espécime	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>Scinax fuscovarius</i>															
AS 2654	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	0
AS 2667	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	?	?	?
AS 2668	0	0	0	1	1	1	1	1	?	?	?	1	0	1	0
<i>Dendropsophus minutus</i>															
AS 2658	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	?	0
AS 2659	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
AS 2661	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
AS 2662	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Trachycephalus venulosus</i>															
AS 2672	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>															
AS 2664	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	2	0
AS 2665	0	0	0	1	1	1	1	1	?	?	?	1	0	1	0
AS 2666	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0

Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares

Em todas as árvores vasculares analisadas, tanto da AMCr ou quanto da VMD, apresentaram a ordem Strahler de seu primeiro segmento como ordem 4 ou 5 (Tabela 4). Em duas espécies os resultados das ordens Strahler foram uniformes, com todas as árvores de *S. fuscovarius* apresentando a maior ordem Strahler como 5, assim como todas as árvores arteriais de *P. tocantins*, e todas as árvores venosas de *P. tocantins* com a maior ordem sendo 4. Tanto em fêmeas quanto em machos, as árvores arteriais foram na maioria de ordem 5 e nas venosas a maioria foi de ordem 4. Mas não houve relação entre a ordem Strahler e CRC nas espécies (Tabelas 5 e 6).

O número de segmentos em cada árvore variou bastante, de 39 a 147 nas árvores arteriais e de 27 a 143 nas árvores venosas. A regressão linear apontou que não há uma relação significativa entre o número de segmentos e o CRC em árvores venosas ($P=0,7066$, $R^2=0,0085$), mas há em arteriais ($P=0,0262$, $R^2=0,2458$). Não houve relação entre o sexo e o número de segmentos, mas as duas maiores árvores foram observadas em um macho de *P. tocantins* e outro de *P. bolbodactyla*.

O índice de assimetria apresentou uma relação significativa com o CRC nas árvores arteriais ($P=0,0206$, $R^2=0,2636$), mas não nas árvores venosas ($P=0,3042$, $R^2=0,0619$). Já a relação entre o índice e o número de segmentos foi significativa em árvores arteriais ($P=0,0008$, $R^2=0,4749$) e novamente não-significativa para árvores venosas ($P=0,5229$, $R^2=0,0244$) – ver Tabela 5.

A distribuição do número de segmentos para cada ordem (N_i) em relação às ordens de Strahler e Horton (i) obedeceu à lei de Horton nas árvores arteriais e venosas (Figura 7). As razões (R_s) entre o número de segmentos para cada ordem e as ordens de Strahler e Horton foram para as árvores venosas: 0,496 (Strahler) e 0,815 (Horton). Para as árvores arteriais foram de 0,495 para as ordens de Strahler e 0,794 para as de Horton. As regressões lineares para o número de segmentos e as ordens apontaram relações significativas tanto para árvores arteriais quanto venosas (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Descrição das árvores vasculares

As quatro espécies do gênero *Pseudis* e outras quatro de hilíneos apresentaram uma vascularização do trato gastrointestinal com poucas variações e com as suas descrições coincidindo na maioria das características analisadas. Os vasos que apresentaram grande variação foram em geral de pequeno calibre e de importância limitada para o sistema. Devido à relativa homogeneidade das características vasculares encontradas nas espécies analisadas, as descrições produzidas podem ser comparadas a outras descrições encontradas na literatura como um grupo.

Em um estudo da vascularização arterial do trato gastrointestinal de *Bufo bufo*, Pác, Krahulec & Merta (1973) descreveram uma organização dos vasos arteriais bastante semelhante a encontrada nas espécies analisadas no presente trabalho. No entanto, a descrição de *B. bufo* não detalha os ramos da artéria mesentérica cranial (AMCr) nem suas origens, mas é possível perceber que são vários os ramos para o intestino delgado e existe um principal ramo para o intestino grosso.

Em um estudo da vascularização arterial do trato gastrointestinal de *Bufo bufo*, Pác, Krahulec & Merta (1973) descreveram uma organização dos vasos arteriais bastante semelhante a encontrada nas espécies analisadas no presente trabalho. No entanto, a descrição de *B. bufo* não detalha os ramos da artéria mesentérica cranial (AMCr) nem suas origens, mas é possível perceber que são

vários os ramos para o intestino delgado e existe um principal ramo para o intestino grosso.

Ichimura *et al* (2001) relataram a ramificação da AMCr de dez indivíduos de *Lithobates catesbeianus*, sendo esta descrição também bastante semelhante. A única diferença é que em *L. catesbeianus* o primeiro ramo da AMCr (ignorando-se a artéria esplênica) não se destina ao duodeno e sim ao intestino grosso.

Todo o sistema circulatório de *Xenopus laevis* foi descrito por Naomi Millard (1941). Nesse trabalho foram encontrados nos indivíduos de *X. laevis* dois ramos intestinais derivados da artéria celíaca-mesentérica (ACM) - ambos irrigando o intestino delgado, sendo que o primeiro também irrigava o baço e o intestino grosso - e uma artéria celíaca. Essa descrição difere do encontrado nas espécies de rãs paradoxais e outros hilíneos, pois neles a ACM só se divide em artéria celíaca e artéria mesentérica cranial.

Já na vascularização venosa, *X. laevis* se difere das espécies analisadas porque seu estômago é drenado por um par de veias gástricas tributárias de um ramo venoso que se dirige para o lobo esquerdo do fígado e não possui nome. Nas espécies do gênero *Pseudis* e nas outras espécies de hilíneos a única veia que drena todo o sangue do trato gastrointestinal é a porta-hepática.

A descrição da vascularização arterial e venosa do trato gastrointestinal de *Leiopelma hochstetteri* (Stephenson & Elsie, 1947) concorda em grande parte com a descrição das espécies analisadas nesse trabalho. A diferença é que a artéria celíaca emite um ramo para o duodeno e a AMCr não o faz, como ocorre nas espécies de rãs paradoxais e outros hilíneos.

Tabela 4. Relação dos dados quantitativos das árvores vasculares analisadas. Arterial se refere às árvores da artéria mesentérica cranial (AMCr) e Venosa às árvores da veia mesentérica direita (VMD). Legenda: IA - índice de assimetria, CRC - comprimento rostro-cloacal (em milímetros), Sg - número de segmentos, St - ordem Strahler do primeiro segmento. Os traços representam dados ausentes.

CÓDIGO	ARTERIAL			VENOSA			CRC	SEXO
	St	Sg	IA	St	Sg	IA		
<i>Pseudis tocantins</i>								
AS 2655	5	63	0.1813	4	37	0.4854	55,16	MACHO
AS 2656	5	111	0.2787	4	143	0.453	47,45	MACHO
AS 2657	5	89	0.3245	4	39	0.4159	60,67	FÊMEA
<i>Pseudis bolbodactyla</i>								
AS 2626	5	85	0.3368	5	57	0.4708	34,88	FÊMEA
AS 2627	5	147	0.2646	4	53	0.2044	30,51	MACHO
AS 2628	4	85	0.3487	5	101	0.2562	30,05	MACHO
<i>Pseudis caraya</i>								
AS 2648	5	65	0.1148	4	51	0.3445	15,77	MACHO
AS 2649	4	53	0.1753	4	55	0.2529	16,51	MACHO
AS 2651	5	39	0.0351	5	67	0.1184	15,13	MACHO
AS 2652	5	55	0.0581	5	77	0.2077	16,64	FÊMEA
<i>Scinax fuscovarius</i>								
AS 2654	5	55	0.0768	5	77	0.1862	38,06	MACHO
AS 2667	5	85	0.2211	-	-	-	41,45	MACHO
AS 2668	5	57	0.1112	5	67	0.2576	36,22	FÊMEA
<i>Dendropsophus minutus</i>								
AS 2659	4	39	0.0942	5	49	0.1848	24,68	MACHO
AS 2661	5	43	0.073	4	27	0.1859	22,7	MACHO
AS 2662	4	47	0.1505	4	59	0.1582	21,99	MACHO
<i>Trachycephalus venulosus</i>								
AS 2672	5	97	0.1244	4	91	0.2539	58,64	FÊMEA
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>								
AS 2664	5	73	0.2601	5	43	0.0738	55,95	MACHO
AS 2665	4	59	0.2732	4	51	0.2582	64,32	FÊMEA
AS 2666	5	103	0.2154	4	35	0.1103	53,67	FÊMEA

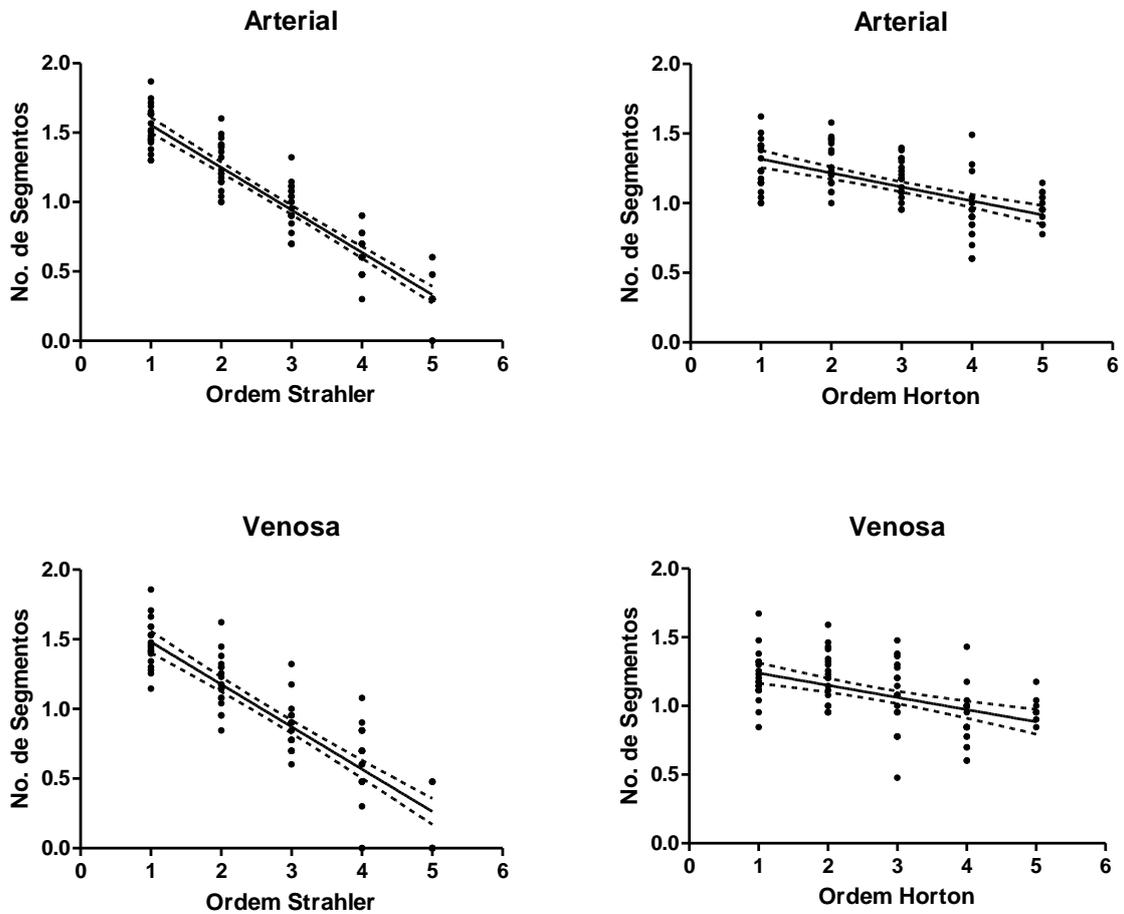


Figura 7. Gráfico de relação entre o número de segmentos em cada ordem (em escala logarítmica de base 10) e as ordens de Strahler e Horton, para as árvores vasculares arteriais e venosas. A linha cheia representa a regressão linear dos dados e a linha interrompida o intervalo de confiança. Gráficos criados pelo programa GraphPad Prism 5.

Tabela 5. Valores da regressão linear entre os dados vasculares e de comprimento rostro-cloacal (CRC) para as árvores arteriais e venosas. Legenda: IA - índice de assimetria da árvore (em escala logarítmica de base 10), Sg - número de segmentos (em escala logarítmica de base 10), Ordem S - ordens de Strahler para os segmentos, Ordem H - ordens de Horton para os segmentos.

Dados	Regressão linear	
	R quadrado	P
Sg Arterial x CRC	0,24580	0,02620
Sg Venosa x CRC	0,00855	0,70660
Sg Arterial x IA Arterial	0,47490	0,00080
Sg Venosa x IA Venosa	0,02442	0,52290
IA Arterial x CRC	0,26360	0,02060
IA Venosa x CRC	0,06195	0,30420
Sg Arterial x Ordem S	0,87350	< 0,0001
Sg Venosa x Ordem S	0,77800	< 0,0001
Sg Arterial x Ordem H	0,37510	< 0,0001
Sg Venosa x Ordem H	0,24140	< 0,0001

As diferenças encontradas entre os dados do presente trabalho e estudos existentes na literatura provavelmente se devem a diferenças nos hábitos dessas espécies ou ao fato de se tratar de espécies de grupos distantes filogeneticamente. A análise de outras espécies pode contribuir para o entendimento dessas relações.

Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares

A vascularização do trato gastrointestinal nas espécies do gênero *Pseudis* e em outros hilíneos demonstrou ser bastante variável no seu número de segmentos, assim como o descrito para *Lithobates catesbeianus* (Ichimura *et al*, 2001). O número de segmentos variou bastante entre espécimes de mesmo

tamanho ou sexo, tanto dentro de uma mesma espécie quanto entre elas. Assim é provável que a variação das árvores vasculares seja apenas fruto da variação individual ou que dependa de outros fatores não abordados aqui.

Nas árvores arteriais, as relações entre CRC e número de segmentos, CRC e índice de assimetria e número de segmentos e índice de assimetria foram todas significativas. Essas relações não foram significativas em árvores venosas provavelmente porque essas árvores são inconstantes. A maioria das variações descritas para o sistema vascular são encontradas em árvores venosas (O'Donoghue, 1935).

As razões entre número de segmentos e ordens das árvores vasculares descritas apontam que essas são auto-similares conforme a lei de Horton. Mas estudos posteriores de avaliação de dimensões fractais podem contribuir para essa conclusão. Estudos morfométricos mais detalhados, incluindo medidas de diâmetro e comprimento dos segmentos, também podem contribuir para a compreensão da construção das árvores vasculares do trato gastrointestinal em anuros. Além disso, a análise da ontogenia pode avaliar se o número de segmentos encontrado nos adultos se modifica durante a idade adulta ou é consequência da fase larval.

CONCLUSÕES

Descrição das árvores vasculares

- A vascularização do trato gastrointestinal das rãs paradoxais varia muito pouco entre as espécies analisadas, o que pode corroborar a monofilia do grupo. As características vasculares com maior variação foram a derivação da AE, a derivação da AMCa, ramificações da AMCr para os rins e as tributárias gástricas da VMD e VME.
- As variações intra e interespecíficas nas outras espécies de hilíneos também foram discretas, mas o pequeno número de indivíduos observados em cada espécie pode mascarar os resultados das variações vasculares.
- Em relação às descrições encontradas na literatura, a variação entre espécies foi maior talvez por se tratar de espécies de grupos distantes filogeneticamente.

Descrição topológica e comparação quantitativa das árvores vasculares

- As árvores vasculares do trato gastrointestinal apresentam, em alguns casos, relações positivas com o tamanho e o sexo dos animais, o que pode ser pouco interessantes para a reconstrução filogenética. São observadas nas árvores arteriais relações significativas entre o número de segmentos, o índice de assimetria e o CRC. Segundo o teste da lei de Horton, as árvores encontradas são auto-similares.

Capítulo 2:

Conformação gastrointestinal e ducto colédoco no gênero *Pseudis*

INTRODUÇÃO

A anatomia do sistema digestório dos anuros foi descrita por Ecker (1889) para duas espécies de rãs européias sendo, até hoje, usada como modelo para a configuração do trato gastrointestinal e órgãos associados. Segundo essa descrição, o sistema digestório é dividido em esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e reto. As transições esôfago-estômago e estômago-duodeno são delimitadas pelos esfíncteres cárdico e pilórico (Figura 8). A transição intestino delgado - intestino grosso nunca foi nomeada, mas também possui um esfíncter que chamaremos aqui de íleo-cólico (Figura 9). O intestino delgado ainda se divide em duodeno, jejuno e íleo, com seus limites sendo definidos não por uma linha, mas por uma região de transição de mucosas no lúmen intestinal.

De forma geral, todo o trato gastrointestinal é ancorado na face dorsal da cavidade abdominal por um dobramento do peritônio que envolve a artéria aorta dorsal e passa entre os rins, dando origem ao trato gastrointestinal. Estômago e duodeno se alinham paralelamente, conectados pelo ligamento gastro-duodenal que inclui o pâncreas, mas é interrompido por uma grande lacuna circular próxima à região pilórica (Francis, 1934). Um segundo ligamento pequeno e firme, o hepato-duodenal, mantém a conexão entre o duodeno e a

fissura portal do fígado, por onde passa a veia porta-hepática e o pâncreas se liga ao fígado. Outros dobramentos do peritônio ainda ligam o trato gastrointestinal aos pulmões e pericárdio. De fato, este modelo de conformação intestinal coincide com o descrito para *Lithobates catesbeianus* (Ichimura *et al*, 2001) e o observado em *Leptodactylus fuscus*, *Rhinella schineideri*, *Dermatonotus mulleri* e *Brachycephalus* sp (observação pessoal da autora).

Segundo Ecker, o pâncreas lança sucos biliares e pancreáticos no duodeno através de um curto ducto colédoco ou ducto comum, que une os ductos vindos do fígado, vesícula biliar e pâncreas. A região onde os ductos biliares e pancreáticos se fundem foi descrita para cinco gêneros de anfíbios por Dornesco, Santa & Zaharia (1965). Os ductos se encontram na parede intestinal em *Bombina* e *Pelobates*, entre o pâncreas e o duodeno em *Bufo* e *Hyla* e ainda dentro do pâncreas em *Rana*. Mas todos esses ductos colédocos foram descritos como sendo de tamanho pequeno em relação ao pâncreas.

Não existem dados na literatura sobre o trato gastrointestinal de rãs paradoxais. Desta forma, apresentamos aqui a descrição das conformações intestinais encontradas e uma comparação morfométrica do ducto colédoco em nove espécies de rãs paradoxais e quatro de outros hilíneos.

METODOLOGIA

Conformação gastrointestinal e morfometria do ducto colédoco

Nove das onze espécies de rã paradoxais mais quatro espécies de outros hilíneos (Tabela1) foram analisados quanto à forma do trato gastrointestinal, posição dos esfínteres cárdico, pilórico e íleo-cólico, localização do final do duodeno (região de transição de mucosa) e as conexões de ligamentos e do trato gastrointestinal ao trato. Desenhos esquemáticos e fotos do trato gastrointestinal foram feitos para posterior comparação entre indivíduos e espécies.

A análise do ducto colédoco consistiu apenas na comparação morfométrica entre o comprimento deste ducto e o comprimento rostro-cloacal dos espécimes. Ambas as medidas foram feitas por paquímetro digital (precisão 0,01mm), mas a medida precisa do ducto colédoco exigiu a observação dos espécimes sob lupa. O comprimento do ducto foi analisado desde o ponto onde ele emerge do tecido pancreático até onde se conecta ao duodeno.

Para as análises estatísticas foram usados a planilha eletrônica Excel (Microsoft®) e o programa estatístico GraphPad Prism 5. O primeiro para cálculo de média, mediana, desvio padrão e transformação logarítmica e o segundo para cálculo da regressão linear. Para as análises, os dados de comprimento rostro-cloacal e comprimento do ducto colédoco foram log transformados (base 10).

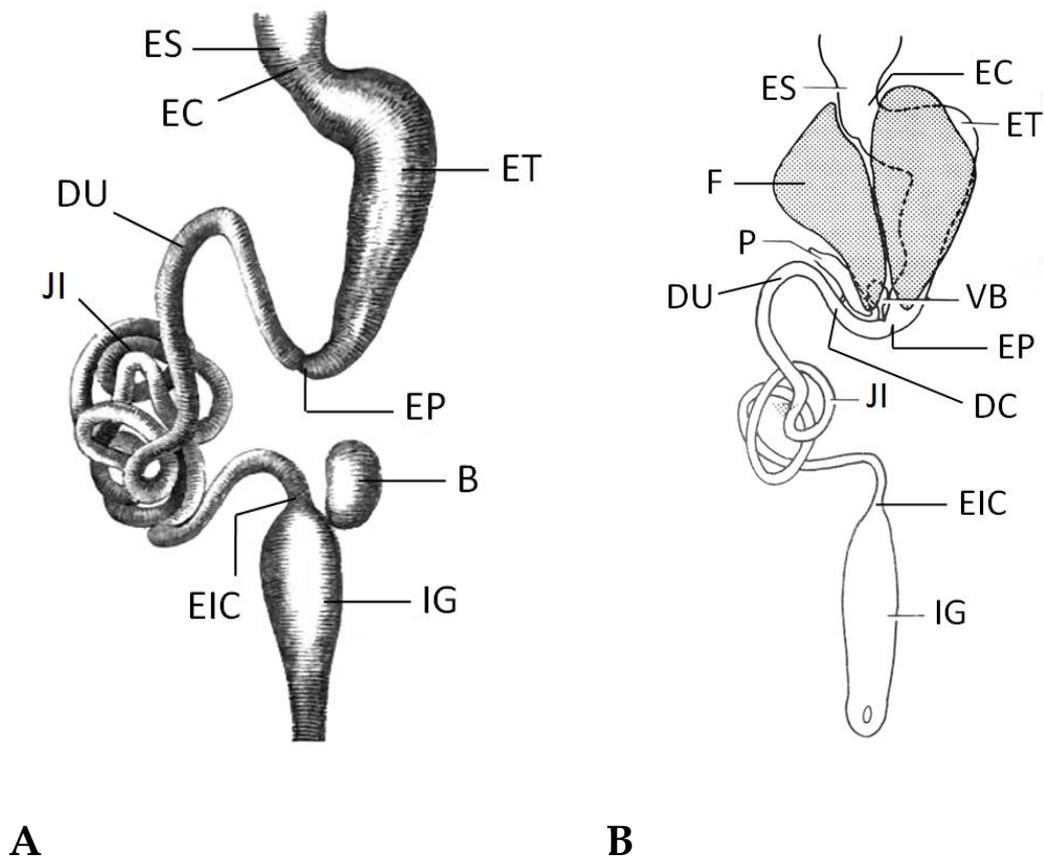


Figura 8. Esquemas dos modelos básico de conformação gastrointestinal de anfíbios anuros. A - *Rana* sp. adaptado de Ecker (1889), B - *Lithobates catesbeianus* adaptado de Duellman & Trueb (1994). Legenda: B - baço, DC - ducto colédoco, DU - duodeno, EC - esfíncter cárdico, EIC - esfíncter íleo-cólico, EP - esfíncter pilórico, ES - esôfago, ET - estômago, F - fígado, ID - intestino delgado, IG - intestino grosso, P - pâncreas, VB - vesícula biliar.

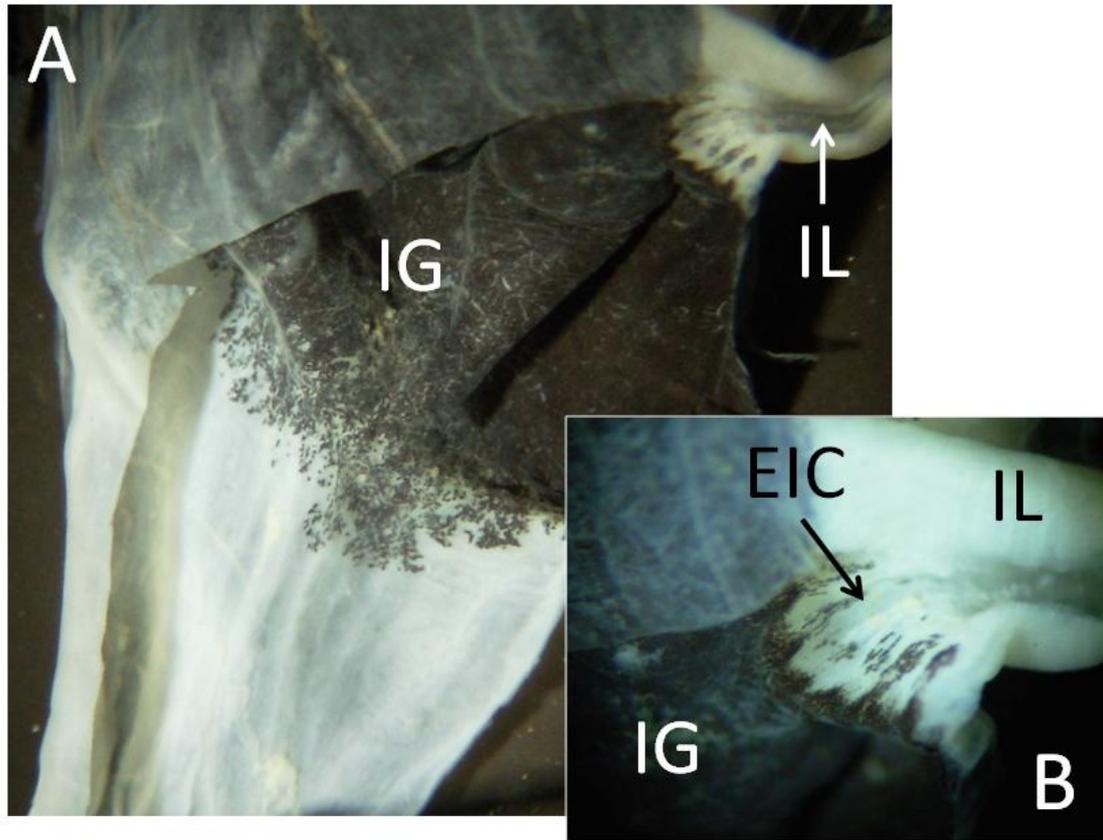


Figura 9. Imagens da transição entre o intestino delgado e o intestino grosso com ambos os intestinos abertos e com os lúmens expostos. A foto B mostra o detalhe do esfíncter íleo-cólico. Legenda: EIC - esfíncter íleo-cólico, IL - íleo, IG - intestino grosso. Imagens de um indivíduo de *Pseudis tocantins*.

RESULTADOS

Conformação gastrointestinal

As conformações encontradas nas três espécies do clado 2 do gênero *Pseudis* (Figura 1) e em todas as quatro espécies de outros hilíneos observados concordaram perfeitamente com o modelo descrito por Ecker, que será chamado aqui de modelo A (Figuras 9A). As espécies componentes dos cladros 1 e 3 amostradas nesse trabalho apresentaram dois novos modelos de conformação gastrointestinal, que chamaremos de modelos B e C.

O modelo B foi observado nas espécies *Pseudis bolbodactyla* e *P. platensis*. Neste modelo o pâncreas se encontra entre o estômago e a porção intestinal formada por jejuno e íleo, sustentado pelos ligamentos gastro-entérico e hepato-entérico (Figura 10B). O ducto colédoco que deixa o pâncreas em direção ao duodeno é nesse modelo maior ou igual que o comprimento do próprio pâncreas.

O modelo C foi encontrado nas espécies *P. cardosoi*, *P. minuta*, *P. tocatins* e *P. fusca*, onde o pâncreas ainda ligado à face ventral do estômago, só está ligado ao resto do trato através do trato gastrointestinal (Figura 10B). Mesmo assim, o pâncreas ainda se liga ao fígado pelo ligamento hepato-pancreático (Figura 11). O intestino grosso é a região intestinal mais próxima do pâncreas, mas ambos estão separados por inúmeros vasos mesentéricos.

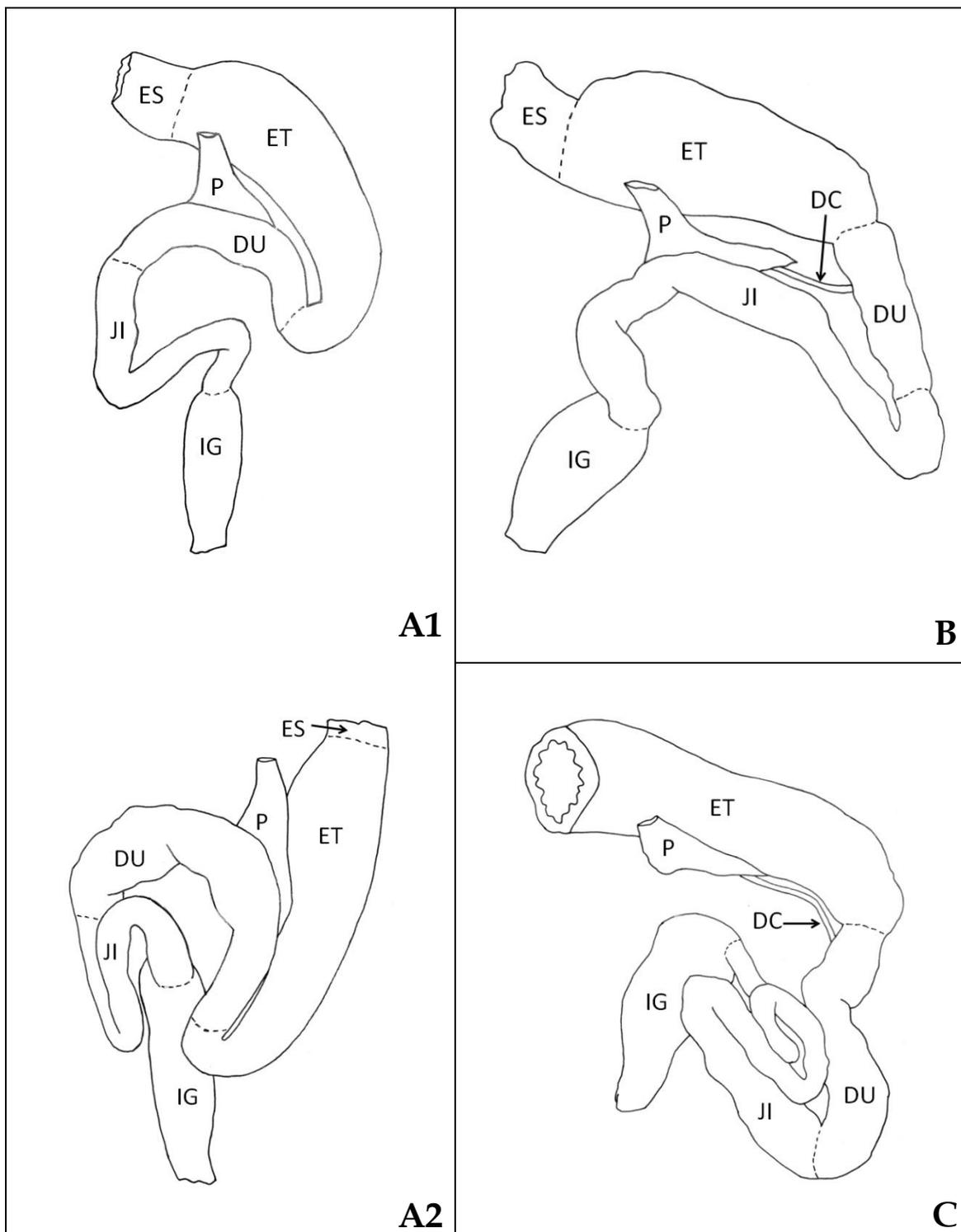


Figura 10. Esquemas dos três modelos de conformação gastrointestinal encontrados em Hylineae com destaque para as divisões do trato. A1 - *Pseudis caraya*, A2 - *Hypsiboas albopunctatus*, B - *Pseudis bolbodactyla*, C - *Pseudis tocantins*. Legenda: DC - ducto colédoco, DU - duodeno, ES - esôfago, ET - estômago, IG - intestino grosso, JI - jejuno e íleo, P - pâncreas.

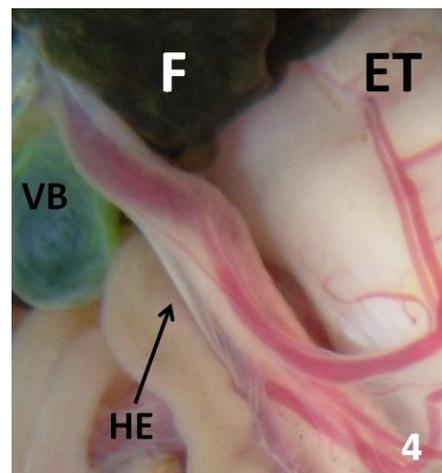
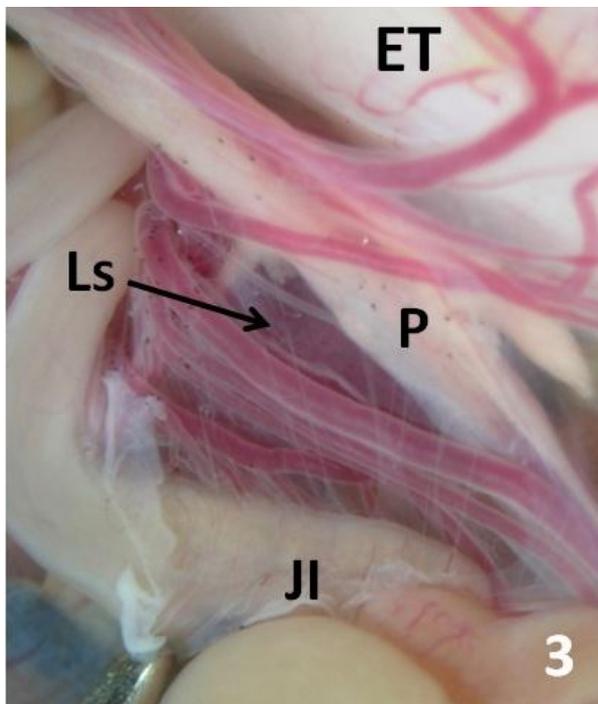
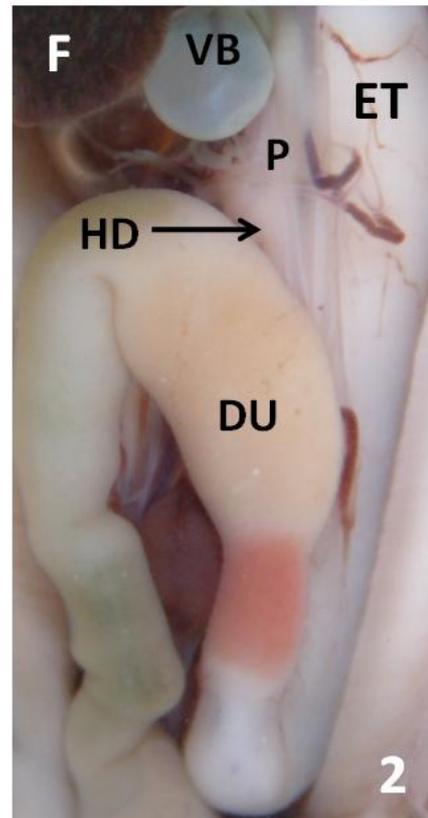
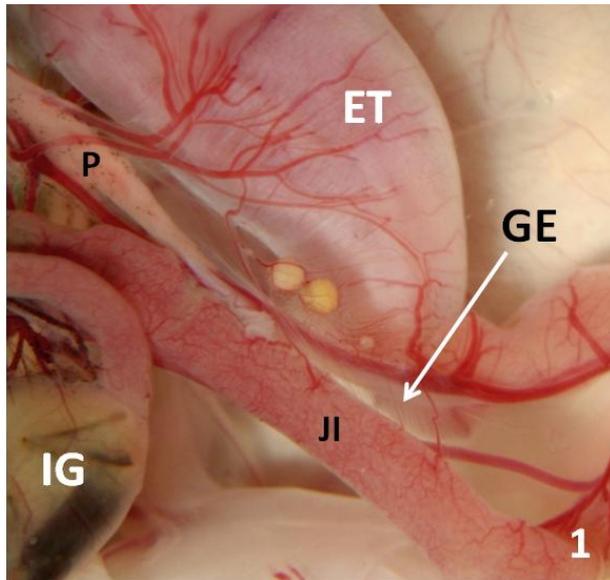


Figura 11. Ligamentos do trato gastrointestinal. Legenda: DU - duodeno, ET - estômago, F - fígado, GE - ligamento gastro-entérico, HD - ligamento hepato-duodenal, HE - ligamento hepato-entérico, IG - intestino grosso, JI - jejuno e íleo, Ls - ligamentos filamentosos, P - pâncreas, VB - vesícula Biliar. Fotos: 1, 3 e 4 - *Pseudis bolbodactyla*, 2 - *Hypsiboas albopunctatus*.

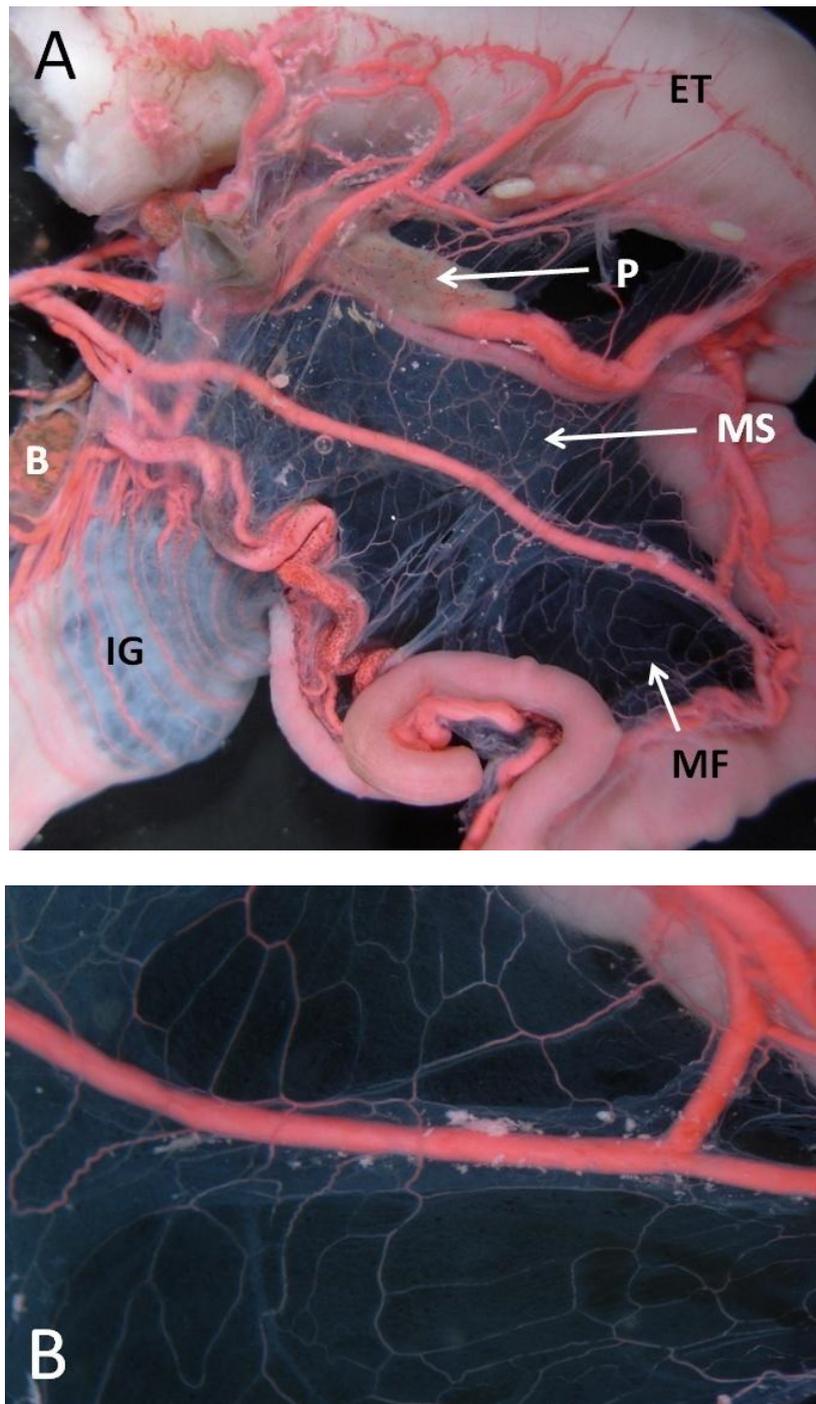


Figura 12. Vascularização do trato gastrointestinal e do mesentério de *Pseudis tocantins* injetado com látex. Fotos: A - visão geral, B - detalhe das membranas mesentéricas envolvendo o ramo duodenal da artéria mesentérica cranial e dos pequenos vasos que irrigam estas membranas. Legenda: B - baço, ET - estômago, IG - intestino grosso, MF - região onde as membranas mesentéricas estão fundidas, MS - região onde as membranas mesentéricas estão separadas, P - pâncreas.

Em *P. tocantins* e *P. bolbodactyla*, foi observado que o trato gastrointestinal é constituído por duas camadas de membrana que se fundem quanto mais próximas dos intestinos e incluem os grandes vasos mesentéricos. Essas membranas são vascularizadas, irrigadas e drenadas pelos grandes vasos, e nas regiões onde não se fundem são conectadas por inúmeros e pequenos ligamentos filamentosos (Figura 12). Também nessas duas espécies e em *P. caraya* não foi observada transição de mucosa entre o jejuno e íleo.

Morfometria do ducto colédoco

O comprimento dos ductos colédocos (DC) variou bastante entre as espécies analisadas (Figura 13). O maior comprimento de ducto colédoco (14,43mm) foi medido em um indivíduo de *P. tocantins* com 60,67mm de comprimento rostro-cloacal (CRC) e o menor (0,20mm) em um indivíduo de *H. albopunctatus* com 57,27mm. No entanto, o menor espécime com 11,90mm de CRC, apresentou um ducto colédoco de 0,42mm (*P. caraya*). As espécies do clado 2 do gênero *Pseudis* apresentaram as menores médias de CRC e também comprimentos reduzidos de DC. Já nas espécies do clado 3 de *Pseudis* foram observados os maiores DC (Tabela 6).

A relação entre as medidas de DC e CRC com todas as espécies analisadas foi significativa em regressão linear ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,5675$) (Figura 14). Retirando-se as outras espécies de hilíneos, a relação entre DC e CRC das espécies de *Pseudis* foi ainda mais significativa em regressão linear ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,9503$) (Figura 15).

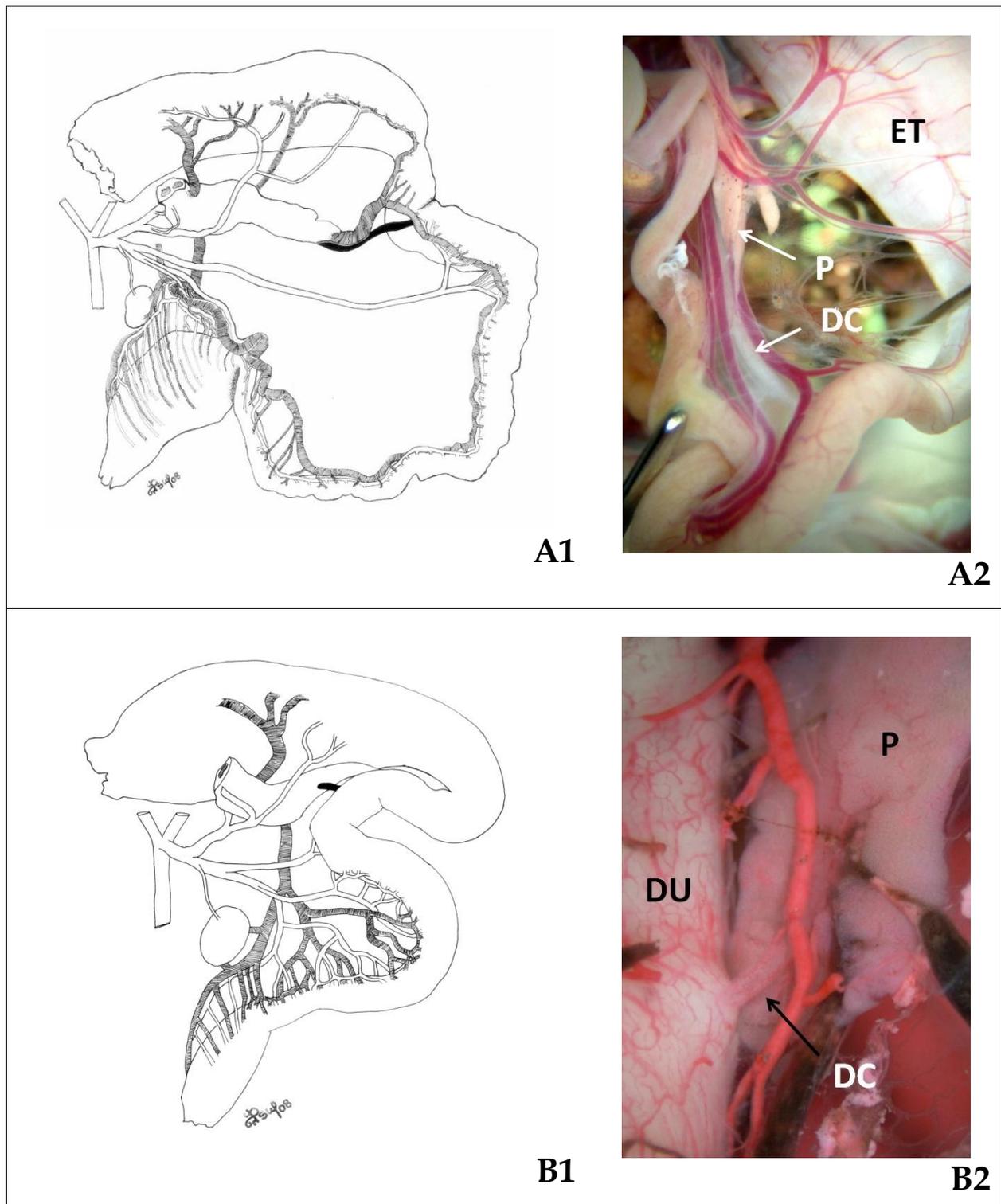


Figura 13. Esquemas e fotos de dois tamanhos de ducto colédoco. A1 e B1: esquemas do trato gastrointestinal e vascularização do trato gastrointestinal, sendo as regiões hachuradas a representação das veias do trato gastrointestinais e as regiões negras a representação dos ductos colédocos (*Pseudis tocantins* e *Pseudis caraya* respectivamente). A2 e B2 são fotos do ducto colédoco, sendo a legenda: DC - ducto colédoco, DU - duodeno, ET - estômago e P - pâncreas (*Pseudis bolbodactyla* e *Hypsiboas albopunctatus* respectivamente).

Analizando apenas as três espécies com maior número de indivíduos, *P. tocantins*, *P. bolbodactyla* e *P. caraya*, a relação entre CRC e DC para cada uma delas foi significativa com ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,6500$), ($P = 0,0004$, $R^2 = 0,6980$) e ($P = 0,0002$, $R^2 = 0,4080$), respectivamente (Figura 16). Em uma análise de semelhança das regressões lineares das três espécies, a diferença entre as inclinações das retas não foi significativa ($P = 0,7763$), mas a diferença entre as elevações dessas retas foi extremamente significativa ($P < 0,0001$). No entanto, as retas de *P. tocantins* e *P. bolbodactyla* foram claramente mais semelhantes entre si do que quando comparadas à reta de *P. caraya*. Como essas três espécies também apresentavam os três modelos de conformação gastrointestinal, é possível inferir que as relações entre DC e CRC das espécies com os modelos de conformação B e C sejam semelhantes.

DISCUSSÃO

Conformação gastrointestinal

A descrição de dois novos modelos de conformação gastrointestinal para anfíbios reforça a idéia de que ainda há muito que se descrever na anatomia desses animais. Apesar deste estudo não envolver a morfometria das áreas do trato gastrointestinal, ficou claro que estes modelos diferem do modelo proposto por Ecker (1889). Além disso, a descrição das membranas que ancoram todo o trato sustenta que este é um sistema estável e que essas

configurações se manteriam mesmo com a plasticidade normal dos tratos gastrointestinais dos anfíbios.

O fato de o gênero *Pseudis* possuir três configurações diferentes para o trato gastrointestinal pode ser explicado pelo seu desenvolvimento incomum. Os enormes girinos desse gênero são freqüentemente comparados com casos de gigantismo relatados em outros anfíbios, onde girinos com disfunções hormonais crescem bem mais que o tamanho normal de suas espécies (Rot-Nikcevic & Wassersug, 2003). De fato, algumas características de morfologia externa de girinos com gigantismo, como cauda bem musculosa, se assemelham às dos girinos de rãs paradoxais. Portanto, é válido deduzir que as características de morfologia visceral também possam ser semelhantes, como o intestino menos enovelado de gigantes de *Xenopus laevis* (Rot-Nikcevic & Wassersug, 2004).

A forma do intestino de girinos pode determinar a configuração encontrada em adultos. Kemp (1951) concluiu que os fatores responsáveis pelo grau de enovelamento de intestino de girinos são: estabelecimento de circulação vitelina no embrião, regulação da pressão hidrostática no trato intestinal e no celoma, e restrição do espaço da cavidade celômica. Segundo esse trabalho, o enovelamento é resultado do crescimento do intestino em uma cavidade restrita ao longo do desenvolvimento. Para que o intestino fique perfeitamente enovelado, a cavidade abdominal precisa ser restrita. Alongamentos da cavidade em qualquer sentido dão origem a tratos intestinais retos ou com apenas uma volta.

Tabela 6. Relação do comprimento do ducto colédoco e do comprimento rostro-cloacal por espécie. Todas as medidas estão em milímetros. Para *Trachycephalus venulosus* são apresentadas as medidas reais de um indivíduo.

ESPÉCIE	DUCTO COLÉDOCO			COMPRIMENTO ROSTRO-CLOACAL		
	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO
<i>Pseudis tocantins</i>	8,37	8,20	2,23	47,54	46,33	7,89
<i>Pseudis fusca</i>	6,50	6,40	0,67	40,22	38,93	3,34
<i>Pseudis bolbodactyla</i>	5,48	5,62	1,67	38,31	37,02	5,88
<i>Pseudis platensis</i>	6,39	6,39	1,97	50,50	50,50	1,09
<i>Pseudis caraya</i>	0,59	0,55	0,16	16,01	16,15	1,62
<i>Pseudis limmelum</i>	1,46	1,46	0,37	18,42	18,42	16,90
<i>Pseudis laevis</i>	0,91	0,91	0,11	17,66	17,66	1,07
<i>Pseudis cardosoi</i>	3,87	3,87	0,72	25,79	25,79	34,94
<i>Pseudis minuta</i>	2,04	2,04	0,18	30,37	30,37	6,47
<i>Scinax fuscovarius</i>	0,92	0,92	0,01	38,84	38,84	3,70
<i>Dendropsophus minutus</i>	0,53	0,51	0,10	22,98	23,03	1,74
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	0,50	0,40	0,37	55,52	56,13	7,78
<i>Trachycephalus venulosus</i>		1,09			58,64	

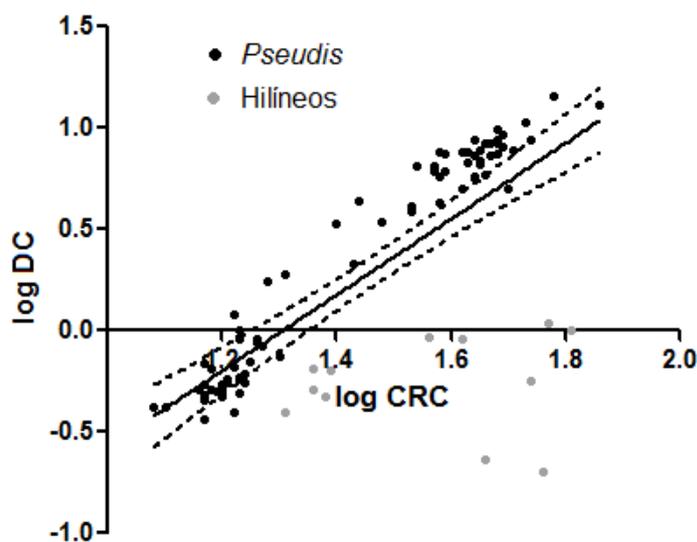


Figura 14. Relação entre comprimento do ducto colédoco (DC) e comprimento rostro-cloacal (CRC) das nove espécies do gênero *Pseudis* e outras quatro espécies de hilíneos analisadas nesse trabalho ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,5675$). A linha representa a regressão linear dos dois grupos juntos e a linha interrompida o intervalo de confiança. Todas as medidas foram log-transformadas (base 10). Gráfico criado pelo programa GraphPad Prism 5.

Além do padrão de enovelamento, o intestino também pode variar no padrão de regressão das áreas intestinais. Foi descrito para *Lithobates catesbeianus* que, durante a metamorfose, as áreas intestinais regridem na mesma proporção, mas não há evidências que isso ocorra em todas as espécies de anfíbios (Pretty, Naito & Wassersug, 1995). Na mesma linha, durante o desenvolvimento, a própria membrana do trato gastrointestinal pode se ajustar para formar uma configuração gastrointestinal modificada. É sabido que ao mesmo tempo em que o intestino sofre mudanças radicais durante o desenvolvimento dos anfíbios, o trato gastrointestinal se estica, contrai e desenvolve lacunas para se adequar às mudanças do trato (Sugimoto *et al*, 1986).

A distribuição da ocorrência dos três modelos de configuração intestinal na filogenia do gênero *Pseudis* também merece destaque. Excluindo-se o clado 2 do gênero, que apresentou o modelo de configuração de Ecker (1889), todas as outras espécies estão em um grupo considerado monofilético nas primeiras hipóteses filogenéticas publicadas (Barg, 2003). No entanto, são necessários estudos de mapeamento filogenético para compreender como os modelos de conformação gastrointestinal evoluíram nesse grupo.

Estudos em anatomia de girinos e ontogenia nas rãs paradoxais podem esclarecer a existência de conformações intestinais diversas. A morfometria intestinal comparativa de adultos também pode ajudar a esclarecer o formato diferenciado de intestinos que ocorre apenas em *Pseudis*.

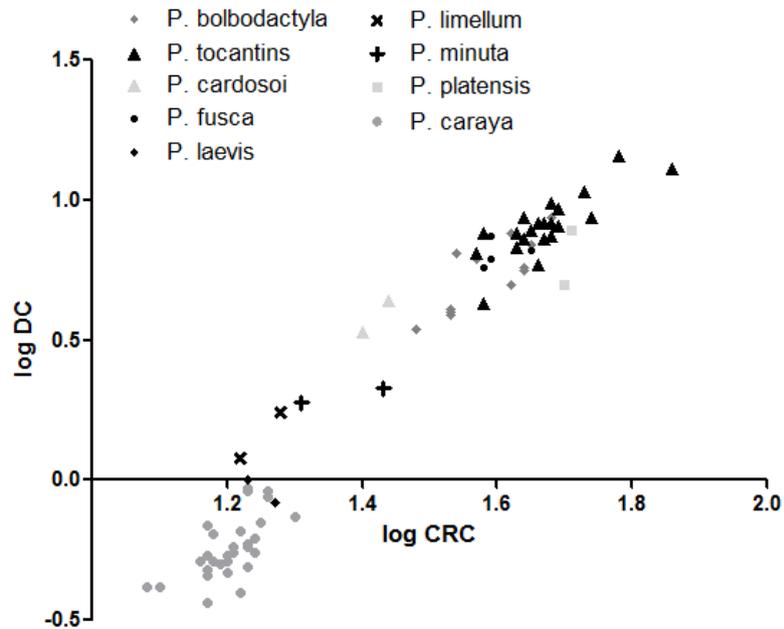


Figura 15. Dispersão das medidas de comprimento do ducto colédoco (DC) e comprimento rostro-cloacal (CRC) das nove espécies do gênero *Pseudis* analisadas nesse trabalho. Todas as medidas foram log-transformadas (base 10). Gráfico criado pelo programa GraphPad Prism 5.

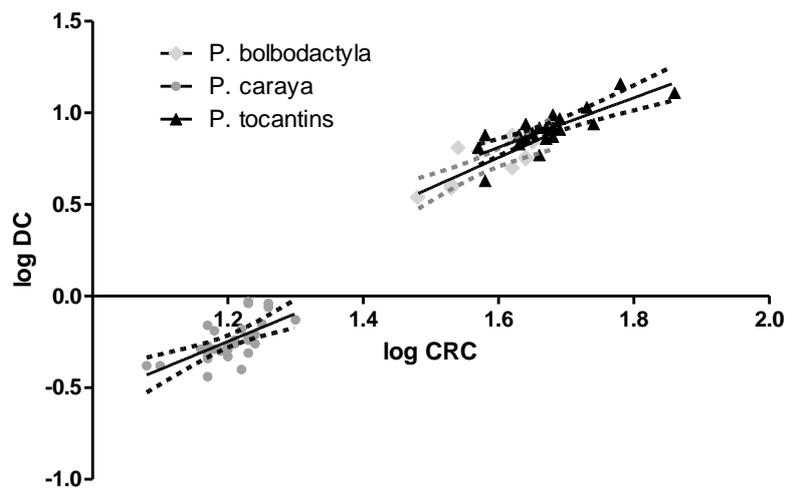


Figura 16. Relação entre DC e CRC em três espécies de *Pseudis*: *Pseudis bolbodactyla* ($P=0,0004$, $R^2=0,698$), *Pseudis caraya* ($P=0,0002$, $R^2=0,408$) e *Pseudis tocantins* ($P<0,0001$, $R^2=0,650$). A linha contínua representa a regressão linear dos grupos e a linha interrompida o intervalo de confiança. Todas as medidas foram log-transformadas (base 10). Gráfico criado pelo programa GraphPad Prism 5.

Morfometria do ducto colédoco

As espécies do gênero *Pseudis* possuem três modelos diferentes de configuração gastrointestinal, onde as distâncias entre o pâncreas e o duodeno aumentam gradualmente do modelo A ao C. Desta forma, a distância entre o ponto onde o ducto colédoco deixa o tecido pancreático até onde esse se funde à parede do duodeno, também aumenta. Como era esperado, foi observada uma diferença estatística nas relações das medidas de DC e CRC para os diferentes modelos de conformação gastrointestinal, apesar de discreta. Análises morfométricas de DC e CRC em um maior número de indivíduos e também com um maior número de espécie podem esclarecer essas relações.

A relação significativa entre DC e CRC no conjunto das espécies analisadas pode representar uma sinapomorfia para esse grupo (Figura 14). Mesmo assim, permaneceram diferenças que não foram explicadas, como a grande diferença no comprimento do ducto colédoco em animais de tamanho semelhante: *H. albopunctatus* - DC = 0,56mm, CRC = 54,99mm e *P. tocantins* - DC = 10,60mm, CRC = 54,27mm. Estudos complementares de ontogenia e morfometria de outras estruturas viscerais podem ajudar na explicação dessas discrepâncias.

CONCLUSÕES

Conformação gastrointestinal

- As espécies do gênero *Pseudis* apresentaram três modelos de conformação gastrointestinal, sendo as principais diferenças entre eles a posição do pâncreas em relação aos intestinos e a posição e a conexão dos ligamentos do trato gastrointestinal.
- Nas espécies do clado 2 de *Pseudis* foi observado o modelo clássico para conformação gastrointestinal nos anfíbios (Ecker, 1889).
- No clado 1 foi descrita uma nova conformação, onde apenas a membrana do trato gastrointestinal liga o pâncreas aos intestinos e a região intestinal mais próxima do pâncreas é o intestino grosso. Esta conformação também foi encontrada em *P. tocantins* e *P. fusca*, do clado 3.
- Para as espécies restantes do clado 3 foi descrita uma segunda nova configuração gastrointestinal. Desta vez, o pâncreas é observado alojado entre o estômago e a região jejuno-íleo do intestino delgado, ancorado pelo ligamento gastro-entérico.

Morfometria do ducto colédoco

- As relações entre as medidas de comprimento de ducto colédoco (DC) e comprimento rostro-cloacal (CRC) foram significativas para o conjunto das espécies analisadas, o que pode representar uma sinapomorfia para o grupo.

- As regressões analisadas entre medidas de CRC e DC nessas espécies não explicaram algumas discrepâncias encontradas nas medidas. Estudos mais aprofundados são necessários. Estudos complementares de ontogenia e morfometria de outras estruturas viscerais são sugeridos.
- Foi observada uma diferença estatística discreta nas relações das medidas de DC e CRC para os diferentes modelos de conformação gastrointestinal. Esse fato sugere que as espécies com modelos de conformação B e C, onde o pâncreas está mais distante do duodeno, tenham ducto colédocos maiores. Análises morfométricas de DC e CRC em um maior número de indivíduos e também com um maior número de espécie podem esclarecer essas relações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Jr, O, B Bacci Jr, A P Lima, D C Rossa-Feres, D F B Haddad & S M Recco-Pimentel.** 2007. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Cladistics*. 23(5), 455-463.
- Auber, D.** 2003. Tulip: A huge graph visualisation framework. In Mutzel, P & Jünger, M. *Graph Drawing Softwares, Mathematics and Visualization*. Springer-Verlag. 105-126.
- AVMA Panel on Euthanasia.** 2001. Report of the AVMA Panel on Euthanasia 2000. *J Am Vet Med Assoc*. 218, 669-696.
- Barg, M V.** 2003. Osteología y relaciones filogenéticas de los anuros neobatracios del género *Pseudis*. Tese de doutorado. *Universidad Nacional de Buenos Aires*. Buenos Aires.
- Brandão, R A, A Garda, V Braz & B Fonseca.** 2003. Observations on the ecology of *Pseudis bolbodactyla* (Anura, Pseudidae) in central Brazil. *Phyllomedusa*. 2(1), 3-8.
- CFMV.** 2002. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasil.
- Diniz, D S & Wanderley, P S .** 2008. Treepy. Site: <http://sourceforge.net/projects/treepy/>. Acessado em: 12 de Junho de 2008.
- Dornesco, G T, V Santa & F Zaharia.** 1965. Sur les canaux hépatiques, cholédoque et pancréatiques des Anoures. *Anatomischer Anzeiger*. 116, 239-257.
- Duellman, W E & Trueb, L.** 1994. Biology of Amphibians. *The Johns Hopkins University Press*. Baltimore and London.
- Ecker, A.** 1889. The Anatomy of The Frog (traduzido por G. Haslam). Oxford. p. 317.
- Emerson, S B.** 1988. The giant tadpole of *Pseudis paradoxa*. *Biological Journal of the Linnean Society*. 34(2), 93-104.
- Faivovich, J, C F B Haddad, P C A Garcia, D R Frost, J A Campbell & W C Wheeler.** 2005. Systematic review or the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 294, 240.
- Francis, E T B.** 1934. The anatomy of the salamander. *Oxford University Press*. London.
- Frost, D R.** 2007. Amphibian Species of the World: an Online Reference. *American Museum of Natural History*, New York, USA. Site: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acessado em: 10 de Outubro de 2007.
- Garda, A A, G C Costa, G R Colli & S N Bão.** 2004. Spermatozoa of Pseudinae (Amphibia, Anura, Hylidae), with a test of the hypothesis that sperm ultrastructure correlates with reproductive modes in anurans. *Journal of Morphology*. 261, 196-205.
- Garda, A A & Cannatella, D C.** 2007. Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44(1), 104-114.

- Garman, S W.** 1877. *Pseudis*, "The Paradoxical Frog". *The American Naturalist*. 11(10), 587-591.
- Haas, A.** 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters. *Cladistics*. 19, 23-89.
- Ichimura, K, K Koizumi, H Kudoh, T Muyaki & T Sakai.** 2001. A novel branching pattern of the superior mesenteric artery found in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) amphibian. *Journal of Anatomy*. 198, 625-633.
- Karch, R, F Neumann, B K Podesser, M Neumann, P Szawlowski & W Schreiner.** 2003. Fractal Properties of Perfusion Heterogeneity in Optimized Arterial Trees: A Model Study. *Journal of General Physiology*. 122(3), 307-322.
- Kemp, N E.** 1951. Development of intestinal coiling in anuran larvae. *Journal of Experimental Zoology*. 116(2), 259-287.
- Koller, A, B Dawant, A Liu, A S Popel & P C Johnson.** 1987. Quantitative analysis of arteriolar network architecture in cat sartorius muscle. *American Journal of Physiology: Heart & Circulation Physiology*. 253, 154-164.
- Kwet, A.** 2000. The genus *Pseudis* (Anura: Pseudidae) in Rio Grande do Sul, southern Brazil, with description of a new species. *Amphibia-Reptilia*. 21, 39-55.
- Lapia, D, P L Marchiafava & A Colantuoni.** 2008. Geometric characteristics of arterial network of rat pial microcirculation. *Journal of Vascular Research*. 45, 69-77.
- Marxen, M & Henkelman, R M.** 2003. Branching tree model with fractal vascular resistance explains fractal perfusion heterogeneity. *American Journal of Physiology: Heart & Circulation Physiology*. 284, 1848-1857.
- Millard, N.** 1941. The vascular anatomy of *Xenopus laevis* (Daudin). *Transaction of the Royal Society of South Africa*. 28(5), 387.
- Millard, N.** 1942. Abnormalities and variations in the vascular system of *Xenopus laevis* (Daudin). *Transaction of the Royal Society of South Africa*. 29(1), 9-28.
- Nash, M.** 2005. Vascular Network and blood flow. *The University of Auckland*. New Zealand.
- O'Donoghue, C H.** 1935. Further Abnormalities in the Blood Vascular System of Frogs. *Journal of Anatomy*. 70(1), 159-176.
- Pác L, P Krahulec & Z Merta.** 1973. Contribution to study of the arterial supply of the gastrointestinal tract of the toad (*Bufo bufo*). *Folia Morphologica - Praha*. 21(3), 296-298.
- Pelletier, J D & Turcotte, D L.** 2000. Shapes of river networks and leaves: are they statistically similar? *Philosophical Transactions of the Royal Society*. London. 355, 307-311.
- Pidwirny, M.** 2006. Stream Morphometry. *Fundamentals of Physical Geography*. Site: <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/10ab.html>. Acessado em: 03 de maio de 2008.
- Pretty, R, T Naito & R J Wassersug.** 1995. Metamorphic shortening of the alimentary tract in anuran larvae (*Rana catesbeiana*). *Anatomical Record*. 242, 417-423.

- Rothnie, P, D Kabaso, P R Hof, B I Henry, S L Wearne.** 2006. Functionally relevant measures of spatial complexity in neuronal dendritic arbors. *Journal of Theoretical Biology.* 238, 505-526.
- Rot-Nikcevic, I & Wassersug, R J.** 2003. Tissue sensitivity to thyroid hormone in athyroid *Xenopus laevis* larvae. *Development Growth & Differentiation.* 45(4), 321-325.
- Rot-Nikcevic, I & Wassersug, R J.** 2004. Arrested development in *Xenopus laevis* tadpoles: how size constrains metamorphosis. *Journal of Experimental Biology.* 207, 2133-2145.
- Sánchez J A, H R Lasker, W Zeng, V R Coluci & C Simpson.** 2003. How similar are branching networks in nature? A view from the ocean: Caribbean gorgonian corals. *Journal of Theoretical Biology.* 222, 135-138.
- Sebben, A.** 2007. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. In: *Herpetologia no Brasil 2.* Sociedade Brasileira de Herpetologia. 311-325.
- Stéphanou, A, S R McDougall, A R A Anderson & M A J Chaplain.** 2005. Mathematical modelling of flow in 2D and 3D vascular networks: Applications to anti-angiogenic and chemotherapeutic drug strategies. *Mathematical and Computer Modelling.* 41, 1137-1156.
- Stephenson, N G & Elsie, M.** 1947. On the circulatory system of *Leiopelma hochstetteri*, with particular reference to the posterior cardinal veins and to the bloodvessels of the kidneys. *Transactions of the Royal Society of New Zealand.* 76, 492-503.
- Sugimoto, K, S Fujii, Y Ichikawa & I Nakamura.** 1986. The fate and role of openings formed in the mesentery of bullfrog tadpoles, with reference to the contour of mesothelial cells. *Journal of morphology.* 188(1), 119-127.
- Van Pelt, J & Schierwagen, A.** 2004. Morphological analysis and modeling of neuronal dendrites. *Mathematical Biosciences.* 188, 147-155.
- Van Pelt, J & Uylings, H B M.** 1999. Natural variability in the geometry of dendritic branching patterns. In: *Modeling in the Neurosciences: From Ionic Channels to Neural Networks.* Harwood Academic Publishers. Amsterdam. 79-108.
- Wake, M H.** 1993. Non-traditional characters in the assessment of caecilian phylogenetic relationships. - *Herpetological Monographs.* 7, 42-55.
- Yekutieli, I & Mandelbrot, B B.** 1994. Horton-Strahler ordering of random binary trees. *Journal of Physics A: Mathematical and General.* 27, 285-293.
- Yen, R T, F Y Zhuang, Y C Fung, H H Ho, H Tremer & S S Sobin.** 1983. Morphometry of cat pulmonary venous tree. *Journal of Applied Physiology.* 55, 236-242.

ANEXO

EXEMPLARES EXAMINADOS

AS - Coleção do Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados da Universidade de Brasília.

CHUNB - Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília.

Pseudis tocantins - Aruanã, GO: AS 2655 a AS 2657. Britânia, GO: AS 2607 a AS 2614, AS 2591, AS 2592, AS 2595 a AS 2600. Formoso do Araguaia, TO: AS 2604. Sandolândia, TO: AS 2605.

Pseudis fusca - Araçuaí, MG: AS 2601 a AS 2603, AS 2606.

Pseudis bolbodactyla - Buritizeiro, MG: AS 2615 a AS 2617, AS 2623, AS 2624. Flores de Goiás, GO: AS 2590, AS 2593, AS 2594, AS 2625 a AS 2629.

Pseudis platensis - Cuiabá, MT: AS 0590. Poconé, MT: AS 2340.

Pseudis caraya - Aruanã, GO: AS 2620 a AS 2622, AS 2630 a AS 2653. Britânia, GO: AS 2618, AS 2619.

Pseudis limellum - Corumbá, MS: CHUNB 42781, CHUNB 42786.

Pseudis laevis - Rio Negro, AM: AS 2583, AS 2584.

Pseudis cardosoi - Jaquirana, RS: CHUNB 35096, CHUNB 35106.

Pseudis minuta - Porto Alegre, RS: CHUNB 34867, CHUNB 34871.

Scinax fuscovarius - Brasília, DF: AS 2654, AS 2667, AS 2668.

Dendropsophus minutus - Brasília, DF: AS 2658 a AS 2663.

Trachycephalus venulosus - Monte Alegre, GO: AS 2672.

Hypsiboas albopunctatus - Brasília, DF: AS 2664 a AS 2666, AS 2669 a AS 2671.