

Instituto de Biologia da Universidade de Brasília
Departamento de Ciências Fisiológicas
Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados
Pós-graduação em Biologia Animal

OSTEOLOGIA DE *BRACHYCEPHALUS* (ANURA:
BRACHYCEPHALIDAE): DESENVOLVIMENTO E DIVERSIDADE
MORFOLÓGICA DAS PLACAS ÓSSEAS,
REGIÃO AUDITIVA E SUA IMPORTÂNCIA PARA O MONOFILETISMO
DO GÊNERO

Leandro Ambrósio Campos

Dissertação de Mestrado

Fevereiro de 2007

Osteologia de *Brachycephalus* (Anura,
Brachycephalidae): desenvolvimento e diversidade
morfológica das placas ósseas, região auditiva e sua
importância para o monofiletismo do gênero

Leandro Ambrósio Campos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Animal do
Instituto de Biologia da Universidade de
Brasília para a obtenção do título de Mestre
em Biologia Animal

Orientador: Dr. Antônio Sebben

Brasília, fevereiro de 2007

*Dedico aos meus pais João (1932-2005) e Corina,
aos meus irmãos, especialmte ao Flávio, pelos sarifi-
cios pela minha formação.*

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. Antonio Sebben, pela orientação, e pela amizade e companherismo ao longo de todo o trabalho.

Ao Dr. Hélio Ricardo da Silva, pela grande contribuição no trabalho, leitura de manuscritos e busca por dados.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Jr., por permitir minha participação em suas expedições de coleta e pela grande ajuda no campo.

À mestra Leonora Tavares Bastos, minha companheira, pela presença e compreensão em os todos os momentos difíceis, e também pelo auxílio nas técnicas de MEV.

Aos estagiários Andréa Lessa Benedet e Flávio Henrique Corrêa Brandão, pela amizade e ajuda ao longo de todo o projeto.

À Profª Dra Sônia Nair Bao, pela instrução e permissão de uso do MEV.

Aos técnicos Washington José de Oliveira e Valter Cesar Fernandes Silveira, pelo companherismo e auxílio ao longo do trabalho.

Ao Dr. Luis Fernando Ribeiro, pela doação de espécimes de *Brachycephalus bruneus*.

À Reginaldo Machado, pela doação de espécimes de *Brachycephalus pernix*.

Aos Biólogos Rafael Camilo Laia, Rodrigo Morales e Darlan Aragão, pela amizade e auxílio no campo.

Aos estagiários Fábio Viegas Caixeta e Natiela Beatriz de Oliveira, pela amizade e auxílios prestados.

Ao mestre Natan Medeiros Maciel, pela amizade e auxílio ao longo do trabalho.

Ao Biólogo Rubens Hisanari Matsushita, pela ajuda no campo e na preparação das imagens digitais.

À Dra. Adriene Fernandes e a mestra Mariana Zatz, pela contribuição no trabalho.

À bióloga Édelyn Cristina Nunes Silva, pela preparação de lâminas histológicas.

À Profª Dra. Rosana Tidon Skloz, pela permissão de uso do microscópio de luz.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pujol, pela permissão de uso do microscópio de luz e câmera fotográfica.

À Profª Dra Maria Júlia da Silva, pelo empréstimo do estereomicroscópio e equipamento

fotográfico.

Aos professores Carlos Alberto Schwartz e Elizabeth Ferroni Schwartz, pelos auxílios prestados ao longo do trabalho.

Aos demais alunos do LACV, Thompson França Tomatieli, Pedro Ivo Molina Pellicano, Patrícia Sousa Wanderley, Armando Queiroz Teixeira Jr, pela amizade e ajuda ao longo do trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, processo 132528/2005-3. À Universidade de Brasília e ao Instituto de Biologia, por conceder as instalações necessárias para o desenvolvimento do projeto. Ao RAN/ IBAMA, pela permissão de coleta e transporte dos espécimes usados no trabalho (número 0193/05, processo número 02010.003041/05-87). À prefeitura municipal de Atibaia, pela permissão de visita e coleta no parque municipal da Grota Funda.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Agradecimentos..... | i |
| Resumo..... | viii |
| Abstract..... | xi |
| Capítulo 1: Desenvolvimento e diversidade morfológica das placas ósseas no gênero <i>Brachycephalus</i> | 1 |
| Introdução..... | 1 |
| Novidades Morfológicas e miniaturização em <i>Brachycephalus</i> | 1 |
| Hiperossificação e osteoderme em <i>Brachycephalus</i> | 2 |
| Objetivos | 3 |
| Material e Métodos..... | 4 |
| Preparação de esqueletos..... | 5 |
| Histologia..... | 6 |
| Maceração e MEV..... | 5 |
| Resultados..... | 7 |
| 1.1 Desenvolvimento das placas ósseas craniais, vertebrais e paravertebrais de <i>Brachycephalus ephippium</i> | 7 |
| Placas craniais..... | 6 |
| Ornamentações do frontoparietal..... | 7 |
| Desenvolvimento das placas paróticas..... | 9 |
| Ossos do teto do crânio..... | 15 |
| Placas espinhais e paravertebrais..... | 15 |
| Desenvolvimento das placas espinhais e paravertebrais..... | 19 |
| Morfologia do crânio de adultos de <i>Brachycephalus ephippium</i> | 22 |
| Placa parótica..... | 22 |
| Demais ossos do crânio..... | 22 |
| Morfologia das vértebras de adultos de <i>Brachycephalus ephippium</i> | 24 |
| Placas espinhais e paravertebrais..... | 24 |
| 1.2 Diversidade morfológica das placas craniais, vertebrais e paravertebrais no gênero <i>Brachycephalus</i> | 26 |
| Placa parótica de <i>Brachycephalus vertebralis</i> , <i>Brachycephalus</i> sp2 e <i>Brachycephalus nodoterga</i> | 26 |
| Placa parótica de <i>Brachycephalus</i> sp1..... | 28 |
| Placas espinhais e para-vertebrais de <i>B. nodoterga</i> , <i>B. vertebralis</i> , e <i>Brachycephalus</i> sp2..... | 28 |
| Placas espinhais e para-vertebrais em <i>Brachycephalus</i> sp1..... | 30 |
| Discussão..... | 32 |

| | |
|---|----|
| Desenvolvimento..... | 32 |
| Placa parótica..... | 32 |
| Placas espinhais e paravertebrais..... | 32 |
| Formação..... | 34 |
| Placas ósseas de <i>Brachycephalus</i> : osteoderme ou osso ordinário?..... | 35 |
| Variações morfológicas entre as espécies do gênero <i>Brachycephalus</i> | 37 |
| Capítulo 2: Elementos da região auditiva em <i>Brachycephalus</i> e sua importância para o monofiletismo do gênero..... | 40 |
| Introdução..... | 40 |
| Materiais e métodos..... | 41 |
| Resultados..... | 42 |
| O ouvido médio e externo de <i>Brachycephalus</i> | 41 |
| Discussão..... | 43 |
| O ouvido médio e externo de Anuros..... | 43 |
| Conclusões gerais..... | 52 |
| Referências Bibliográficas..... | 53 |
| Apêndices..... | 58 |
| Apêndice 1: Espécimes examinados no presente trabalho..... | 58 |
| Apêndice 2: Artigo referente ao segundo capítulo desta dissertação..... | 59 |

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1 Cortes transversais (nível 1 da Fig. 1C) do crânio de *Brachycephalus ephippium* evidenciando a placa parótica. A- Espécime de Cotia (CRC= 8,06 mm), tricrômio de Manson, aumento de aproximadamente 100x. B- Espécime de Cotia (CRC= 9,10mm), tricrômio de Gomori, aumento de aproximadamente 400x. C- Níveis dos cortes transversais de histologia: Cc- condrócito; Cp- crista parótica; Ec- estrato compacto; Ee- estrato esponjoso; Eost- endóstio; Ep- epiderme; Cpost- condro-perióstio; M- matriz óssea; Ob- osteoblasto; Oc- osteoclasto; Plp- placa parótica 8
- Figura 2 Cortes transversais de jovens de *Brachycephalus ephippium* evidenciando o osso frontoparietal (nível 1 da Fig. 1C). A- (CRC= 8,06 mm), tricrômio de Manson, aumento de aproximadamente 100x; B- (CRC=9,10 mm), tricrômio de Gomori, aumento de aproximadamente 400x. Fparietal- frontoparietal; Cparótica- crista parótica; Ec- estrato compacto; Esv- espículas verticais; Ob- osteoblastos 10
- Figura 3 Espécime jovem de *Brachycephalus ephippium* (CRC = 8,08mm). A - Vista lateral. B e C- vista dorsal. 1- frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipital, 6- cápsula ótica. Barras equivalem a 1mm .. 11
- Figura 4 Jovem de *Brachycephalus ephippium* com CRC= 10,58mm. A - vista lateral. B e C vista dorsais. 1- Frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipital; 6- cápsula ótica. Barras equivalem a 1mm 12
- Figura 5 Jovem de *Brachycephalus ephippium* com CRC= 12,85mm. A - vista lateral. B e C vista dorsais. 1- Frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipital. Barras equivalem a 1mm 13
- Figura 6 Jovem de *Brachycephalus ephippium* com CRC= 13,52mm. A- vista lateral. B e C vistas dorsais. 1- Frontoparietais; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal. Barras equivalem a 1mm 14
- Figura 7 Cortes transversais de jovem de *Brachycephalus ephippium* de Cotia (CRC= 9,10 mm), evidenciando as placas paravertebrais. A e B tricrômio de Gomori, aumento de aproximadamente 100x (nível 3 da Fig 1C). Cpost- condro-perióstio; Ec- estrato compacto da derme; Ep- epiderme; Esv- espícula vertical; Ppv- placa para-vertebral; Pt IV- processo transversal da vértebra IV; Pt V- processo transversal da vértebra V 17
- Figura 8 Detalhes da associação entre a placa para-vertebral e os processos transversos. A e B- (mesmo exemplar da figura 7) tricrômio de Gomori, Aumento de aproximadamente 400x (nível 3 da Fig. 1C) . Cb- condroblasto; Cc- condrócito; Ec- estrato compacto; Ee- estrato esponjoso; Ep- epiderme; Cpost- condro-perióstio; M- matriz; Ob- osteoblasto; Oc- osteócito; Osc- osteoclasto; Ost- osteóide; Pc- pericôndrio; Post- perióstio 18

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 9 | Região do processo espinhal de <i>Brachycephalus ephippium</i> de Cotia (CRC= 9,10 mm). Corado com tricrômio de Gomori (nível 2 da Fig. 1C). Ec- Estrato compacto da derme; Ep- epiderme; Pe- processo espinhal; Ple- placa espinhal. Aumento de aproximadamente 100x | 19 |
| Figura 10 | Coluna vertebral jovens de <i>Brachycephalus ephippium</i> diafanizados. A e B- vista dorsal e ventral de jovem de 8, 80mm; C e D- vistas dorsal e ventral de jovem com 10, 52mm. De I à VIII- vértebras pré-sacrais; SC- vértebra sacral; PPV- placa paravertebral. Barras equivalem a 1mm | 20 |
| Figura 11 | Coluna vertebral de jovens de <i>Brachycephalus ephippium</i> . A e B- vistas dorsal e ventral de exemplar com 12,85mm; C e D- vistas dorsal e ventral de exemplar com 13, 58mm. De I a VIII- vértebras pré-sacrais; SC- vértebra sacral; PPV- placa paravertebral; PI à PVIII- placas espinhais I à VIII. Barras equivalem a 1mm | 21 |
| Figura 12. | Crânios de exemplares adultos. A e B vistas dorsal e lateral de <i>Brachycephalus ephippium</i> de Atibaia SP; C imagem de varredura da vista ventral do crânio de <i>Brachycephalus ephippium</i> de Cotia SP. 1- frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parietal; 4- esquamosal; 5- exoccipital; 7- pré- maxilar; 8- maxilar; 9- cápsula ótica; 10- paraesfenóide; 11- vômer; 12-esfenetímóide; 13- forâme da veia jugular; 14- fomâme do nervo óptico; 15- forâme do nervo óculo-motor; 16- forâme do nervo trigêmio; 17- janela oval. Barras equivalem a 1mm | 23 |
| Figura 13 | Região vertebral de exemplares adultos de <i>Brachycephalus ephippium</i> procedentes de Atibaia (A e B), Cotia (C e D) e Itamonte (E). A e B- vistas dorsal e ventral de exemplares diafanizados; C- MEV da vista dorsal das vértebras ; C e D vistas ventrais da região da placa paravertebral. De I a VIII- vértebras pré-sacrais; PPV- placa paravertebral; PI à PVIII- placas espinhais I à VIII. Barras equivalem a 1mm | 25 |
| Figura 14 | Morfologia do crânio de adultos de <i>Brachycephalus</i> . A e B- Vistas dorsal e ventral de <i>Brachycephalus pernix</i> ; C e D- vistas dorsal e ventral de exemplares de <i>B. cf. vertebralis</i> de Ubatuba, SP. 1- frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parietal; 4- esquamosal; 5- pré-maxilar, 6- maxilar; 7- quadradofugal; 8- crista pós-orbital. Barras equivalem a 1mm | 27 |
| Figura 15 | Crânios de <i>Brachycephalus</i> sp1 de Nova Friburgo, RJ. A e B- Vistas dorsal e lateral respectivamente. 1- frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parietal; 4- esquamosal; 5- exoccipital, 6- crista pós-orbital; 7- pré - maxilar; 8- maxilar. Barras equivalem a 1mm | 28 |
| Figura 16 | Região das vértebras de espécies de <i>Brachycephalus</i> . A- MEV do esqueleto axial de <i>Brachycephalus pernix</i> ; B e C diafanização e MEV de exemplares de <i>B. cf. vertebralis</i> . De I a VIII- vértebras pré-sacrais; SC- vértebra sacral; PPV- placa paravertebral; PI à PVIII- placas espinhais I à VIII; PSC- placa espinhal da vértebra sacral. Barras equivalem a 1mm | 29 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 17 | Região vertebral de <i>Brachycephalus</i> sp1. A- vista dorsal; B- vista ventral. De I a VIII- vértebras pré-sacrais; SC- vértebra sacral; PPV- placa para-vertebral; PI a PVIII- placas espinhais I a VIII; Psacral- placa espinhal da vértebra sacral. Barras equivalem a 1mm | 31 |
|-----------|---|----|

Capítulo 2

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | A-Vista posterior do crânio de <i>Brachycephalus ephippium</i> , em posição equivalente ao decúbito dorsal, de exemplar macerado: 1- Janela oval; 2- placa parótica; 3- forâme da veia jugular; 4- côndilo occipital; 5- forâme magno. B- Vista ventral de crânio diafanizado de <i>Brachycephalus pernix</i> : 1- Opérculo; 2- processo posterior; 3- cápsula ótica; 4- esquamosal; 5 quadradojugal; 6- paraesfenóide. Barras equivalem à 1mm | 41 |
|----------|--|----|

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 2 | A e B- Vistas ventrais da região posterior do crânio e cintura escapular de microdissecção <i>a fresco</i> <i>Brachycephalus ephippium</i> , evidenciando o sistema opérculo, m. escapular e supraescápula (deslocada). B- Vista ventral de exemplar diafanizado de <i>Barycholos ternetizi</i> : 1- Anel timpânico; 2- janela oval; 3- columela; 4- esquamosal; 5- exoccipital; 6- atlas | 45 |
|----------|---|----|

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 3 | Vista palmar dos pés direito (A) e esquerdo (B) de <i>Brachycephalus hermo-genesi</i> . Setas indicam falanges não ossificadas no pé esquerdo, cujos correspondentes no pé direito estão completamente ossificadas | 51 |
|----------|--|----|

RESUMO

O surgimento de novidades morfológicas e o aumento de tamanho e de complexidade são eventos evolutivos raros. Por outro lado, a redução de tamanho e a perda de estruturas e de complexidade talvez sejam os eventos mais comuns no processo evolutivo. No gênero *Brachycephalus*, encontramos um mosaico dessas duas tendências: simplificação e novidades morfológicas. Na diagnose de todas as espécies deste gênero, menciona-se a presença e ausência de ossificações dérmicas. No entanto, nem todos os trabalhos de descrição usam métodos apropriados para a descrição de dados osteológicos. As placas ósseas associadas às vértebras e ao crânio de *Brachycephalus ephippium* foram classificadas como osteoderme. Contudo, o desenvolvimento ontogenético dessas estruturas não foi estudado.

O recente trabalho de Frost *et al.* (2006), propões várias mudanças na taxonomia e sistemática na maioria das grandes famílias de anfíbios. De acordo com este trabalho, não existem caracteres morfológicos que suportem a monofiletismo do gênero *Brachycephalus*. Adicionalmente, este trabalho sugere a proximidade filogenética entre os gêneros *Brachycephalus*, *Euparkerella* e *Adelophryne*, baseada em padrões supostamente homólogos de redução e perda de falanges. Entretanto, essas hipóteses foram baseadas apenas em *Brachycephalus ephippium*, que por décadas foi a única espécie do gênero. Consequentemente, muito da diversidade osteológica do gênero *Brachycephalus* não foi considerada nestes estudos prévios. Os objetivos desta dissertação foram: 1) a descrição da ontogenia das placas ósseas associadas ao crânio e vértebras de *Brachycephalus ephippium*; 2) a descrição da diversidade morfológica das placas ósseas entre espécies do gênero *Brachycephalus* e 3) avaliar a importância da osteologia do aparato auditivo de *Brachycephalus* para o monofiletismo do gênero. Adicionalmente, reavaliamos os dados da literatura sobre redução de falanges no grupo e as consequências taxonômicas envolvidas.

Exemplares de *Brachycephalus ephippium* foram coletados em Atibaia, Cotia, Mogi das Cruzes e Itamonte. Incluímos também espécimes de *B. brunneus*, *B. hermogenesi*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. cf. vertebralis*, *B. vertebralis*, e duas espécies não descritas aqui referidas como *Brachycephalus* sp1 (de Nova Friburgo e Petrópolis) e *B. sp2* (Faz. Capricórnio, Ubatuba). Os espécimes foram mortos por injeção de cloridrato de bupivacaína 0,2% e então submetidos às seguintes preparações: maceração e microscopia eletrônica de

varredura; diafanização e coloração com alizarina e azul de alcian e microscopia de luz.

Nossos resultados indicam que as placas ósseas de *B. ephippium* são estruturas independentes aqui classificadas como ossos ordinários e não como osteoderme. Existem três tipos de placas ósseas: 1) a placa parótica, localizada na porção postero-lateral do crânio; 2) as placas espinhais, fusionadas aos processos espinhais de todas as vértebras e 3) as placas paravertebrais, associadas aos processos transversos das vértebras IV e V. O tipo de ossificação das placas ósseas é intermembranoso (também conhecido como ossificação dérmica).

Entretanto, a formação das placas não ocorre no tegumento, como mencionado em trabalhos anteriores. Adicionalmente, encontramos evidências histológicas de que o pericôndrio das vértebras em crescimento contribui com células que formam a membrana periosteal das placas paravertebrais e espinhais. A possibilidade de participação de células da derme na formação do periosteal das placas ósseas não foi descartada. No entanto, estas estruturas não cabem no termo osteoderme, que até o momento, está definido de forma confusa, agrupando uma série de estruturas possivelmente não homólogas. Não existem precedentes na literatura de registro de estruturas semelhantes às placas paróticas. As placas associadas às vértebras, entretanto, estruturas possivelmente análogas são encontradas em outros gêneros como *Dendrobates*, *Ceratophrys* e *Lepidobatrachus*. Todavia, serão necessários estudos osteológicos comparativos para avaliar as semelhanças entre estas estruturas em outros grupos.

A diversidade morfológica das placas ósseas no gênero *Brachycephalus* sugere que possa haver grupos monofiléticos dentro do gênero, que seriam identificados pelos seguintes padrões: 1) ausência de placas ósseas e ornamentações (que ocorre em *B. brunneus*, *B. didactylus*, *B. ferruginus*, *B. hermogenesi*, *B. izecksohni*, *B. pernix* e *B. pombali*); 2) presença da placa parótica, das placas espinhais e paravertebrais, com diferentes dimensões, graus de ornamentação e ossificação (presente nas espécies *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. vertebralis*, *B. sp1* e *B. sp2*). O monofiletismo desses grupos só poderá ser testado por uma análise filogenética.

No aparato auditivo de *Brachycephalus* estão ausentes o tímpano, anel timpânico, tuba de Eustáquio e columela. Adicionalmente, encontramos um grupo de caracteres que podem corroborar o monofiletismo de *Brachycephalus*: 1) re-orientação posterior da janela oval; 2) opérculo cobrindo praticamente toda a janela oval; 3) presença do processo posterior no opérculo, onde se dá a origem do músculo opercular; 4)- perda de uma falange do dígito

V. Adicionalmente, concluímos que a morfologia dos dígitos não corrobora a proximidade filogenética entre *Brachycephalus* e *Euparkerella*, ou *Adelophryne*, como sugerido por Frost *et al.* (2006). A posição de *Brachycephalus* em Brachycephalidae permanece por ser avaliada em trabalhos futuros.

ABSTRACT

The rising of morphological novelties, growth of body size and structural complexity are uncommon evolutionary events. On the other hand, the miniaturization of body size and morphological simplification may be the most usual tendencies in the evolutionary process. Incredibly, both morphological novelties and morphological simplification could be observed in species of *Brachycephalus*. In the genus *Brachycephalus*, in all species diagnosis, the presence and absence of dermal ossifications is mentioned. Nevertheless, not all descriptions use appropriate methods for osteological studies. The plates associated with vertebrae and skull of *B. ephippium* were, previously, identified as osteoderm. Though, there are not any studies on ontogeny and development of these structures in *Brachycephalus*. The recent work of Frost *et al.* (2006) proposes taxonomic and systematic changes in most amphibians family clades. According to this article, there are no currently known morphological characters that support the monophyly of the genus *Brachycephalus*. In addition, Frost *et al.* (2006) corroborate the hypothesis of a close relationship among genera *Brachycephalus*, *Euparkerella* and *Adelphophryne*, based on digital reduction and loss patterns. Though, these considerations were made using only *B. ephippium*, and thus, too much osteological diversity among *Brachycephalus* species were not evaluated in previous works.

The goals of this dissertation are: 1) ontogenetic description of the bony plates present in vertebrae and skull of *B. ephippium*; 2) description of morphological variations in these plates in species of the genus *Brachycephalus*; 3) evaluate the importance of the auditory region osteology and phalangeal formulae to the monophyly of the genus *Brachycephalus*. We also reevaluate the available information on digital reduction and its importance to the systematics of the taxa involved.

Units of *B. ephippium* were collected in Atibaia, Cotia, Mogi das Cruzes, Teresópolis and Itamonte. In addition, we included units of *B. brunneus*, *B. hermogenesi*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. cf. vertebralis*, *B. vertebralis*, and two undescribed species: *Brachycephalus* sp1 (from Nova Friburgo and Petrópolis, RJ Brazil) and *Brachycephalus* sp2 (from Faz. Capricórnio, in Ubatuba, SP Brazil). The specimens were killed with bupivacaine chloridrate (0.2%) and submitted at scanning electronic microscopy. Other specimens were fixed in formalin solution (10%), cleared and double stained with alizarin red and alcian blue. Juvenile

specimens of *B. ephippium* were submitted to histological techniques for ontogenetic description of the bony plates.

We report that the bony plates are new, independent, and ordinary bone structures, that arise in early development stages. There are three types of bony plates, where named: 1) parotic plates, found in the postero-lateral portion of skull; 2) spinal plates, fused with spinal processes of all vertebrae and 3) paravertebral plates, associated with transverse processes of IV and V vertebrae. The bony plates type of ossification is intermembranous (named also as dermal ossification). However, its rising does not take place in integument, like proposed previously in literature. In addition, we found histological evidences that the perichondrial membrane of the growing vertebrae, releases cells to form a periosteal membrane of the paravertebral and spinal plates. The possibility of participation of dermal cells in the formation of precursor tissue of bony plates was not discarded. However, we decided that these structures are not osteoderms. This term is confused, and possibly enclose many non homologous structures. That is the first time that a structure like the parotic plate is being reported in literature. However, the spinal and paravertebral plates may have analogous structures in other genus, as *Ceratophrys*, *Lepidobatrachus* and *Dendrobates*. Nevertheless, a complementary comparative osteological studies will be necessary to analyzed the semblance among the bony plates in other geni.

The morphological variations of the bony plates in the genus *Brachycephalus* suggest that there are monophyletic groups in the genus, that may be recognized by following patterns: 1- absence of bony plates (occurring in *B. brunneus*, *B. didactylus*, *B. ferruginus*, *B. hermogenesi*, *B. izecksohni*, *B. pernix* and *B. pombali*); 2- presence of parotical plates and spinal and paravertebral plates of variable size and degree of ossification and ornamentation (occurring in *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. vertebralis*, *B. sp1* and *B. sp2*). Nevertheless, the monophyly of these groups remind to be tested in a phylogenetic analysis, using data from different sources.

The auditory apparatus of most anurans is composed of a tympanic membrane, connected to the stapes. It is connected to the operculum, which conduces the sound vibrations to the inner ear. In *Brachycephalus* species the tympanic membrane and the stapes are absent. In addition, we discovered a new set of characters that may corroborate the monophyly of the genus: 1) the posterior orientation of the fenestra ovalis; 2) the enlarged operculum that nearly

fills the fenestra ovalis; 3) bears a large process for the attachment of the m. opercularis and 4) absence of one phalange in digit V. Analyzing the osteology of species that were recently included in Brachycephalidae, and other miniaturized species among other groups, we conclude that these characters are unique to *Brachycephalus* genus, and support its monophyly. Other important conclusion is that the digital morphology does not corroborate a close relationship between *Brachycephalus* and *Euparkerella* or either *Adeloprhyne*, as suggested by Frost *et al.* (2006). The position of *Brachycephalus* in the Brachycephalidae remains to be analyzed in further investigations.

CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DAS PLACAS ÓSSEAS NO GÊNERO *BRACHYCEPHALUS*

INTRODUÇÃO

NOVIDADES MORFOLÓGICAS E MINIATURIZAÇÃO EM *BRACHYCEPHALUS*

Embora o aparecimento de novidades morfológicas seja um evento raro ao longo da evolução (Futuyma, 1986), os anuros apresentam várias inovações osteológicas em relação aos Caudata e Gymnophiona, como os ossos pré-nasal, neopalatino, interfrontal, internasal e outros ossos dérmicos do crânio até então desconhecidos (Trueb, 1993). A miniaturização, definida como extrema redução do tamanho do corpo em uma linhagem, constitui uma importante fonte de novidades morfológicas (Hanken e Wake, 1993; Yeh, 2002). O surgimento de Lissamphibia é atribuído à miniaturização a partir de seus ancestrais Temnospondyli (Bolt, 1977).

Segundo os critérios de Yeh (2002), onde indivíduos com menos que 25mm são considerados miniaturizados, todas as espécies do gênero *Brachycephalus* seriam miniaturizadas. *Brachycephalus ditactylus*, com 8,6 mm de comprimento rostro-cloacal (Izeckshon, 1971), é, provavelmente, o menor tretrápode vivente. Sendo a miniaturização uma tendência tão importante neste grupo, é provável o surgimento de novidades morfológicas, principalmente na osteologia. Dentre as possíveis novidades morfológicas destacam-se os escudos ósseos encontrados em *B. ephippium*, *B. vertebralis* e *B. nodoterga*.

McLachan (1943), um dos pioneiros no estudo da osteologia de *Brachycephalus*, descreveu, em detalhes, o crânio de adultos de *B. ephippium*, com base em cortes histológicos seriados. Izecksohn (1971), ao descrever *Psyllophryne didactyla*, que não possui placas ósseas no crânio e nas vértebras, revelou um pouco da diversidade osteológica do grupo. Izecksohn (1988) comparou as falanges dos membros posteriores e anteriores de *B. ephippium*, *B. didactylus*, *Euparkerella brasiliensis*, *E. cochraeae*, *E. robusta* e *E. tridactyla*. Neste trabalho,

o autor propõe a proximidade entre *Brachycephalus* e *Euparkerella*. Heyer *et al.* (1990) atribuíram o status de espécie para *B. nodoterga* e registraram a presença de “verrugas ossificadas” na pele do dorso e flancos dessa espécie, com base em observações externas. Pombal *et al.* (1998) descreveram *B. pernix*, e apresentaram dados sobre cintura escapular e falanges. Kaplan (2002) propôs a sinonimização de *Psillophryne* a *Brachycephalus*, com base em cortes histológicos que revelaram um pequeníssimo omosterno em *B. ephippium*. Pombal (2001) descreveu *B. vertebralis* e registrou a presença de placas associadas às vértebras. Nas descrições de *B. brunneus* e *B. izecksohni* (Ribeiro *et al.*, 2005) e de *B. ferruginus* e *B. pombali* (Alves *et al.*, 2006), espécimes inteiros foram diafanizados. Os autores fazem comparações da osteologia entre as novas espécies e *B. pernix*, *B. hermogenesi* e *B. ephippium*.

HIPEROSSIFICAÇÃO E OSTEODERME EM *BRACHYCEPHALUS*

Os trabalhos acima expõem uma série de diferenças osteológicas entre as espécies de *Brachycephalus*. Várias descrições de espécies incluem caracteres osteológicos em suas diagnoses. Presença e ausência de ossificações dérmicas e co-ossificação são caracteres presentes em todas as diagnoses de espécies do gênero *Brachycephalus*. As placas ósseas encontradas em *Brachycephalus* são tratadas como resultado de hiperossificação do crânio e ossificação dérmica (Duellman e Trueb, 1986). Ruibal e Shoemaker (1984) classificaram tais estruturas como osteoderme, cuja ocorrência foi também registrada em *Dendrobates* (Trueb, 1973), *Ceratophrys* e *Lepidobatrachus* (Duellman e Trueb, 1986). Segundo estes autores, hiperossificações podem se manifestar das seguintes formas:

- 1- *Ossificações de estruturas cartilaginosas*: em pipídeos todas as cartilagens do crânio são substituídas por tecido ósseo;
- 2- *Fusões de ossos*: em pipídeos, e em algumas espécies de *Brachycephalus*, os ossos da caixa craniana se fundem completamente, aumentando a rigidez do crânio.
- 3- *Exostose*: ossos do crânio emitem projeções em direção à derme, formando ornamentos. Ocorrem em alguns bufonídeos e em *Ceratophrys*.
- 4- *Hipertrofia de ossos dérmicos*: em bufonídeos, é comum que ossos como esquamosal, frontoparietal e maxilar possuam processos, abas e cristas relativamente bem desenvolvidas.
- 5- *Co-ossificação*: comum em bufonídeos e hilídeos. Na co-ossificação, elementos ósseos

que se formam na derme durante o desenvolvimento, crescem e se fundem aos ossos. Como resultado, temos a pele inteiramente fundida aos ossos.

Na maioria dos casos, a hiperossificação está relacionada aos ossos do crânio, mas também pode ocorrer nas vértebras, como em *Brachycephalus* e em outros grupos. A presença de elementos ósseos no tegumento é um fenômeno largamente distribuído entre vários grupos de Tetrapoda, com exceção de Aves e Caudata (Romer, 1956). Em répteis, anfíbios e mamíferos, este fenômeno ficou conhecido como osteoderme, ou ossos dentro da derme (Smith, 1960 *apud* Ruibal e Shoemaker, 1984). A ocorrência de osteoderme em anuros foi registrada por Ruibal e Shoemaker (1984). Entretanto, o desenvolvimento ontogenético de osteoderme foi pouco estudado. Alguns dos poucos trabalhos recentes são os de Gilbert *et al.* (2001) sobre o desenvolvimento da carapaça dos cágados *Trachemys scripta* e *Chelidra serpentina*, e o de Vickarius e Hall (2006) sobre o desenvolvimento das placas dérmicas no tatu *Dasypus novemcinctus*. A presença de osteoderme entre linhagens distantemente relacionadas sugere que esses elementos ósseos associados à derme não são homólogos. Dentre os anuros, poucas são as similaridades encontradas entre as várias formas de ossificação dérmica.

OBJETIVOS

Este capítulo tem os seguintes objetivos:

1- Descrever o desenvolvimento das placas ósseas associadas ao crânio e vértebras de *Brachycephalus ephippium*.

2- Analisar a ocorrência de placas ósseas em diferentes espécies do gênero *Brachycephalus*, e suas eventuais variações de forma, tamanho e relações anatômicas.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados exemplares jovens e adultos de *Brachycephalus ephippium*, procedentes dos municípios de Cotia (n= 24), Atibaia (n= 20) e Mogi das Cruzes (n= 18) - SP, Itamonte (n= 21) -MG e Teresópolis (n=11) -RJ . Além de espécimes preservados e tombados na coleção pessoal do Prof. Dr. Antonio Sebben, exemplares recém-coletados também foram utilizados.

Os animais foram eutanasiados por destruição do sistema nervoso central, por meio de espinhalação ou anestesiados por contato com solução de Cloridrato de Lidocaina a 2%, em conformidade com procedimentos éticos preconizados pela American Medical Veterinary Association (AVMA).

Exemplares medindo menos que 14 mm de comprimento rostro-cloacal (CRC) foram considerados jovens ou pré-adultos. Em cada espécime processado foi observada e registrada a presença, a forma e o tamanho das placas ósseas, bem como sua relação com estruturas adjacentes. Ossos de ontogenia conhecida para outras espécies também foram analisados para inferências cronológicas relacionadas ao nível de desenvolvimento. A Tabela 1 apresenta os exemplares jovens utilizados no estudo e seus respectivos tamanhos.

Exemplares de outras espécies de *Brachycephalus*, como *B. brunneus* (n=1), *B. hermogenesi* (n=1), *B. nodortega* (n=1), *B. cf. vertebralis* (n=6), foram submetidos à diafanização e posterior análise osteológica. Também foram diafanizados e analisados exemplares de duas espécies não descritas, a saber: *Brachycephalus* sp 1 (Nova Friburgo - RJ, n=12; e Petrópolis - RJ, n=2), além de, *Brachycephalus* sp 2 (Ubatuba - SP, n=5). Os respectivos números de tomo de todos os exemplares utilizados no presente estudo encontram-se listados no Apêndice 1.

Tabela 1. Espécimes jovens de *Brachycephalus ephippium* utilizados no trabalho

| População | n° de tombo | CRC (mm) | Processamento |
|---------------------|--------------|----------|---------------|
| Cotia, SP | AS00441 | 8,06 | H |
| | AS00440 | 8,71 | D |
| | AS02543 | 9,10 | H |
| | AS00448 | 10,02 | D |
| | AS00447 | 10,58 | D |
| | AS02542 | 10,85 | H |
| | AS00495 | 12,21 | D |
| | AS00494 | 12,85 | D |
| Atibaia, SP | AS02502 | 8,08 | D |
| | AS02505 | 11,07 | D |
| | AS02503 | 11,48 | D |
| | AS02504 | 12,11 | D |
| | AS00509 | 13,70 | D |
| | AS00502 | 13,72 | D |
| | AS00468 | 13,82 | D |
| | Itamonte, MG | AS02496 | 11,37 |
| AS02428 | | 13,52 | D |
| Mogi das Cruzes, SP | AS02499 | 10,71 | D |
| | AS02500 | 13,03 | D |

H- histologia;

D- diafanização

PREPARAÇÃO DE ESQUELETOS

Duas técnicas foram empregadas nas preparações dos esqueletos: diafanização, seguida de coloração com alizarina e azul de alcian, e maceração, seguida de análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Exemplos jovens e adultos de quatro populações de *B. ephippium* foram diafanizados segundo o protocolo de Taylor e Van Dyke (1985), com algumas modificações.

Exemplares previamente fixados foram desidratados em etanol 100% por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à coloração das cartilagens com solução corante 1 (ácido acético glacial: etanol absoluto, 4:6 v/v, com 200mg/l de azul de alcian), por cerca de 24 hs. Depois desse período os espécimes foram submersos em solução de Borato de Sódio (50g/l) para neutralização do pH, por 48 horas. O processo de clareamento tem início com a submersão na mistura água oxigenada 10 volumes : solução de KOH 0,5% (1:5 v/v), com as amostras mantidas por 12 horas à luz natural. Em seguida, as amostras

foram submetidas a solução digestiva tamponada, composta por tripsina (1g/l) diluída em solução de Borato de Sódio (1,5g/l) em água destilada. Após a digestão, os exemplares foram mergulhados em solução de KOH 0,5% contendo 0,1g/l de vermelho de alizarina, para coloração dos ossos, por período de até 24 hs. Após lavagem em água corrente, as vísceras e a pele foram removidas. Os espécimes foram, então, submetidos a soluções de glicerol em KOH 0,5%, por períodos de 12 horas, com as seguintes proporções crescentes de glicerol: 4:6 v/v; 1:1 v/v; 7:3 v/v e glicerol 100%, onde os espécimes ficam preservados. Para os espécimes menores que nove milímetros, não foi necessária a digestão enzimática.

HISTOLOGIA

Para as análises histológicas, 3 exemplares jovens de *B. ephippium* foram eutanaziados e fixados em solução de formaldeído a 10% durante aproximadamente 12 horas. Em seguida, os exemplares foram descalcificados em solução de ácido nítrico a 0,5% por aproximadamente duas horas e mantidos em álcool etílico 70°GL. Então, o material foi desidratado por meio de banhos consecutivos de meia hora de duração cada, em soluções alcoólicas com concentrações crescentes de 80 e 90%, seguidos de dois banhos de álcool absoluto. Após esta etapa, o material foi diafanizado em solução de etanol/xileno 1:1 v/v, seguida por três banhos de meia hora em xileno 100%.

O material foi, então, incluído em parafina, após três banhos a 58°C. Cortes transversais semi-seriados com 6µm de espessura foram submetidos às seguintes técnicas de coloração: Hematoxilina de Harris e Eosina, Tricrômio de Gomori e Tricrômio de Manson.

MACERAÇÃO E MEV

Para maceração, os espécimes adultos foram eutanaziados, dissecados, eviscerados e submetidos a tratamento com solução diluída de hipoclorito de sódio, imersão em água oxigenada (5 volumes), lavagem com água destilada e desidratação com etanol 92 GL, e então mantidos à temperatura ambiente. Alguns exemplares foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura, técnica para qual os ossos foram cobertos com ouro e fotografados no microscópio JEOL JEM 840A.

RESULTADOS

1.1: DESENVOLVIMENTO DAS PLACAS ÓSSEAS CRANIAIS, VERTEBRAIS E PARAVERTEBRAIS DE *BRACHYCEPHALUS EPHIPIUM*

PLACAS CRANIAIS

Tanto os cortes histológicos quanto as amostras diafanizadas indicam que as placas craniais são elementos ósseos independentes, não tendo surgido a partir da hipertrofia de algum outro elemento ósseo do crânio, e portanto merecem um nome próprio. As placas craniais foram aqui denominadas como **placas paróticas** devido à sua participação na cobertura da cápsula ótica.

Cortes transversais semi-seriados dos jovens de *B. ephippium* evidenciam que as placas paróticas nestes estágios são formadas por tecido ósseo em processo de mineralização, caracterizado pela matriz ligeiramente avermelhada contendo alguns osteócitos em seu interior. Em torno da matriz é possível notar a presença de tecido conjuntivo contendo osteoblastos com núcleos achatados, o que caracteriza um endóstio. Nas extremidades medial e lateral da placa, este tecido conjuntivo se espessa e os osteoblastos se acumulam, formando fileiras, que, na última, se projetam ventralmente. (Fig. 1 A). As placas paróticas em formação se localizam abaixo da derme, onde não ocorre contato direto entre a matriz em mineralização e o estrato compacto da derme (Fig. 1 A e B). No entanto, alguns osteoblastos que circundam a matriz em mineralização tocam o estrato compacto, e emitem projeções que invadem a derme, iniciando as formações conhecidas como ornamentos (Fig. 1 A e B).

ORNAMENTAÇÕES DO FRONTOPARIETAL

Além de outros elementos em formação no crânio, os cortes transversais mostram ainda o frontoparietal em formação (Fig. 2A e B). Exceto pelo grau de mineralização, o frontoparietal se encontra da mesma forma que a placa parótica, com um endóstio circundante, constituído de células osteogênicas achatadas, e a matriz mineralizada contendo alguns osteócitos isolados. Nesse estágio, a matriz já se encontra bastante mineralizada, mas o osso ainda não está completo. Na figura 2B está evidenciado um par de espículas de

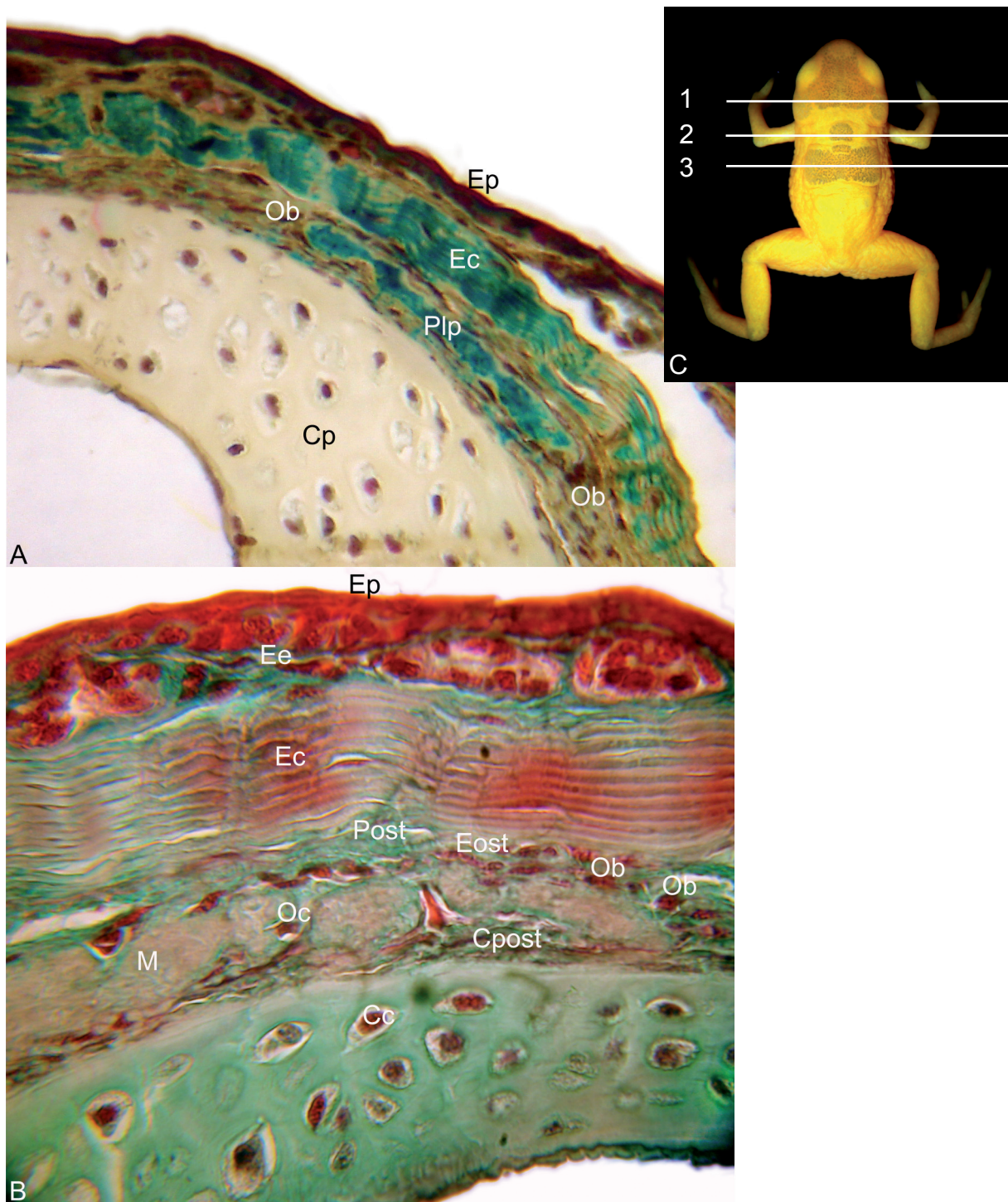


Figura 1. Cortes transversais (nível 1 da Fig. 1C) do crânio de *Brachycephalus ephippium* evidenciando a placa parótica. A- Espécime de Cotia (CRC= 8,06 mm), tricrômio de Manson, aumento de aproximadamente 100x. B- Espécime de Cotia (CRC= 9,10mm), tricrômio de Gomori, aumento de aproximadamente 400x. C- Níveis dos cortes transversais de histologia: Cc- condrócito; Cp- crista parótica; Ec- estrato compacto; Ee- estrato esponjoso; Eost- endóstio; Ep- epiderme; Cpost- condro-perióstio; M- matriz óssea; Ob- osteoblasto; Oc- osteoclasto; Plp- placa parótica.

matriz calcificada que se projetam em direção à derme. Estas espículas, que darão o aspecto ornamentado ao crânio no estágio adulto, irão proliferar neste e em outros ossos do crânio.

DESENVOLVIMENTO DAS PLACAS PARÓTICAS

No menor exemplar diafanizado, com CRC = 8,08mm, as placas paróticas se resumem a um par de pequenos discos convexos, localizadas logo acima da extremidade posterior do ramo ótico (posterior) do esquamosal, sendo ligeiramente mais larga do que alta (Fig. 3). Neste estágio, nenhum osso apresentou espículas projetadas em direção à derme. No espécime com CRC = 10,02mm, a placa parótica passa a apresentar duas porções: uma lateral e outra dorsal. Enquanto a porção dorsal se desenvolve medialmente, a porção lateral cresce no sentido crânio-caudal. Essas características são evidenciadas no exemplar com CRC= 10,58mm (Fig. 4). No exemplar com CRC = 11,37mm, a placa parótica está totalmente ornamentada. A porção dorsal possui expansão crânio-caudal, que contacta o osso proótico. No exemplar com CRC = 12,21mm, a placa parótica se expande medialmente, sobrepondo-se ao exoccipital e à porção dorso-lateral do proótico, passando também a fazer um ténue contato antero-medial com o frontoparietal. A porção dorsal da placa parótica já se encontra bastante ornamentada, porém, a porção lateral ainda é pouco desenvolvida, como se verifica no exemplar com CRC= 12,85mm (Figura 5). No espécime com CRC = 13,52mm, a margem interna funde-se inteiramente ao frontoparietal (Fig. 6). A placa parótica possui um afilamento na metade mais medial da porção dorsal, enquanto a extremidade lateral é mais expandida, passando da linha posterior do crânio. A porção lateral se desenvolve radialmente, mais o eixo de maior desenvolvimento é crânio-caudal.

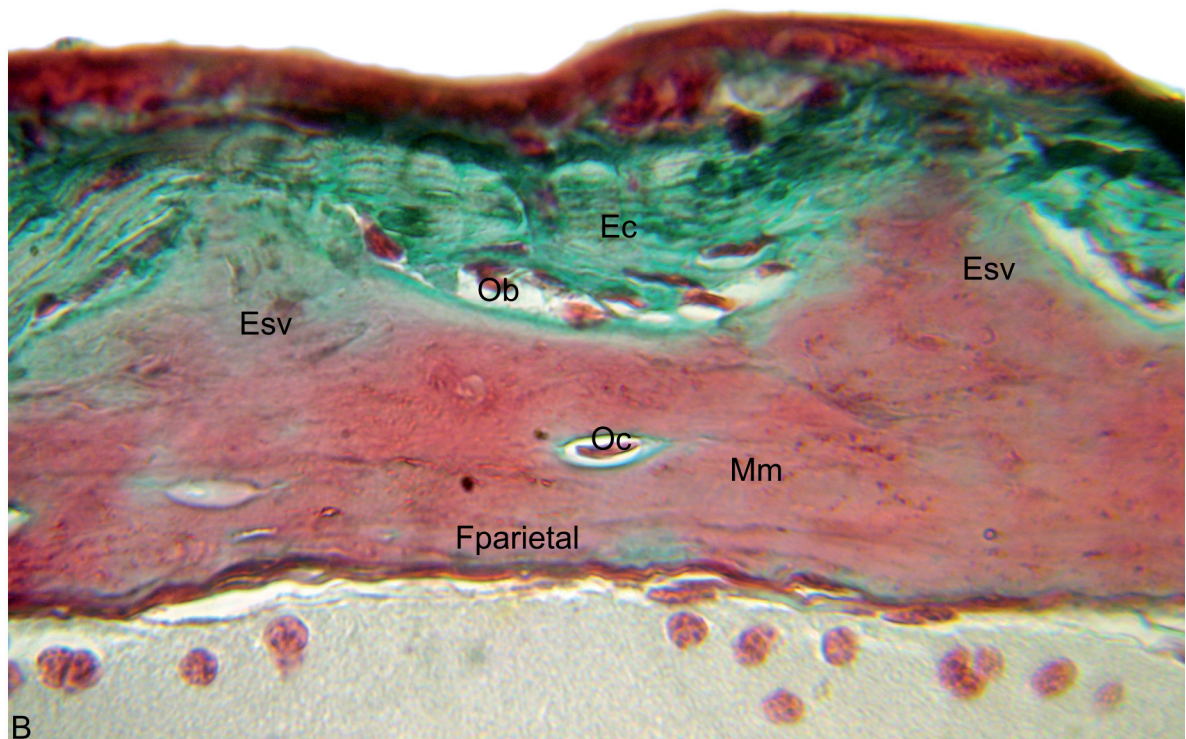
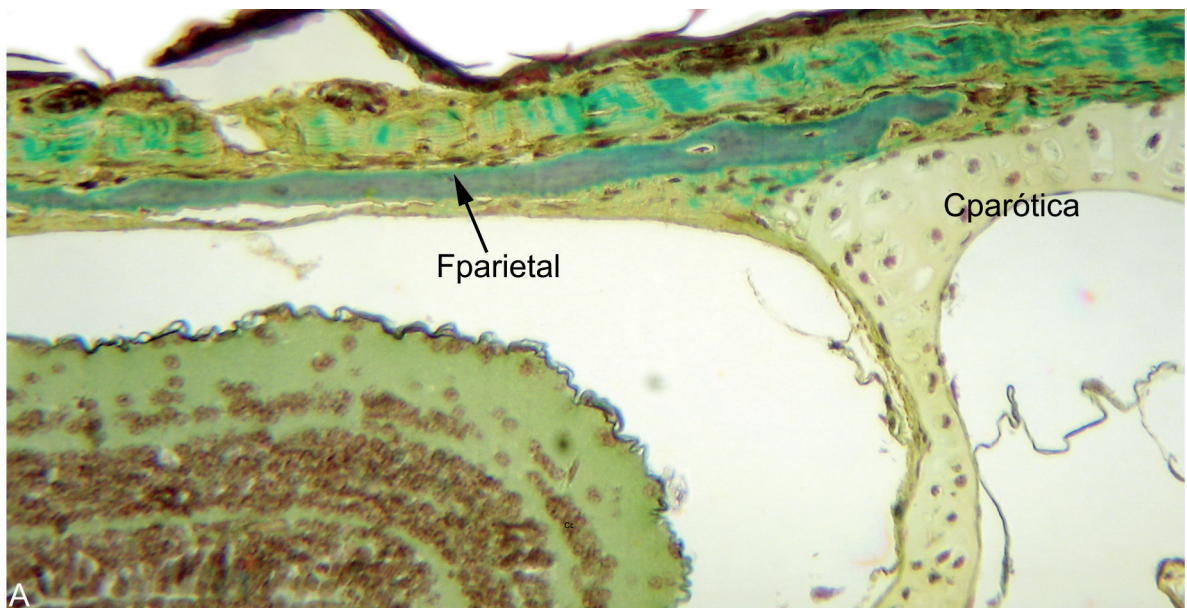


Figura 2. Cortes transversais de jovens de *Brachycephalus ephippium* evidenciando o osso frontoparietal (nível 1 da Fig. 1C). A- (CRC= 8,06 mm), tricrômio de Manson, aumento de aproximadamente 100x; B- (CRC= 9,10 mm), tricrômio de Gomori, aumento de aproximadamente 400x. Fparietal- frontoparietal; Cparótica- crista parótica; Ec- estrato compacto; Esv- espículas verticais; Ob- osteoblastos.

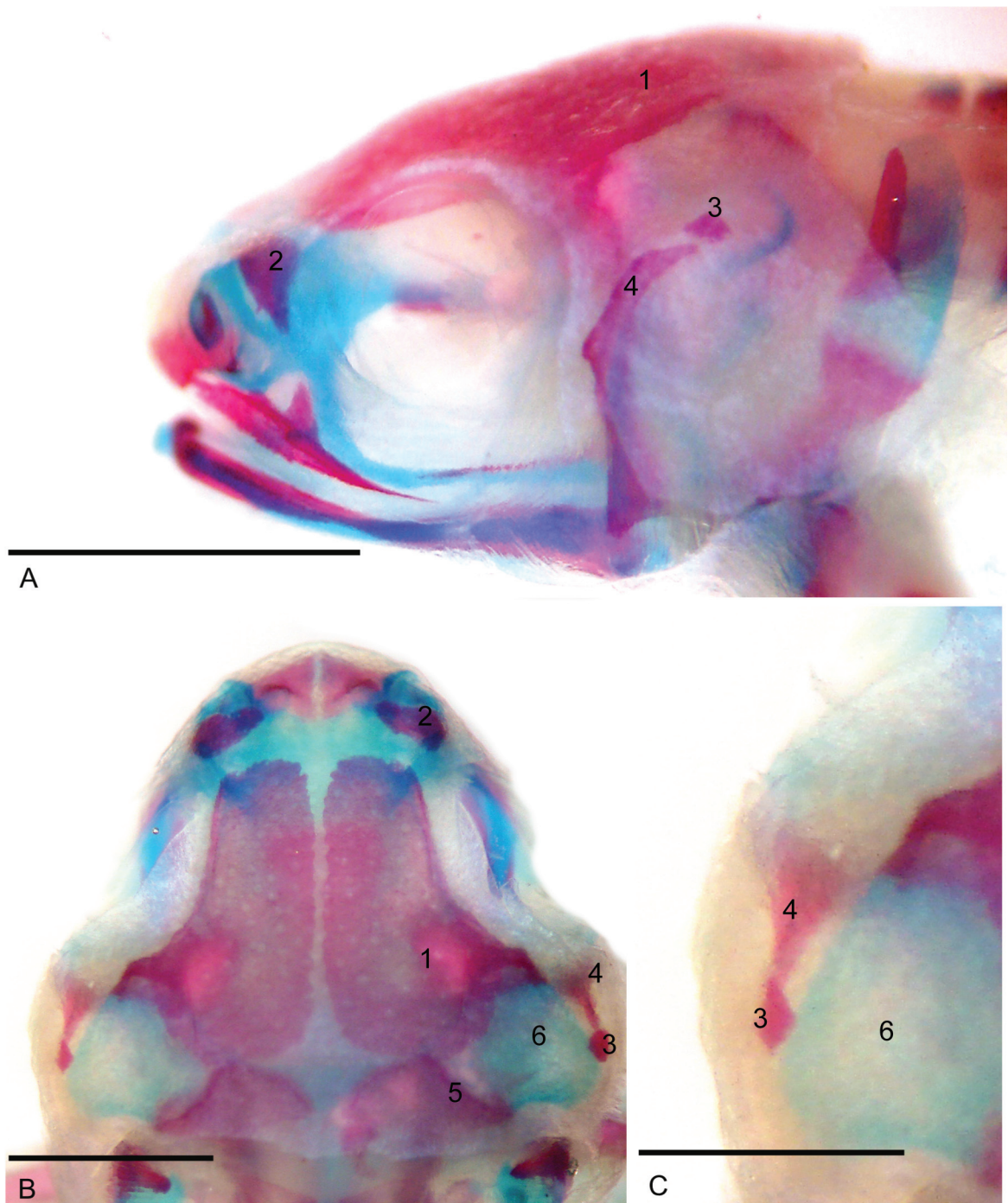


Figura 3. Espécime jovem de *Brachycephalus ephippium* (CRC = 8,08mm). A - Vista lateral. B e C- vista dorsal. 1- frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipital, 6- cápsula ótica. Barras equivalem a 1mm.

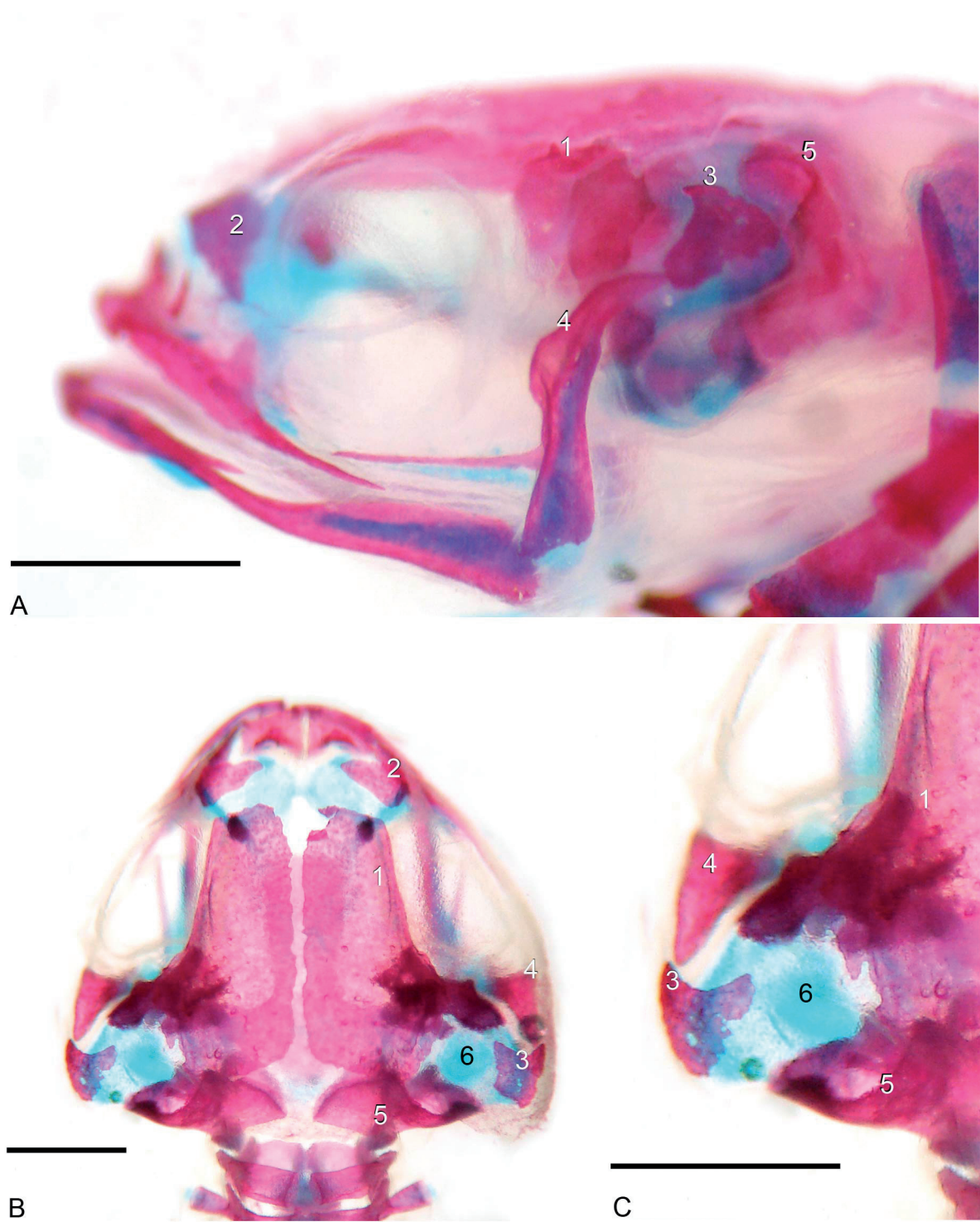


Figura 4. Jovem de *Brachycephalus ephippium* com CRC= 10,58mm. A - vista lateral. B e C vista dorsais. 1- Frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipital; 6- cápsula ótica. Barras equivalem a 1mm.

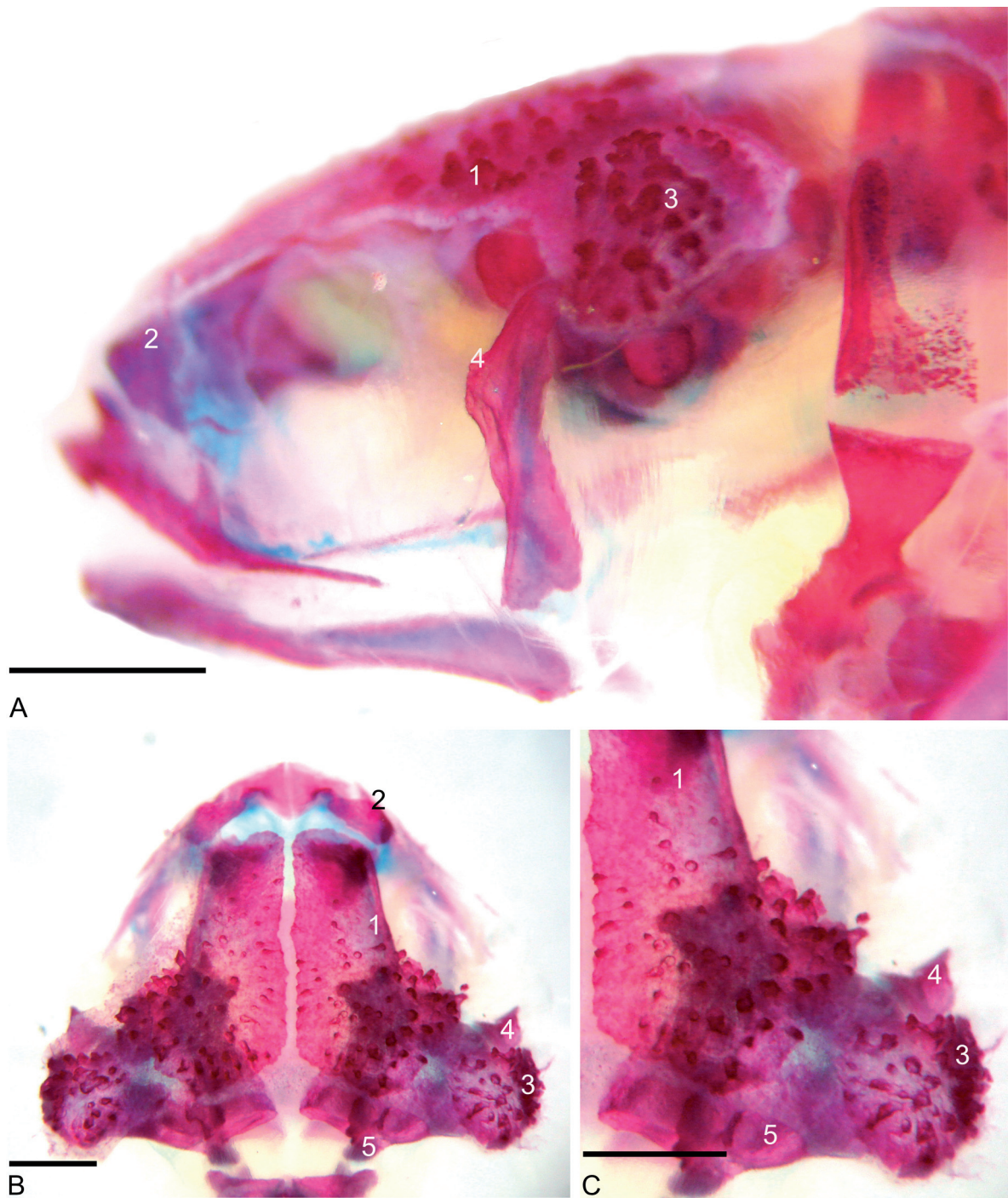


Figura 5. Jovem de *Brachycephalus ephippium* com CRC= 12,85mm. A - vista lateral. B e C vista dorsais. 1- Frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipital. Barras equivalem a 1mm.

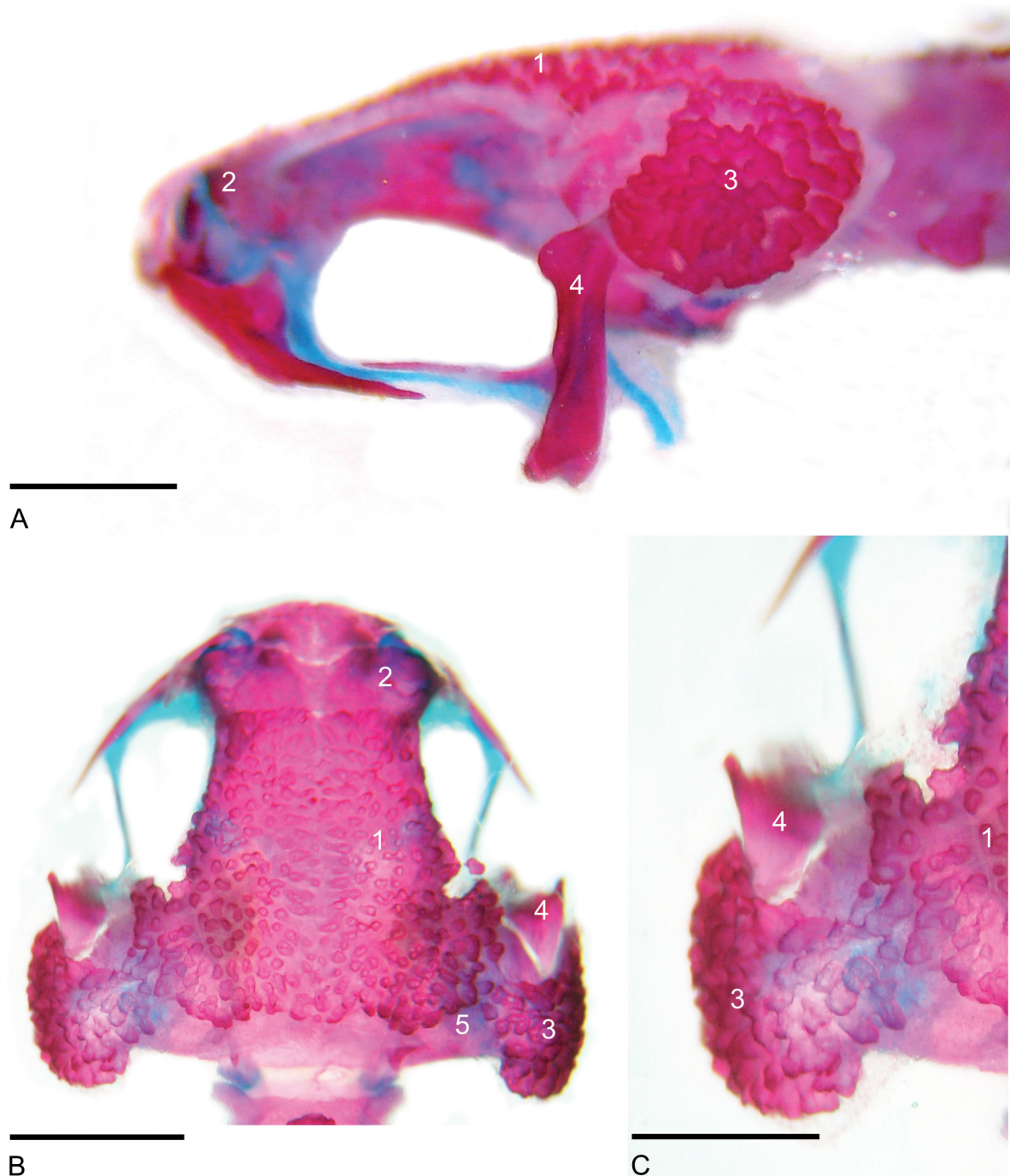


Figura 6. Jovem de *Brachycephalus ephippium* com CRC= 13,52mm. A- vista latera. B e C vistas dorsais. 1- Frontoparietal; 2- osso nasal; 3- placa parótica; 4- esquamosal; 5- exoccipitais. Barras equivalem a 1mm.

CAPÍTULO 2: ELEMENTOS DA REGIÃO AUDITIVA EM *BRACHYCEPHALUS* E SUA IMPORTÂNCIA PARA O MONOFILETISMO DO GÊNERO

INTRODUÇÃO

Talvez em nenhum outro grupo de tetrápodes a evolução para redução de tamanho corporal tenha resultado em tantos exemplos de padrões, aparentemente convergentes, de perda e/ou redução de elementos ósseos como nos anfíbios (Alberch, 1980; Alberch, 1981; Alberch e Gale, 1985; Trueb e Alberch, 1985; Yeh, 2002). A redução e ausência de estruturas morfológicas por vezes levam taxonomistas a diferentes opiniões sobre a composição de grupos de espécies miniaturizadas, graças as diferenças na forma de interpretação da ausência, seja como convergência ou como perda homóloga. Os menores anuros da América do Sul (*Atelopus*, *Brachycephalus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, *Oreophrynella*) por décadas foram alvos de discussões acerca de suas posições taxonômicas (ver histórico em McDiarmid, 1971). Nestes debates incluíram-se também os gêneros *Euparkerella* (Izecksohn, 1998) e *Truebella* (Graybeal e Cannatella, 1995).

No início dessa década, novas relações entre esses grupos foram propostas com base em análises que comparam uma grande diversidade de taxa, utilizando dados de seqüência de DNA (Darst and Cannatella, 2004; Frost *et al.*, 2006), que estariam livres dos efeitos das convergências morfológicas ligadas à miniaturização. Dentre os vários rearranjos taxonômicos propostos por estes trabalhos, destacamos o agrupamento de *Brachycephalus* com leptodactylídeos (*Eleutherodactylinae*). A hipótese de proximidade filogenética entre os gêneros *Brachycephalus* e *Euparkerella*, um gênero miniaturizado de leptodactylidae, já havia sido proposta por Izecksohn (1971; 1988). Posteriormente, essa hipótese ganhou algum suporte (Pombal *et al.*, 1998; Giaretta e Sawaya, 1998), até que recentemente foi corroborada por outros conjuntos de dados (Darst e Cannatella, 2004; Frost *et al.*, 2006).

Caso os resultados de Frost *et al.* (2006) sejam corroborados por outros conjuntos de evidências e passem a ser amplamente aceitos, a classificação dos anuros sofrerá um completo rearranjo, inclusive na família Brachycephalidae, que passaria a abrigar os gêneros *Adelophryne*, *Atopophrynus*, *Barycholos*, *Brachycephalus*, *Craugastor*, *Dischidodactylus*,

Eleutherodactylus, *Euhyas*, *Euparkerella*, *Geobatrachus*, *Holoaden*, *Oreobates*, *Pelorius*, *Phrynopus*, *Phyllonastes*, *Phyzelaphryne*, e *Syrrhophus*.

O monofiletismo da maioria desses gêneros ainda depende de confirmação, uma vez que nem todos foram incluídos nas análises de Frost *et al.* (2006). Por sua vez, o monofiletismo de *Brachycephalus* é suportado pela ausência de esterno, redução de dígitos, e ossificação completa da cartilagem epicoracóide e clavículas (Izecksohn, 1971; Ford e Cannatella, 1993). Um padrão similar de redução de dígitos tem sido usado como evidência para a hipótese de proximidade filogenética entre os gêneros *Adelophrhine*, *Euparkerella*, e *Brachycephalus* (Frost *et al.*, 2006). No entanto, um estudo comparativo dos padrões de redução de dígitos não foi realizado ainda, e a maioria do que é assumido para todo o gênero é baseado apenas em *B. ephippium*. Todas essas hipóteses recentes e rearranjos taxonômicos aumentam a importância e a necessidade de investigação desse grupo de anuros, a fim de identificar evidências do relacionamento desses grupos.

Durante as investigações sobre a osteologia do crânio de *Brachycephalus*, descobrimos um novo grupo de caracteres na região auditiva desse grupo. Embora a morfologia desta região já tenha sido descrita por McLachlan (1943), sua significância para a sistemática do grupo ainda não havia sido considerada, uma vez que à época, o gênero *Brachycephalus* era monotípico. O objetivo deste capítulo é descrever a osteologia da região auditiva das espécies do gênero *Brachycephalus*, comparando-a com outras espécies miniaturizadas, e avaliamos sua significância para a sistemática do grupo. Além disso, analisaremos os dados disponíveis na literatura acerca da redução de dígitos e re-avaliaremos sua importância para sistemática dos taxa envolvidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização e dupla coloração por Alcian Blue e Alizarina, e maceração, seguindo os mesmos procedimentos descritos no capítulo 1. Os espécimes analisados neste estudo (Apêndice 1) foram depositados nas seguintes coleções herpetológicas: Antonio Sebben, Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília (AS); Eugenio Izecksohn, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (EI); Coleção Herpetológica da

Universidade de Brasília, Departamento de Zoologia, Universidade de Brasília (CHUNB) e Museu Nacional - UFRJ, Departamento de Vertebrados (MNRJ). Utilizamos a nomenclatura osteológica apresentada em Duellman e Trueb (1986). Para facilitar as comparações, nos resultados incluímos um resumo da morfologia da região auditiva de anuros, baseado no texto de Duellman e Trueb (1986) e no estudo de Vorobyeva e Smirnov (1987). Para fórmula das falanges e contagem de dígitos, assumimos que nas mãos de anuros o dedo I foi perdido (*sensu* Alberch e Gale, 1985) e portanto, o dedo mais perto de prepólex é o dedo II.

RESULTADOS

O OUVIDO MÉDIO E EXTERNO DE *BRACHYCEPHALUS*

O teto da cavidade oral de todas as espécies examinadas de *Brachycephalus* não apresenta óstio faríngeo. Externamente, nenhum delas apresenta tímpano. Do ouvido médio estão ausentes também o anel timpânico e a columela. Em *Brachycephalus ephippium* de diferentes localidades amostradas, a placa parótica cobre lateralmente a região ótica (conforme descrito no capítulo 1).

No ouvido médio, na porção posterior da cápsula ótica, próxima à janela oval (Fig. 1A) tem forma circular e está coberta pelo opérculo, que é bastante ossificado (Fig. 1). Encontramos uma configuração similar em *B. bruneus*, *B. didactylus*, *B. ephippium* (de várias localidades), *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. cf. vertebralis* e *B. vertebralis*. Em todas essas espécies o opérculo apresenta uma forma cônica, apresentando uma projeção medial ossificada que se estende posteriormente (Fig. 1B). É nesse processo que o músculo opercular se origina (Fig. 2A e 2B). O grau de coloração por alizarina varia em algumas espécies, o que indica uma possível variação no grau de ossificação do opérculo.

Destaca-se ainda a posição da cápsula ótica e da crista parótica, que em *Brachycephalus* estão reorientadas em um ângulo de aproximadamente 45° em relação plano sagital do crânio. Como resultado, o ouvido médio (que em *Brachycephalus* é representado pelo opérculo e janela oval) é reorientado mais posteriormente do que lateralmente, do que em outros anuros (Fig. 1 e 2A). Este rearranjo tem como consequência um encurtamento da distância entre a janela oval e o forame da veia jugular (Fig. 1A). Podemos inferir que houve também um encurtamento relativo da distância entre o opérculo e a supra-escápula, com um

conseqüente encurtamento do músculo opercular.

A análise das fórmulas das falanges da mão e pé de *B. hermogenesi*, *B. nodoterga*, e *B. vertebralis* são apresentadas na Tabela 2, juntamente com os dados compilados de diversos autores.

Tabela 2- Fórmula das falanges da mão e do pé de espécies de *Adelophryne*, *Brachycephalus* e *Euparkerella*.

| Espécies | Fórmula da falange | | Referências |
|---------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | mão | pé | |
| <i>A. adiastrala</i> | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (da Silva e Meihardt 1999) |
| <i>B. alipioi</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-1 | (Pombal e Gasparini, 2006) |
| <i>B. brunneus</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-0 | (Ribeiro <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>B. didactylus</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | (Izecksohn 1971) |
| <i>B. ephippium</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-2 (1-2-3-4-1) ⁺ | (Alberch e Gale 1985, Izecksohn 1988) |
| <i>B. ferruginus</i> * | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | (Alves <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>B. hermogenesi</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-2 | Presente trabalho |
| <i>B. izecksohni</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-0 | (Ribeiro <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>B. nodoterga</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | Presente trabalho |
| <i>B. pernix</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-0 | (Pombal <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>B. pombali</i> * | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | (Alves <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>B. cf. vertebralis</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-1 | Presente trabalho |
| <i>E. brasiliensis</i> | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (Lynch 1971; Izecksohn 1988) |
| <i>E. cochranæ</i> , | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (Izecksohn 1988) |
| <i>E. robusta</i> , | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (Izecksohn 1988) |
| <i>E. tridactyla</i> | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-2 | (Izecksohn 1988) |

(*) indicam discrepâncias entre ilustrações e descrições presentes nos artigos e descrições originais;

(+) indica variações encontradas em algumas populações de *B. ephippium*.

DISCUSSÃO

O OUVIDO MÉDIO E EXTERNO DE ANUROS

A estrutura do aparato auditivo de anuros, exemplificada na imagem de *Barycholos ternetzi* (Fig. 2C), geralmente é composta por uma membrana timpânica que, por sua vez, é sustentada pelo anel timpânico. Este tem forma de cone e é formado por tecido cartilaginoso. Internamente, ligam-se ao tímpano um primeiro sistema de condução de som formado pela extracolumela (*pars externa plectri*) e columela (*pars media plectri*). Este sistema conduz as vibrações sonoras com frequências superiores a 1000 Hz para a cápsula ótica (Duellman e Trueb, 1986). A extremidade medial da columela se liga à janela oval (*fenestra ovalis*), por

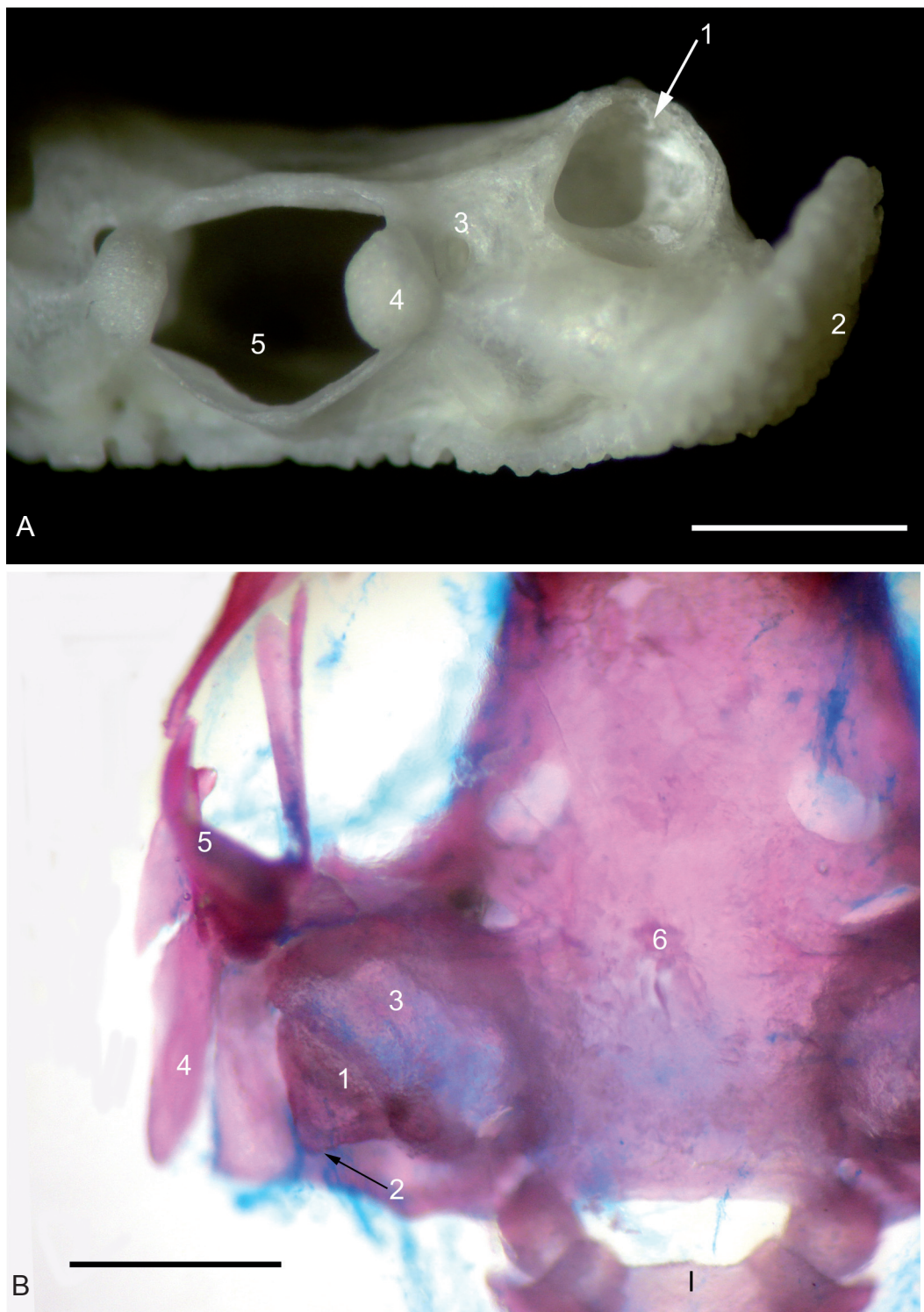


Figura 1. A-Vista posterior do crânio de *Brachycephalus ephippium*, em posição equivalente ao decúbito dorsal, de exemplar macerado: 1- Janela oval; 2- placa parótica; 3- forâme da veia jugular; 4- côneilo occipital; 5- forâme magno. B- Vista ventral de crânio diafanizado de *Brachycephalus pernix*: 1- Opérculo; 2- processo posterior; 3- cápsula ótica; 4- esquamosal; 5 quadradojugal; 6- paraesfenóide. Barras equivalem à 1mm.

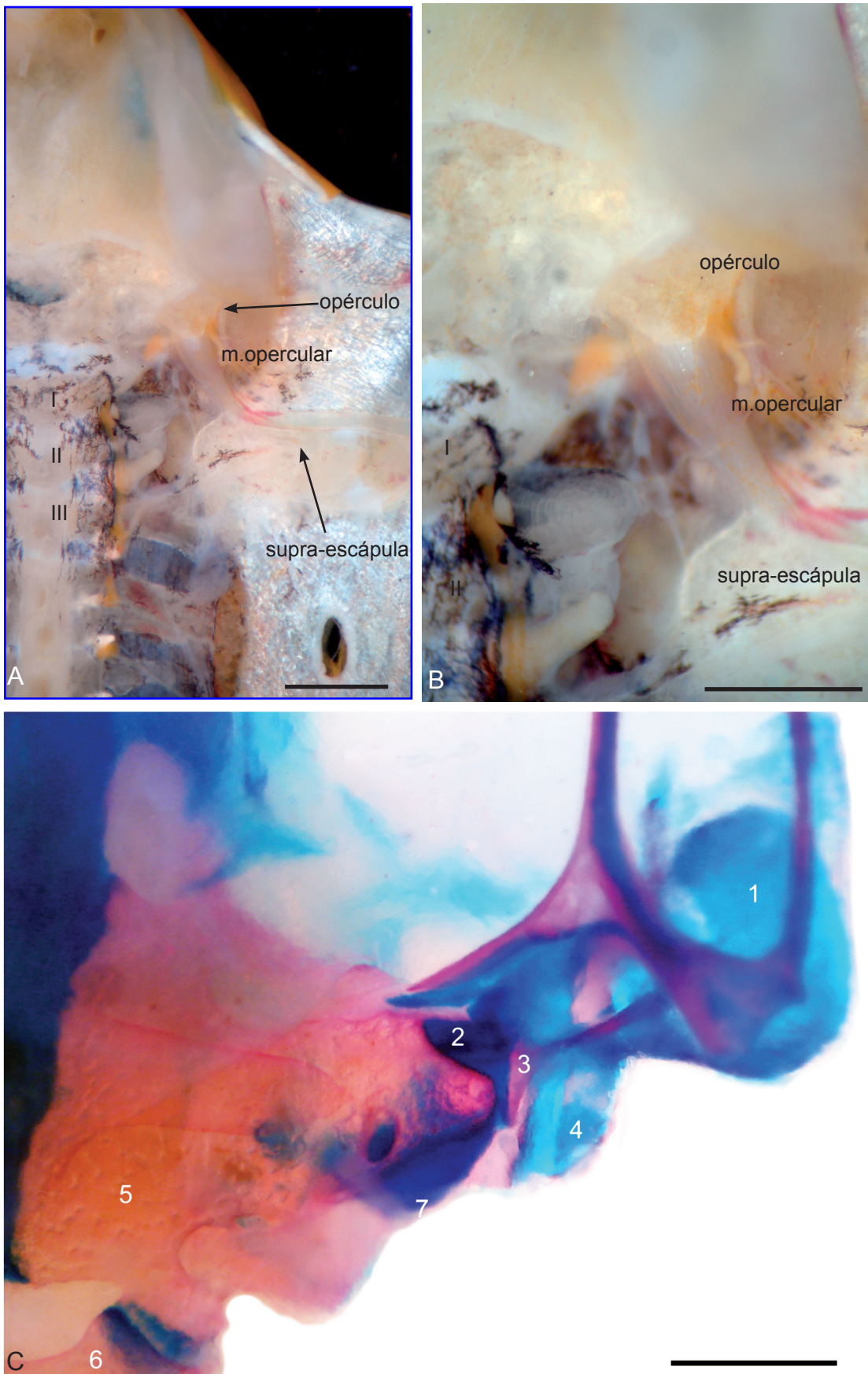


Figura 2. A e B- Vistas ventrais da região posterior do crânio e cintura escapular de Microdissecção *a fresco* *Brachycephalus ephippium*, evidenciando o sistema opérculo, m. escapular e supraescápula (deslocada). B- Vista ventral de exemplar diafanizado de *Barycholos ternetizi*: 1- Anel timpânico; 2- janela oval; 3- columela; 4- esquamosal; 5- exoccipital; 6- atlas.

onde as vibrações são conduzidas aos fluidos presentes no ouvido interno que, por sua vez, irão estimular a membrana basilar. Paralelamente a esse sistema de condução de vibrações aéreas, os anuros apresentam outras estruturas capazes de captar vibrações com frequências inferiores a 1000 Hz, provenientes do substrato. Deste sistema participa o opérculo, uma estrutura geralmente cartilaginosa que ocupa grande parte da janela oval, em posição adjacente à columela. Em anuros, o opérculo se conecta à supra-escápula através do músculo opercular (Vorobyeva e Smirnov, 1987). As vibrações sonoras seriam captadas pelos membros anteriores, conduzidas à supra-escápula, depois ao músculo opercular, e posteriormente para o opérculo. Do opérculo, as vibrações são transmitidas aos líquidos do ouvido interno, que estimulam a membrana basilar, exclusiva de anfíbios.

Existe uma relação entre o tamanho do tímpano e o tamanho da janela oval, onde o tímpano é relativamente maior do que a janela oval. Provavelmente esta diferença de tamanho é importante para o sistema de pareamento de impedância, que minimiza o efeito da diferença de impedância entre o ar e os fluidos do ouvido interno (Duellman e Trueb, 1986). Este padrão morfológico é comum à maioria dos anuros. No entanto, alguns poucos grupos apresentam perda ou redução de elementos do ouvido médio (Trueb e Alberch, 1985; Graybeal e Cannatella, 1995; Yeh, 2002; Roth *et al.*, 1992), incluindo *Brachycephalus* (McLachlan, 1943).

Adicionalmente, o ouvido médio apresenta ainda um sistema de equalização de pressão formado pelo tubo de Eustáquio, que conecta o ouvido médio à cavidade oral através de uma abertura no teto da boca, próximo à glote, conhecido como óstio faríngeo. Este sistema não está presente em bufonídeos de pequeno porte (McDiarmid, 1971; Graybeal e Cannatella, 1995), em *Brachycephalus* (McLachlan, 1943), em microhilídeos (Yeh, 2002) e em vários outros anuros que não apresentam ouvido médio (ver em Lombard and Straughan, 1974). Curiosamente, alguns pipídeos apresentam um único ostio faríngeo medial (Cannatella e Trueb, 1988).

Quando comparamos nossas observações da região auditiva das amostras de *Brachycephalus* aqui analisadas com as quatro recentes descrições de espécies de *Brachycephalus* (Ribeiro *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006) notamos uma discrepância. Em ambos os trabalhos os autores mencionam que as espécies lá descritas não possuem nenhum elemento do aparato auditivo relacionado ao ouvido médio (o que implicaria na ausência do opérculo). Tivemos a oportunidade de examinar um espécime diafanizado de *B. brunneus*,

e nesse espécime encontramos o opérculo com a forma similar às observadas nas demais espécies de *Brachycephalus*. Assim, decidimos por assumir que a configuração de ouvido médio que descrevemos nos resultados se aplicariam à todas espécies de *Brachycephalus*, e que as observações feitas pelos autores há pouco mencionados estão, possivelmente, equivocadas.

Funcionalmente, nossas descobertas sugerem que, embora exista o consenso de que a audição de vibrações conduzidas pelo ar ocorra *via* sistema tímpano-columela, e que o opérculo serviria apenas para captação de vibrações de baixa frequência (< 1000Hz), que se propagam pelo substrato (Duellman e Trueb, 1986; Vorobyeva e Smirnov, 1987), este não parece ser o caso das espécies de *Brachycephalus*. Segundo Pombal *et al.* (1994), *B. ephippium* emite vocalizações acima de 4000Hz. Sendo assim, na ausência do sistema tímpano-columelar, o sistema opérculo-braquial, através do m. opercular deve estar funcionando para conduzir vibrações de alta frequência para o ouvido médio. Esta sugestão por sua vez, poderia indicar que embora tenham perdido quase toda o ouvido médio, as espécies de *Brachycephalus* não seriam surdas.

A redução da distância entre o opérculo e a supra-escápula, resultante da rotação da cápsula ótica e janela oval, pode ser uma maneira de encurtar o caminho que o som deve percorrer até chegar no ouvido interno. Hetherington *et al.* (1986), propuseram que o sistema opercular poderia também funcionar conduzindo o som até o ouvido interno, em anuros que não possuem columela e tímpano.

A hipótese de audição *via* sistema opercular em *Brachycephalus* ainda precisaria ser testada. Futuramente devemos investigar se estruturas relacionadas ao ouvido interno de alguns braquicefalídeos apresentam mudanças em relação a outros anuros. Devemos investigar, ainda, os outros anuros que também não apresentam columela e tímpano, como alguns bufonídeos (*Truebella*, *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, *Oreophrynella*), e microilídeos. Se essas espécies realmente vocalizam, podemos usá-las como modelo para testar essas hipóteses.

A ausência da columela foi positivamente relacionada com a miniaturização (Yeh 2002). Considerando a hipótese filogenética e a classificação resultante apresentada por Frost *et al.* (2006), na qual a maioria dos taxa com perda e/ou redução de elementos do ouvido médio estão distantemente relacionados na árvore, somos obrigados a assumir que a perda de

elementos do ouvido médio evoluiu independentemente. Note que os grupos irmãos dos taxa que perderam elementos do ouvido médio, apresentam aparato auditivo completo. A evolução de tamanhos de corpos pequenos pode limitar o desenvolvimento dessas estruturas (Hanken e Wake, 1993, Yeh, 2002).

Podemos ainda nos atentar às limitações mecânicas que devem atuar, impondo limites referentes às relações entre os tamanhos dos componentes do aparato auditivo (Duellman e Trueb, 1986). À medida que os anuros tornaram-se menores ao longo do processo evolutivo, estabeleceu-se um limiar de tamanho relativo do corpo, da janela oval, do tímpano e da columela, que possibilitaria a condução do som com eficiência. Portanto, deve haver um limite de tamanho de corpo, capaz de comportar um sistema tímpano-columelar em condições de conduzir o som adequadamente. Quando o som percorre meios com diferentes densidades, no caso o ar e os fluidos da cápsula ótica, ocorre perda de energia devido a maior impedância (resistência à condução do som) do meio líquido. Para compensar essa perda de energia, a área do tímpano deve ser um tanto maior que a área transversal da columela para que o som sofra um aumento de amplitude, compensando a perda de amplitude que ocorrerá na cápsula ótica.

A seleção natural para a eliminação do sistema tímpano-opercular e a interrupção do desenvolvimento em um ponto no qual apenas o opérculo é formado (o opérculo é formado em um período bem anterior ao que a columela e tímpano são formados; Vorobyeva e Smirnov, 1987), podem ter sido mecanismos importantes para a evolução deste tipo de padrão morfológico do aparato auditivo (Alberch *et al.*, 1979, Yeh, 2002). No entanto, estas possibilidades devem ser testadas experimentalmente e estatisticamente em um contexto filogenético.

As descobertas desse capítulo têm alguma importância no estabelecimento das relações de *Brachycephalus*. Pela primeira vez, desde que o gênero foi criado, um grupo de caracteres morfológicos, além de redução de falanges (Izecksohn, 1971, Alberch e Gale, 1995) e fusão de elementos da cintura escapular (Izecksohn, 1971), está sendo apresentado como corroboração do monofiletismo do gênero. Sendo assim, este trabalho propõe que a) a rotação relativa da cápsula ótica que resulta na orientação posterior da janela oval, e b) o fechamento completo da janela oval pelo opérculo, e c) a presença de um processo posterior desenvolvido no opérculo, onde o músculo opercular se origina, são todos caracteres únicos

para o gênero *Brachycephalus* e portanto suportam seu monofiletismo.

Baseando-se nas observações das descrições originais das espécies que pertencem ao gênero *Adelophryne*, nota-se que todas elas apresentam tímpano e aparato auditivo completo (Hoogmoed e Lescure, 1984; Hoogmoed *et al.*, 1994). Embora não tenha sido possível acessar esqueletos de *Euparkerella*, o exame de espécimes intactos de *E. cochrane*, *E. robusta* e *E. tridactyla* mostram que estas espécies não apresentam tímpano, nem anel timpânico, ostio faríngeo, tão pouco tuba de Estáquio. Com base na ilustração do crânio de *E. brasiliensis* feita por Lynch (1971: Figura 100) é possível observar que nesta espécie a janela oval mantém a posição lateral e o opérculo não a cobre completamente. Alguns dos estados presentes em *Euparkerella* (perda da maioria dos elementos do ouvido médio) podem servir como evidência de proximidade filogenética entre esses gêneros.

A recente proposta de que *Adelophryne* e *Euparkerella* são filogeneticamente próximos à *Brachycephalus* foi baseada em similaridades do padrão de perda de dígitos (Frost *et al.*, 2006). A única espécie do gênero *Adelophryne* cuja descrição osteológica da mão e do pé estão disponíveis é *A. adisotola* (da Silva e Meihardt, 1999). Nessa espécie, a única redução presente de dígitos presentes na mão ocorre no dedo V, com a perda de uma falange, não havendo perda de falanges no pé. No gênero *Euparkerella* existem informações para *E. brasiliensis* (Lynch, 1971; Izeckson, 1988) e *E. cochrae*, *E. robusta*, e *E. tridactyla*, (Izecksohn, 1988). Todas essas espécies apresentam apenas a perda de uma falange no dedo V da mão (fórmula 2-2-3-2). *E. tridactyla* apresenta ainda a perda de uma falange no artelho V no pé (fórmula 2-2-3-4-2), enquanto as demais espécies desse gênero apresentam a fórmula 2-2-3-4-3 para os artelhos.

A descoberta de novas espécies contribuiu para o aumento do conhecimento sobre a variabilidade de fórmulas de falanges de dedos e artelhos dentro do gênero *Brachycephalus*, no entanto a literatura é um tanto confusa e equivocada. Alguns artigos descrevem textualmente uma configuração mas apresentam ilustrações com outra. Depois de três anos debruçando-se na osteologia desse grupo, percebe-se o quanto é fácil cometer erros como mover acidentalmente uma minúscula falange do dedo ou artelho de um *Brachycephalus*, durante as preparações osteológicas. Além disso, houve caso em que falanges terminais de um apêndice não apareciam, por estar pouco calcificada, enquanto que a equivalente, do outro apêndice, era plenamente visualizável (Fig. 3). Sendo assim, assumimos que as discrepâncias

entre texto e figuras encontradas nos artigos de descrição sejam frutos desses tipos de ocorrências.

A partir do exame direto de espécimes diafanizados e da literatura, incluindo algumas das descrições originais, notamos que a fórmula das falanges da mão aparenta ser conservativa dentro do gênero *Brachycephalus* e diferente das encontradas nos gêneros *Adelophyne* e *Euparkerella* (Tab. 2). Adicionalmente, a perda de uma falange no dígito cinco parece ser mais uma sinapomorfia do gênero.

Variações no número de falanges dos dedos, seguem um padrão mais complexo e podem ser outro indicativo de grupos monofiléticos de espécies dentro de *Brachycephalus*. Somente uma análise filogenética com a inclusão de um grupo de dados maior poderia elucidar a existência de tais grupos. É importante registrar que a variação encontrada na morfologia dos dígitos não corrobora a proximidade filogenética entre *Brachycephalus* e *Adelophyne* ou *Euparkerella* como sugerido por Frost *et al.* (2006). Serão necessárias ainda novas investigações para elucidar a posição de *Brachycephalus* dentro de Brachycephalidae.



Figura 3. Vista palmar dos pés direito (A) e esquerdo (B) de *Brachycephalus hermogenesi*. Setas indicam falanges não ossificadas no pé esquerdo, cujos correspondentes no pé direito estão completamente ossificadas.

CONCLUSÕES GERAIS

As placas espinhais, paravertebrais e a placa parótica, encontradas no gênero *Brachycephalus* são estruturas com desenvolvimento individualizado, para as quais atribuímos o status de ossos ordinários não metaplásicos. As análises anatômicas fornecem evidências de que o processo de formação das placas espinhais e para-vertebrais pode ser análogo aos mecanismos que promovem a formação da carapaça de Testudines. No entanto, para comprovar essa hipótese deve-se adotar estratégias experimentais, o que não foi possível neste trabalho.

A rotação relativa da cápsula ótica que resulta na orientação posterior da janela oval, o fechamento completo da janela oval pelo opérculo, a presença de um processo posterior medial desenvolvido no opérculo, a fórmula falangeal 1-2-3-1 para a mão e a perda de uma falange no artelho I do pé são todos caracteres únicos do gênero *Brachycephalus* e portanto suportam seu monofiletismo.

A morfologia das falanges da mão e do pé não suportam a proximidade filogenética entre *Brachycephalus* e outros gêneros miniaturizados como *Euparkerella* e *Adelophryne*

Os diferentes padrões de tamanho, forma, presença e ausência das placas ósseas, assim como os diferentes padrões de perda de falanges do gênero *Brachycephalus* são indícios de que existem grupos monofiléticos dentro do gênero. Somente uma análise filogenética, com o uso de dados de naturezas diferentes, podem comprovar a existência desses grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALBERCH P., GALE, E.A. 1985. A developmental analysis of an evolutionary trend: digital reduction in amphibians. *Evolution*, 39(1), 8–23.
- ALBERCH P., GOULD, S.J., OSTER, G.F., WAKE, D.B. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, 5(3), 296–317.
- ALBERCH P. 1980. Ontogenesis and morphological diversification. *American Zoologist*, 20, 653–667.
- ALBERCH, P. 1981. Convergence and parallelism in foot morphology in the neotropical salamander genus *Bolitoglossa*. *Evolution*, 35(1), 84–100.
- ALVES, A. C. R., RIBEIRO, L. F., HADDAD, C. F. B., REIS S. F. 2006. Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná state, Southern Brazil. *Herpetologica*, 62(2), 221–233.
- BOLT, J. R. 1977. Dissorophoid relationships and ontogeny, and the origin of the Lissamphibia. *Journal of Paleontology*. 51 (2): 235-249.
- BLOMM, W., FAWCETT, D. W. 1975. Tratado de Histologia. Rio de Janeiro: Iteramericana. 940pp.
- CHUNG, K. S., PARK, H. H., TING, K. TAKITTA, H., APTE, S. S., KUBOKI, Y., NISHIMURA, I. 1995. Modulated expression of type X collagen in the Menckel's cartilage with different developmental fates. *Developmental Biology*, 170: 387-396.
- DA SILVA, H. R. & MEINHARDT D.J. 1999. The generic status of *Adelophryne tridactyla*: osteology, synonymy, and comments on the genus *Syncope* (Anura: Microhylidae). *Journal of Herpetology*, 33(1), 159–164.
- DARST, C. R., CANNATELLA, D. C. 2004. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 462-475.
- DILKES, D., BROWN, L. E. 2006. Biomechanics of the vertebrae and associated osteoderms of the Early Permian amphibian *Cacops aspidephorus*. *Journal of Zoology* 2006: 1-12.
- DUELLEMAN, W.E, TRUEB, L. 1986. Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill Book Company. 696pp.
- FORD L. S., CANNATELLA, D. C. 1993. The major clades of frogs. *Herpetological Monographs*,

(7), 94–117.

- FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R.H., HAAS, A., HADDAD, C. F. B., DE SA, R. O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S. C., RAXWORTHY, C. J., CAMPBELL, J. A., BLOTTO, B. L., MOLER, P., DREWES, R. C., NUSSBAUM, R. A., LYNCH, J. D., GREEN, D. M., WHEELER, W.C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1–370.
- FUTUYMA, D. J. 1986. *Biologia evolutiva*. Ribeirão Preto. Funpec-editora. 631p
- GIARETTA, A.A. SAWAYA, R.J., 1998. Second species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae). *Copeia* 1998: 985-987.
- GILBERT, S. F. 2006. *Developmental Biology*. Sinauer, 785 pp.
- GILBERT, S. F., LOREDO, G. A., BRUKMAN, A., BURKE, A. C. 2001. Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. *Evolution & Development* 3(2): 47-58.
- GRAYBEAL, A., CANNATELLA, D. C. 1995. A new taxon of Bufonidae from Peru, with descriptions of two new species and a review of the phylogenetic status of supraspecific Bufonid Taxa. *Herpetologica*, 5(2), 105–131.
- HAINES, R. W., MUHUDDIN. 1968. Metaplastic bone. *Journal of Anatomy*, 103 (3): 527-538.
- HANKEN, J., WAKE, D. B. 1993. Miniaturization of body size: organismal consequences and evolutionary significance. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 501-519.
- HAY, O. P. 1898. On protostega, the systematic position of dermochelys, and the morphogeny of the chelonian carapace and plastron. *The American Naturalist*, 32 (384): 929-948.
- HETHERINGTON, T. E., JASLOW, A. P., LOMBARD, R. E., 1986. Comparative morphology of the amphibian *opercularis* system: I. General design features and functional interpretation. *Journal of Morphology*, 190(1), 43–61.
- HEYER, W. R., RAND, A.S., CRUZ, C. A. G. PEIXOTO, O.L. NELSON, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31: 231-410.
- HOOGMOED, M. S., BORGES, D. M., & CASCON, P. (1994) Three new species of the genus *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. *Zoologische Medelingen*, Leiden 68: 271–300.
- HOOGMOED, M. S. & LESCURE, J. 1984. A new genus and two new species of minute leptodactylid frogs from northern South America, with comments upon *Phyzelaphryne*

- (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Zoologische Mededelingen*, 58(6), 85–115.
- IZECKSOHN, E., 1971. Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional, Zoologia* 280: 1-12.
- IZECKSOHN, E., 1998. Algumas considerações sobre o gênero *Euparkerella*, com a descrição de três novas espécies (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 48(1): 59-74.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 1990. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. 388p.
- KAPLAN, M. 2002. Histology of the anteroventral part of the breast-shoulder apparatus of *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae) with comments on the validity of the genus *Psyllopryne* (Brachycephalidae). *Amphibia-Reptilia* 23: 225-227.
- LEIBEL, W. 1976. The influence of the otic capsule in ambystomid skull formation. *Journal of Experimental Zoology* 47: 85-103.
- LEVRAT-CALVIAC, V., ZYLBERBERG, L. 1986. The Structure of the Osteoderms in the Gekko: *Taren tola Mauritanica*. *The American Journal of Anatomy* 176: 437-446.
- LYNCH, J. D. (1971) Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Miscellaneous Publications, Museum of Natural History, The University of Kansas* (53), 1–238.
- LYNCH, J. D. 1973. The transition from archaic to advanced frogs. Pp. 133-182 *In*: Evolutionary Biology of the anurans: Contemporary Research on Major Problems. (Ed.) VIAL, J. L., Columbia, University of Missouri Press. 470pp.
- MCDIARMID, R. W. 1971. Comparative morphology and evolution of frogs of the neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *Oreophrynella*. *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History Science* 1: 1-66.
- MCLACHLAN, P. (1943) The Cranial and visceral osteology of the Neotropical Anuran *Brachycephalus ephippium* Spix. *South African Journal of Science* 49: 164–195.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. 1920. Os brachycephalídeos do Museu Paulista. *Revista do Museu Paulista* 12: 306-318.
- O' LEARY, M. A., ROBERTS, E. M., HEAD, J. J., SISSOKO, F. BOUARÉ, M. L. 2004. Titanosaurian (Dinosauria: Sauropoda) remains from the “continental interclaire” of Mali. *Journal of*

- Vertebrate Paleontology*, 24(4): 923-930.
- POMBAL, J.P., JR. 2001. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 22: 179:185.
- POMBAL JR., J. P., GASPARINI, J. L. (2006) A new *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Rainforest of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 1(2), 87–93.
- POMBAL JR., J. P., SAZIMA I, & HADDAD, C. F. B. (1994) Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 28(4), 516–519.
- POMBAL, J.P., JR. WISTUBA, E.M., BORNSCHEIN, M. R. 1998. A new species of brachycephalid (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Herpetology* 32:70-74.
- RIBEIRO, L.F., ALVES, A. C. R., HADDAD, C. F. B., REIS, S. F. 2005. Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the state of Paraná, southern Brazil (Amphibia: Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional, Zoologia* 519: 1-18.
- ROMER, A. S. 1956. Osteology of Reptiles. University of Chicago Press. 722 pp.
- ROTH, G., DICKE, U., NISHIKAWA, K. 1992. How do Ontogeny, morphology, and physiology of sensory systems constrain and direct the evolution of amphibians? *The American Naturalist* 139: 105–124.
- RUIBAL, R., SHOEMAKER, V. 1984. Osteoderms in anurans. *Journal of Herpetology* 18: 313-328.
- SCHEYER, T. M., SANDER, P. M. 2004. Histology of Ankylosaur osteoderms: implications for systematics and function. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 24(1): 874-893.
- SMITH, H. M. 1960. Evolution of chordate structure. Holt, Reinhart, and Winston, New York. 529 pp.
- STRAHM, M. H., SCHWARTZ, A. 1977. Osteoderms in the Anguid lizard subfamily Disploglossinae and their taxonomic importance. *Biotropica* 9(1): 58-72.
- TAYLOR, W. R., VAN DYKE, G. C. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9: 107-119.
- THOMSON, K. S. 1993. Segmentation, the adult skull, and the problem of homology. Pp. 36-68 *In: The skull volume 2: Patterns of structural and systematic diversity.* (Ed.) Hanken, J. Hall, B. K. Chicago. The University of Chicago Press. 566pp.

- TRUEB, L. 1973. Bones, frogs and evolution. Pp.64-132 *In: Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems.* (Ed)Vial, J. L., Columbia. University of Missouri Press. 470pp.
- TRUEB, L. & ALBERCH, P. 1985. Miniaturization and the anuran skull: a case study of heterochrony. 113–121 *In* H. R. Duncker and G. Fleischer, (Eds). *Functional Morphology of the Vertebrates.* Gustav Fischer Verlag, New York.
- TRUEB, L. 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. Pp. 255-343 *In: The skull volume 2: Patterns of structural and systematic diversity.* (Ed.) Hanken, J. Hall, B. K. Chicago. The University of Chicago Press. 566pp.
- VICKARYOUS, M. K., HALL, B. K. 2006. Osteoderm morphology and development in the Nine-Banded Armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Mamalia, Xenartha, Cingulata). *Journal of Morphology* 267: 1273-1283.
- VOROBYEVA, E. & SMIRNOV, S. 1987. Characteristic features in the formation of anuran sound-conducting systems. *Journal of Morphology* 192(1): 1–11.
- YEH, J. 2002. The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution* 56: 628-641.
- ZILBERBERG, L., CASTANET, J. 1985. New data on the structure and growth of the osteoderms in the reptile *Anguis fragilis* L. (Anguidae, Squamata). *Journal of Morphology* 186: 327-342.
- ZYLBERBERG, L., WAKE, M. H. 1990. Structure of the scales of *Dermophis* and *Microcaecilia* (Amphibia: Gymnophiona), and a comparison to dermal ossifications of other vertebrates. *Journal of Morphology* 206: 25-43

APÊNDICES

APÊNDICE 1- ESPÉCIMES EXAMINADOS NO PRESENTE TRABALHO.

Brachycephalus didactylus– Sacra Família do Tingua, Rio de Janeiro, Brasil: EI 5011-5012.

Brachycephalus ephippium jovens:– Cotia, São Paulo, Brasil: AS00424, AS00440, AS00441, AS00448, AS00494, AS00495; Atibaia, São Paulo, Brasil: AS00468, AS00502, AS00509, AS02502-02505

Brachycephalus ephippium adultos: Cotia, São Paulo, Brasil: AS00424, AS00446, AS00452, AS00466, AS00482, AS00484, AS00485, AS00491, AS00492, AS00496, AS00502, AS00517, AS00521, AS00524, AS00599, AS00602, AS00603, AS01511, AS01513;

Atibaia, São Paulo, Brasil: AS00455, AS00447, AS00474, AS00510, AS00511; AS02542-02550;

Itamonte, Minas Gerais, Brasil: AS02428-02437, AS02496, AS02506-02517;

Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil: AS02439-02450;

Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil: AS02451-02458, AS02499, AS02500, AS02518-02527.

Brachycephalus sp1 – Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil: AS02417-02427, AS02438;

Brachycephalus hermogenesi – Ubatuba, São Paulo, Brasil: AS02460;

Brachycephalus nodoterga – Biritiba Mirim, São Paulo, Brasil: CHUNB 37676;

Brachycephalus cf. *vertebralis* – Morro Corcovado, Ubatuba, São Paulo, Brasil: AAG 000841, AAG001572, AAG001616, AAG001620, AAG001918;

Brachycephalus sp2 – Fazenda Capricônio, Ubatuba, São Paulo, Brasil: AAG 001693, AAG001788, AAG001791, AAG001793, AAG001809, AAG001942, AAG001948, AAG001950, AAG001952, AAG001957;

Brachycephalus vertebralis – Parati, Rio de Janeiro, Brasil: MNRJ 11102-11105;

Brachycephalus pernix – Quatro Barras, Paraná, Brasil: AS02399, AS02401, AS02459;

Brachycephalus bruneus – Campina Grande do Sul, Paraná, Brasil: AS02462;

Euparkerella brasiliensis – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: EI 585, 1195, 4259.

Euparkerella cochranæ – Magé, Rio de Janeiro, Brasil: EI 7280, 7699.

Euparkerella robusta – Mimoso do Sul, Espírito Santo, Brasil: EI 1993, 7284.

Euparkerella tridactyla – Santa Tereza, Espírito Santo, Brasil: EI 7254, 7259.



The auditory region of *Brachycephalus* and its bearing on the monophyly of the genus (Anura: Brachycephalidae)

HÉLIO RICARDO DA SILVA¹, LEANDRO AMBRÓSIO CAMPOS² & ANTONIO SEBBEN³

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Caixa Postal 74524, Cep 23.851-970, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: helio@ufrj.br

²Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia – Universidade de Brasília – UnB 70910-900 - Brasília, DF, Brazil. E-mail: leandro.ambrosio@gmail.com

³Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas, CFS-IB – UnB 70910-900 - Brasília, DF, Brazil. E-mail: sebben@unb.br

Abstract

We surveyed the morphology of the auditory region of members of the anuran genus *Brachycephalus*. The sample included seven of the eleven known species; in addition, *Brachycephalus ephippium* and *B. vertebralis* were each represented by several specimens from different localities. All species lack a tympanum, tympanic annulus, stapes, and Eustachian tube. However, the operculum and the *m. opercularis* remain. The large operculum bears a robust process for the *m. opercularis* and covers most of the fenestra ovalis. The auditory apparatus of *Brachycephalus* is distinguished by the large size and the orientation of the fenestra ovalis, which faces posterior, rather than lateral. The morphology of these structures is compared to those of other minute brachycephalid frogs considered to be close relatives of *Brachycephalus*, and the importance of these characters as evidence of the monophyly of the genus is discussed. We also discuss the importance of other morphological features cited to support close relationships among small-sized brachycephalids, and consider the role of miniaturization in generating convergent pattern of loss of morphological features.

Key words: digit reduction, middle ear, miniaturization, ostia pharyngea, *tympanic annulus*, stapes, systematics

Introduction

In perhaps no other group of tetrapods has the evolution of small size resulted in so many apparently convergent losses and/or reductions of osteological elements as has occurred among extant amphibians (Alberch 1980; Alberch and Alberch 1981; Alberch and Gale 1985; Trueb and Alberch 1985; Yeh 2002). In anurans, the effects of miniaturization (Hanken and Wake 1993) are noticeable in parts of the skull (Trueb and Alberch 1985, Yeh 2002), fingers, and toes (Alberch and Gale 1985, Estrada and Hedges 1996). Occasionally, reduction and absence of elements have confused anuran systematists; there are different interpretations of relationships of minute species depending upon whether an absence has been treated as a convergent character or homologous loss. Such is the case of several of the smallest Neotropical anurans—members of the genera *Atelopus*, *Brachycephalus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, and *Oreophrynella*—the taxonomic relationships of which have been debated for decades (e.g., MacDiarmid 1971). More recently, this debate also grew to include *Euparkerella* (Izecksohn 1988) and *Truebella* (Graybeal and Cannatella 1995).

The recent application of DNA-sequence data for large numbers of lissamphibian taxa has produced new schemes of relationships, which seemingly are independent of the effects of morphological convergences resulting from the process of miniaturization (Darst and Cannatella 2004; Frost *et al.* 2006). Among the many new clades (and proposed taxonomic rearrangements), both analyses revealed *Brachycephalus* to be nested

within direct-developing leptodactylids. The position of *Brachycephalus* among anurans has always been controversial (Noble 1931; Griffiths 1963; Izecksohn 1971; McDiarmid 1971; Ananias *et al.* 2006). However, the hypothesis that this genus may be closely related to the small leptodactylids of the genus *Euparkerella* first was suggested by Izecksohn (1971; 1988) and later supported by Pombal *et al.* (1998) and Giaretta and Sawaya (1998); recently, it was corroborated by Darst and Cannatella (2004) and Frost *et al.* (2006).

If the results of Frost *et al.* (2006) are corroborated by independent lines of evidence and become widely accepted, then anuran classification will be profoundly changed. Particularly relevant to this study is their partitioning of Leptodactylidae into seven families and the redefinition of Brachycephalidae to include the following genera: *Adelophryne*, *Atopophrynus*, *Barycholos*, *Brachycephalus*, *Craugastor*, *Dischidodactylus*, *Eleutherodactylus*, *Euhyas*, *Euparkerella*, *Geobatrachus*, *Holoaden*, *Oreobates*, *Pelorius*, *Phrynopus*, *Phyllonastes*, *Phyzelaphryne*, and *Syrrhophus*. The monophyly of most of these genera remains to be established, because many were not included in the analysis of Frost *et al.* (2006). A monophyletic genus *Brachycephalus* is supported by the presence of digital reduction, the absence of a sternum, and the complete ossification of the epicoracoid cartilages and synostosis with the coracoids and clavicles (Izecksohn 1971; Ford and Cannatella 1993). Frost *et al.* (2006) hypothesized a close relationship among *Adelophryne*, *Euparkerella*, and *Brachycephalus* based on a similar pattern of digit reduction; however, there are no comparisons of digital reduction in the literature, and most of what is assumed for the genus is based on *B. ephippium*, the only known species for many years. The emergence of these recent hypotheses and taxonomic rearrangements that may result from them, emphasize the need for more thorough investigation of this group of anurans to resolve their relationships.

As part of a review of the skeletal morphology of species of *Brachycephalus*, we discovered a new set of characters relating to the auditory region of these anurans. Although the morphology of this region of *B. ephippium* was thoroughly described by McLachlan (1943), its significance to the systematics of the group never has been appreciated, possibly because only a single species, the only one known at the time, was included. Herein we describe the otic region of species of *Brachycephalus*, compare it to that of other minute frogs, and evaluate its significance to the systematics of the genus. We also reevaluate the available information on digital reduction and its importance to the systematics of the taxa involved.

Material and methods

Observations of bone and cartilage were made on cleared-and-stained whole specimens and dry skeletons. The specimens examined for this study (Appendix) are deposited in the following herpetological collections: Antonio Sebben, Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília (AS); Eugenio Izecksohn, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (EI); Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília, Departamento de Zoologia, Universidade de Brasília (CHUNB) e Museu Nacional – UFRJ, Departamento de Vertebrados (MNRJ). Osteological nomenclature follows Duellman and Trueb (1986). For phalangeal formula and digital numbering we assume that on the hand frogs have lost Finger I (*sensu* Alberch and Gale 1985); therefore, the finger closest to the prepollex is Finger II and the remaining are numbered accordingly.

Results

Ostia pharyngea are absent in the roof of the mouth in all species of *Brachycephalus* examined, and externally, a tympanum is lacking. A tympanic annulus and stapes are absent from the middle ear. In all individuals of *Brachycephalus ephippium* examined from a range of populations across the distribution of this species, an

ornamented bony shield lies lateral to the otic capsule in the posterolateral portion of the skull (Fig. 1); this plate shields the otic region, and we refer to it as the parotic plate. The parotic plate covers part of the squamosal and the otic capsule, and is fused to the frontoparietal dorsolaterally, forming the posterolateral margin of the skull and the posterior edge of the orbit anteriorly. We observed this plate to vary in size in the exemplars of *B. ehippium* from several different localities, *B. nodoterga*, and *B. vertebralis*. Evidence that this plate forms independently comes from examination of a developmental series of *B. ehippium* (Fig. 1B).

The nearly circular fenestra ovalis of the middle ear lies in the posterior wall of the otic capsule and is almost completely covered by a relatively large, bony operculum (Figs. 2, 3). We observed a similar condition of the operculum in *B. brunneus*, *B. didactylus*, *B. ehippium* (from several localities), *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. cf. vertebralis*, and *B. vertebralis*. In all these species, the operculum is circular, and bears a medial projection that extends posteriorly and from which the *m. opercularis* originates. The degree of staining by alizarin varies in some specimens, and this seems to indicate difference in the degree of ossification of this element. In the otic capsule of *Brachycephalus*, the fenestra ovalis and the operculum are located in the posterior wall of the otic capsule (Figs. 2, 3). As a consequence, these structures are oriented posteriorly, rather than laterally, as in other frogs. This rearrangement has reduced the distance between the fenestra ovalis and the jugular foramen (Fig. 3) and perhaps also that between the operculum and the suprascapula, resulting in a relatively shorter *m. opercularis*.

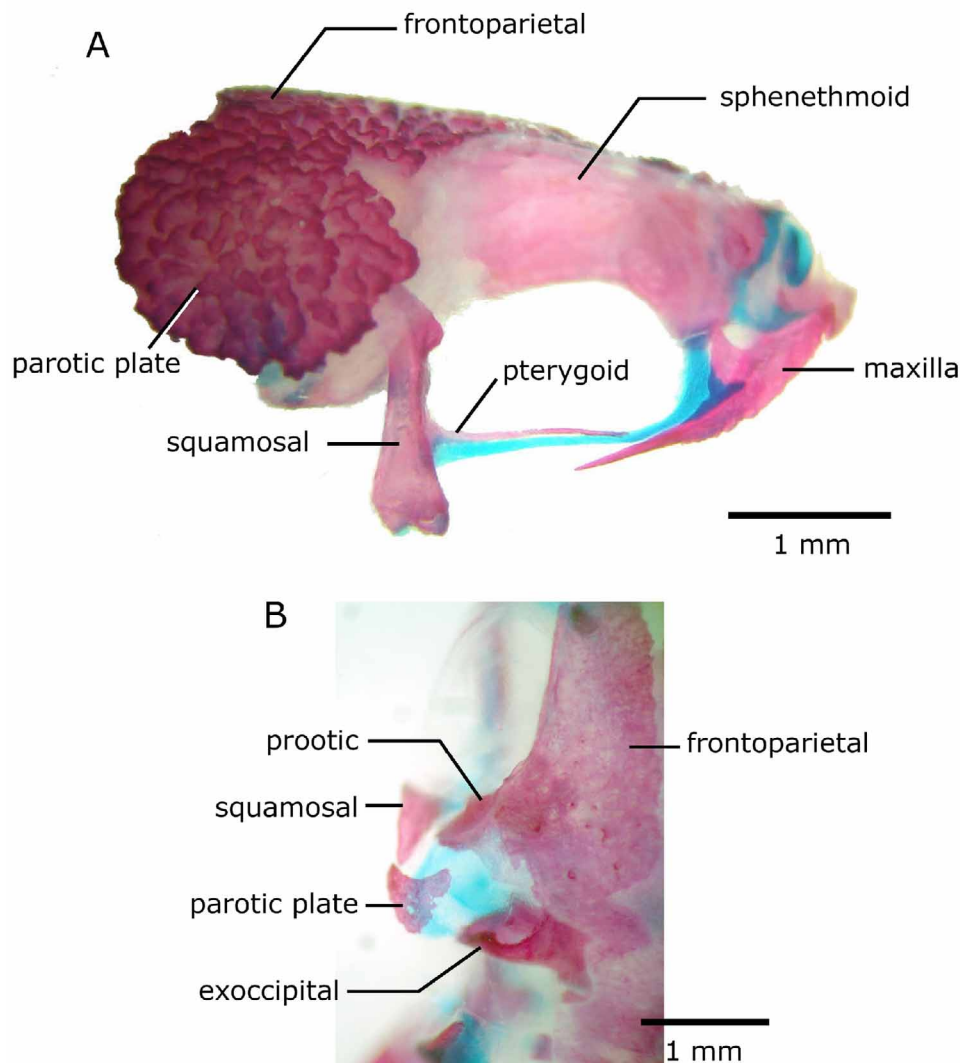


FIGURE 1. The parotic plate in *Brachycephalus ehippium* A) Lateral view of a cleared-and-stained adult skull. B) Dorsal view the left side of the skull of a juvenile (10.58 mm snout-vent length).

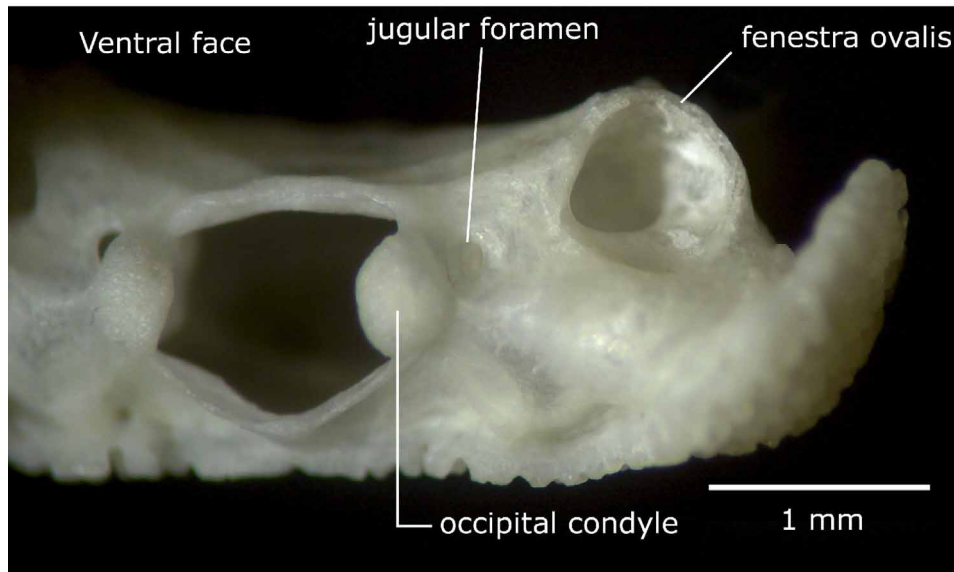


FIGURE 2. Posterior view of the skull of *Brachycephalus ephippium* showing details of the orientation of the fenestra ovalis.

Discussion

The Anuran external and middle ear

The auditory apparatus of most anurans (Fig. 4) is composed of a tympanic membrane, which is supported by a cartilaginous, funnel-shaped tympanic annulus, and connected to the *pars externa plectri* of the stapes (*pars media plectri*), which conducts sound waves in frequencies higher than 1000 Hz to the inner ear within the otic capsule (Duellman and Trueb 1986). The stylus of the stapes, the *pars media plectri*, is connected to the inner ear at the fenestra ovalis by the *pars interna plectri*, which usually is expanded to form a footplate. This system conducts airborne sound waves (Duellman and Trueb 1986). The operculum (usually cartilaginous) occupies most of the fenestra ovalis and articulates with the *pars interna plectri* (Vorobyeva and Smirnov 1987). In anurans, the operculum is connected to the suprascapula by the *m. opercularis* (Vorobyeva and Smirnov 1987). This system transmits vibration lower than 1000 Hz to the inner ear (Duellman and Trueb 1986), thereby allowing anurans to perceive lower frequencies from the ground through the forelimbs.

In most anurans, the tympanum is much larger than the fenestra ovalis. This seems to match the acoustic impedance of the air to the higher impedance of fluids in the inner ear (Duellman and Trueb 1986). Some anuran taxa, including brachycephalids, lack, or have reduced middle-ear elements (Trueb and Alberch 1985; Graybeal and Cannatella 1995; Yeh 2002; Roth *et al.* 1992). The middle ear also acts as a pressure-equalizing system. The Eustachian tube usually connects the middle ear to the mouth cavity through openings (ostia pharyngea) in the roof of the mouth. Exceptions to this occur in small bufonids (McDiarmid 1971; Graybeal and Cannatella 1995), brachycephalids (McLachlan 1943; present work), microhylids (Yeh 2002), and several other frogs that lack middle ears (reviewed by Lombard and Straughan 1974), and in which this pressure-equalizing system is absent.

The external and middle ear of *Brachycephalus*

We noted discrepancies between our observations of the auditory regions of *Brachycephalus* and those of Ribeiro *et al.* (2005) and Alves *et al.* (2006) for four species of *Brachycephalus* from Southern Brazil. In both papers, the authors mention that the species being described lack all auditory apparatus related to the middle ear. We observed that at least in the specimen of *B. brunneus* (Ribeiro *et al.* 2005) that we examined, the oper-

culum is present and resembles the opercula of its congeners. Therefore, we assume that our observations pertain to all species of the genus, and that their observations probably are erroneous.

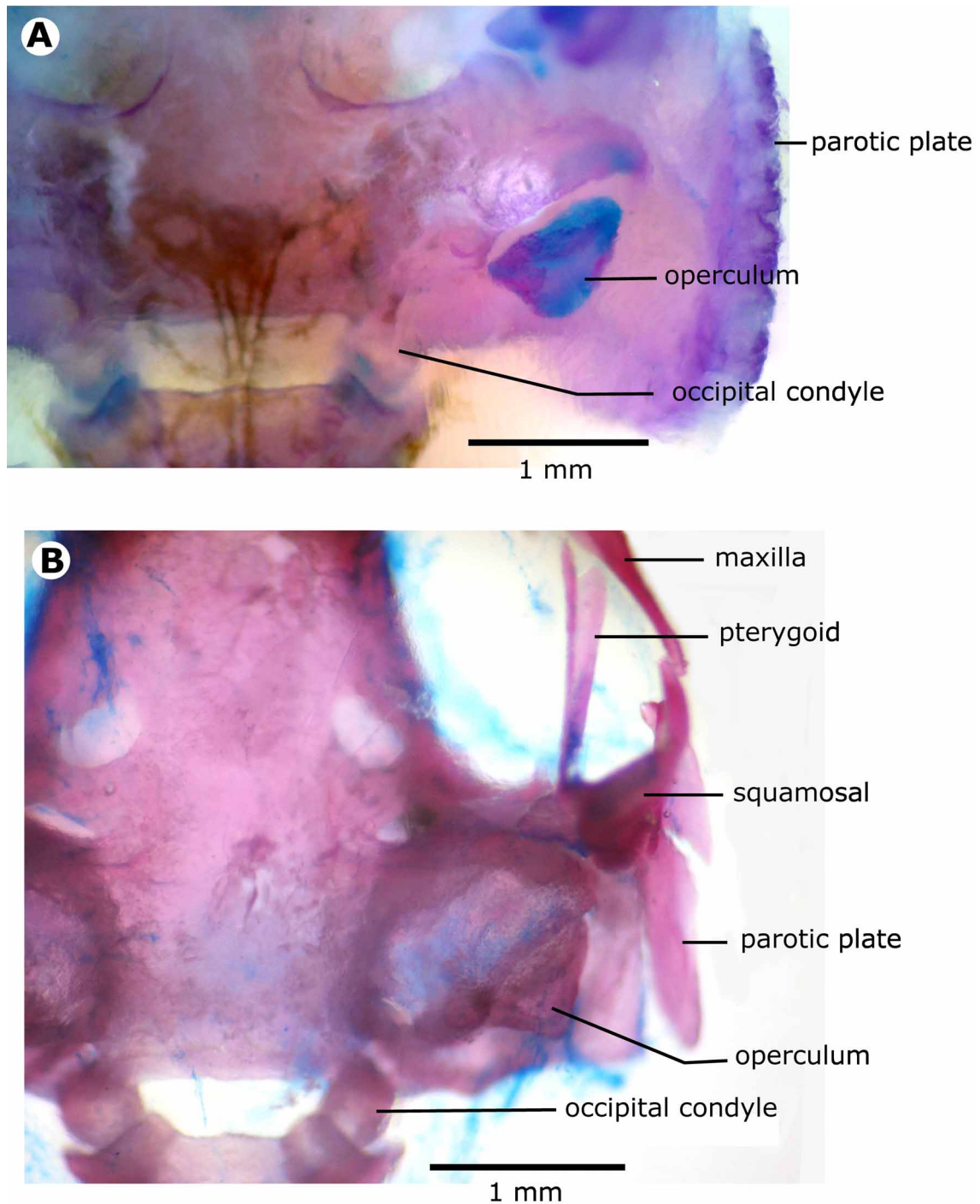


FIGURE 3. A) Ventral view of the posterior portion of the skull of *Brachycephalus ephippium* showing operculum on natural position covering the fenestra ovalis. (Note the partially ossified operculum.) B) Ventral view of the posterior portion of the skull of *B. pernix*. (Note the completely ossified operculum.)

There is a consensus that airborne hearing in anurans is relayed only via the tympanic–stapes sound-conducting system, and that the operculum serves only to perceive ground vibrations in frequencies under 1000 Hz (Duellman and Trueb 1986; Vorobyeva and Smirnov 1987). However, this seems not to be the case for

Brachycephalus. The species in this genus are known to produce calls with frequencies greater than 4000 Hz (Pombal *et al.* 1994). So, in the absence of a tympanic-stapes system, the operculum-brachial system, through the *m. opercularis*, may serve to receive and conduct high frequency sounds to the inner ear. This would suggest that, although most of the middle ear is missing in *Brachycephalus*, they are not deaf. The orientation of the fenestra ovalis and of the operculum, may serve as a way to shorten the distance between the operculum and the suprascapula, thereby shortening the *m. opercularis*. This, in turn, may serve to decrease the distance the sound has to travel to the internal ear. A similar hypothesis—that the opercular system also may serve to conduct airborne sounds in anurans lacking stapes and tympanum—was proposed by Hetherington *et al.* (1986). Obviously, these hypotheses remain to be tested, and we may learn that structures related to the internal ear of some brachycephalids may have changed when compared to those of other anurans. Other frogs have been reported to have a similar configuration of the middle ear, including absence of all the skeletal elements and of the ostia pharyngea. Examples include the bufonids *Truebella* (Graybeal and Cannatella 1995), *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, *Oreophrynella* (McDiarmid 1971) and the microhylids genus *Microhyla* (Vorobyeva and Smirnov, 1987). If species in these groups indeed produce calls, they would serve as additional models in which these hypotheses could be investigated.

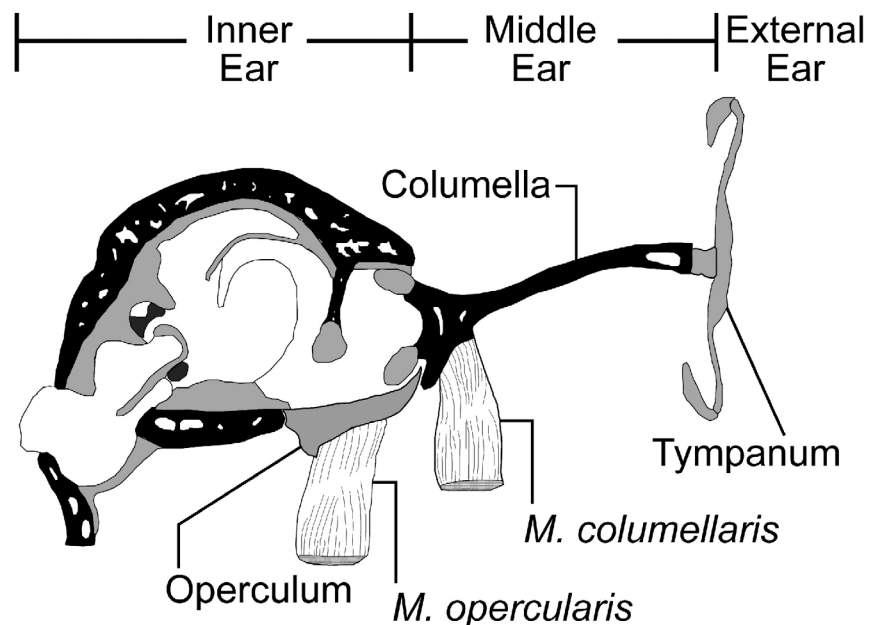


FIGURE 4. Diagram of the auditory system of a frog, showing all the elements present and subdivision of the ear modified from Duellman & Trueb (1986).

Absence of the elements of the middle ear may result from losses related to the evolutionary reduction of body size; therefore, such absences may be convergent among most of these taxa (Yeh 2002). Based on the phylogenetic hypothesis presented in Frost *et al.* (2006), in which most of the taxa lacking auditory elements appear distantly related in the tree, we must assume that the pattern of loss of elements of the middle ear evolved independently, because each of the sister groups of these taxa has a complete auditory apparatus. Evolving small size may have limited the development of these structures (Hanken and Wake 1993, Yeh 2002).

Functionality may constrain the lower size limits for the presence of elements of auditory apparatus in anurans (Duellman and Trueb 1986), as a result, loss of elements may relate to size. There may be functional connection between body size and auditory function (Duellman and Trueb 1986). Thus, as frogs became

smaller through evolution, they may reach a size threshold at which the relationship between the size of the organism and the auditory apparatus (fenestra ovalis, tympanum, and stapes) may preclude the auditory system from conducting sounds properly, owing to the physics of the sound transmission. Put another way, there may be lower size limit beyond which functional hearing via a system involving a tympanum and stapes can take place. Natural selection for the elimination of this system, and truncation of the development at a larval stage such that only the operculum is formed (this structure forms early during ontogeny; Vorobyeva and Smirnov 1987), may have been an important mechanism in the evolution of this system (Alberch *et al.* 1979, Yeh 2002). Obviously, this would have to be evaluated experimentally and statistically within a phylogenetic framework. The great size differences among frog species may well serve this line of research.

Our findings have also some implications in establishing the relationships of *Brachycephalus*. For the first time since *Brachycephalus* was described, a group of characters other than those of phalangeal reduction (Izecksohn 1971, Alberch and Gale 1985) and fusion of the pectoral girdle elements (Izecksohn 1971) has been discovered that may corroborate the monophyly of the genus. Therefore, we propose that (1) the posterior orientation of the fenestra ovalis, and (2) the enlarged operculum that nearly fills the fenestra ovalis and (3) bears a large process for the attachment of the *m. opercularis* are characters unique to *Brachycephalus* and features that support its monophyly.

Other osteological features of Brachycephalus and their bearing on its relationships

The otic plate in *Brachycephalus ephippium* was first described by McLachlan (1943: p171), who did not name it, referring to the bone simply as a dermal ossification. Our observations indicate that within *Brachycephalus*, the presence of the parotic plate of variable size and degree of ossification and ornamentation may indicate the monophyly of a group composed of *B. ephippium*, *B. nodoterga*, and *B. vertebralis*. Based on the original description of the species included in the *Adelophryne*, members of this genus have tympanum and consequently, a complete auditory apparatus (Hoogmoed and Lescure 1984; Hoogmoed *et al.* 1994). Although we did not have access to skeletons of *Euparkerella*, examination of whole specimens of *E. cochranae*, *E. robusta*, and *E. tridactyla* show that they lack the tympanum, tympanic annulus, and the Eustachian tube (ostia pharyngea also absent). Based on the drawing of the skull of *E. brasiliensis* by Lynch (1971: Figure 100), it seems that at least in this species, the fenestra ovalis retains its lateral position and that there is a substantial gap between the anterior margin of the operculum and that of the fenestra ovalis. Some of the states present in *Euparkerella* (e.g., lack of most of the middle ear) may serve as evidence of a closer relationship between the two genera.

Given the recent proposal that *Adelophryne* and *Euparkerella* may be close to *Brachycephalus* based on shared similarities in the pattern of digital loss (Frost *et al.* 2006), we felt compelled to clarify this by examining available information on digital morphology for these taxa. The only species of *Adelophryne* for which descriptions of the hand and foot skeleton are available is *A. adistola* (da Silva and Meihardt 1999). In this species, Finger V lacks one phalange; there is no digital reduction in the foot. For *Euparkerella*, there is information for *E. brasiliensis* (Lynch 1971; Izecksohn 1988) and *E. cochranae*, *E. robusta*, and *E. tridactyla* (Izecksohn 1988). In each of these species, Finger V lacks one phalangeal element (formula 2-2-3-2). In addition, in *E. tridactyla*, Toe V lacks one phalange V (formula 2-2-3-4-2), whereas the remaining species have a foot phalangeal formula of 2-2-3-4-3 similar to most other anurans.

The discovery of new taxa has increased our knowledge of the variability of phalangeal formulae in *Brachycephalus*, but the literature is somewhat confusing and misleading. Some papers describe one thing and illustrate another and, based on our own experience, we know how easy it is to remove the miniscule phalanges of the fingers and toes of *Brachycephalus* accidentally during skeletal preparation. We assume that some of the disparities we have noted in the literature may have resulted from observational error.

Based on our examination of cleared-and-stained specimens and information gleaned from the literature (including some of the original species descriptions), we conclude that the phalangeal formula of the hand is

unique and conservative in *Brachycephalus* and distinct from that of *Adelophryne* and *Euparkerella* (Table 1). In addition, one phalange is absent on digit V of all examined species, and this may be an additional synapomorphy for the genus. On the toes, variation on the number of phalanges is more complex and may be indicative of monophyletic groups of species within *Brachycephalus*, and therefore, only a phylogenetic analysis based on the inclusion of a larger set of characters would elucidate the existence of such groups. In this context it is also important to notice that the close relationship between *Brachycephalus* and either *Adelophryne* or *Euparkerella*, as suggested by Frost *et al.* (2006), is not corroborated by the observed variation of digital morphology.

TABLE 1. Phalangeal formulae for fingers and toes of species of *Adelophryne*, *Brachycephalus*, and *Euparkerella*. * indicates discrepancies between the illustrations presented in the papers and original descriptions; and + indicates variation found in some populations of *B. ephippium*.

| Species | Phalangeal formulae | | References |
|------------------------|---------------------|------------------------------------|---|
| | Fingers | Toes | |
| <i>A. adiastrata</i> | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (da Silva and Meihardt 1999) |
| <i>B. alipioi</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-1 | (Pombal and Gasparini, 2006) |
| <i>B. brunneus</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-0 | (Ribeiro <i>et al.</i> 2005) |
| <i>B. didactyla</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | (Izecksohn 1971) |
| <i>B. ephippium</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-2 (1-2-3-4-1) ⁺ | (Alberch and Gale 1985, Izecksohn 1988) |
| <i>B. ferruginus</i> * | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | (Alves <i>et al.</i> 2006) |
| <i>B. hermogenesi</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-2 | Our data |
| <i>B. izecksohni</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-0 | (Ribeiro <i>et al.</i> 2005) |
| <i>B. nodoterga</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | Our data |
| <i>B. pernix</i> | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-0 | (Pombal <i>et al.</i> 1998) |
| <i>B. pombali</i> * | 1-2-3-1 | 1-2-3-4-1 | (Alves <i>et al.</i> 2006) |
| <i>B. vertebralis</i> | 1-2-3-1 | 0-2-3-4-1 | Our data |
| <i>E. brasiliensis</i> | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (Lynch 1971; Izecksohn 1988) |
| <i>E. cochranæ</i> , | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (Izecksohn 1988) |
| <i>E. robusta</i> , | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-3 | (Izecksohn 1988) |
| <i>E. tridactyla</i> | 2-2-3-2 | 2-2-3-4-2 | (Izecksohn 1988) |

Acknowledgments

This work was made possible with the acquisition of freshly collected specimens from several new localities. We are thankful to the administration of the Prefeitura Municipal of Atibaia, São Paulo, for the permission to visit the Grota Funda Municipal Park. During field work LAC was helped by Rafael Camilo Laia, Darlan Aragão. Specimens were also made available by Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior, who allowed LAC to join his team in expedition throughout the Atlantic rain forest in search of *Brachycephalus*. Dr. Ariovaldo Giaretta made specimens under his care available to this study. Dr. Maria Júlia da Silva allowed the use of the Stereomicroscope Zeiss SV11. LAC received a fellowship for the development of his master degree research from CNPq (The National Council for Scientific and Technological Development – MCT, Brazil, process number 132528/2005-3). Joe Mendelson, David Kizirian, and Mary S. Linn kindly reviewed earlier versions of the manuscript. Linda Trueb, acting as a referee to this journal, made substantial criticism and helped to improve the readability and clarity of the article.

References

- Alberch P. & Gale, E.A. (1985) A developmental analysis of an evolutionary trend: digital reduction in amphibians. *Evolution*, 39(1), 8–23.
- Alberch P., Gould, S.J., Oster, G.F. & Wake, D.B. (1979) Size and Shape in Ontogeny and Phylogeny. *Paleobiology*, 5(3), 296–317.
- Alberch P. (1980) Ontogenesis and Morphological diversification. *American Zoologist*, 20, 653–667.
- Alberch, P. (1981) Convergence and parallelism in foot morphology in the neotropical salamander genus *Bolitoglossa*. *Evolution*, 35(1), 84–100.
- Alves, A.C.R., Ribeiro, L.F., Haddad, C.F.B., & Reis S.F. (2006) Two New Species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná State, Southern Brazil. *Herpetologica*, 62(2), 221–233.
- Ananias, F., Giaretta, A.A., & Recco-Pimentel, S.M. (2006) Cytogenetics of *Brachycephalus ephippium* (Anura, Brachycephalidae) with comments on its relationship to the Bufonidae. *Amphibia-Reptilia*, 27(1), 121–125.
- Cannatella, D.C. & Trueb, L. (1988) Evolution of pipoid frogs: morphology and phylogenetic relationships of *Pseudohyomenochirus*. *Journal of Herpetology*, 22(4), 439–456.
- da Silva, H.R. & Meinhardt DJ. (1999) The generic status of *Adelophryne tridactyla*: osteology, synonymy, and comments on the genus *Syncope* (Anura: Microhylidae). *Journal of Herpetology*, 33(1), 159–164.
- Darst, C.R. & Cannatella, D.C. (2004) Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(3), 462–475.
- Duellman W.E. & Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York 670 pp.
- Estrada, A.R. & Hedges, S.B. (1996) At the lower size limit in tetrapods: a new diminutive frog from Cuba (Leptodactylidae: Eleutherodactylus). *Copeia*, (4), 852–859.
- Ford L. S. & Cannatella, D. C. (1993) The major clades of frogs. *Herpetological Monographs*, (7), 94–117.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., de Sa, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., & Wheeler, W.C. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1–370.
- Giaretta, A.A. & Sawaya, R.J. (1998) Second Species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae). *Copeia*, (4), 985–987.
- Graybeal, A. & Cannatella, D.C. (1995) A new taxon of Bufonidae from Peru, with descriptions of two new species and a review of the phylogenetic status of supraspecific Bufonid Taxa. *Herpetologica*, 5(2), 105–131.
- Griffiths, I. (1963) The phylogeny of the Salientia. *Biological Reviews*, 38, 241–292.
- Hanken, J. & Wake, D.B. (1993) Miniaturization of Body Size: Organismal Consequences and Evolutionary Significance. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 467–500.
- Hetherington, T.E., Jaslow, A.P., & Lombard, R.E. (1986) Comparative morphology of the amphibian opercularis system: I. General design features and functional interpretation. *Journal of Morphology*, 190(1), 43–61.
- Hoogmoed, M.S., Borges, D.M., & Cascon, P. (1994) Three new species of the genus *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. *Zoologische Medelingen, Leiden* 68, 271–300.
- Hoogmoed, M.S. & Lescure, J. (1984) A new genus and two new species of minute leptodactylid frogs from northern South America, with comments upon *Phyzelaphryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Zoologische Mededelingen*, 58(6), 85–115.
- Izecksohn, E. (1971) Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia, Anura). *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 280, 1–12.
- Izecksohn, E. (1988) Algumas considerações sobre o gênero *Euparkerella*, com a descrição de três novas espécies (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 48(1), 59–74.
- Lombard R. E. & Straughan, I. R. (1974) Functional aspects of anuran middle ear structures. *Journal of Experimental Biology*, 61, 71–93.
- Lynch, J.D. (1971) Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactylid frogs. *Miscellaneous Publications, Museum of Natural History, The University of Kansas*, (53), 1–238.
- MacDiarmid, R.W. (1971) Comparative morphology and evolution of the frogs of the Neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, and *Oreophrynela*. *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History*, (12). 1–66.
- McLachlan, P. (1943) The Cranial and Visceral Osteology of the Neotropical Anuran *Brachycephalus ephippium* Spix. *South African Journal of Science*, 49, 164–195.
- Noble, G.K. (1931) *The Biology of amphibians*. McGraw-Hill. New York, 577 pp.
- Pombal Jr., J.P., Sazima I, & Haddad, C.F.B. (1994) Breeding Behavior of the Pumpkin Toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*, 28(4), 516–519.
- Pombal Jr., J.P. & Gasparini, J.L. (2006) A New *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Rainfor-

- est of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 1(2), 87–93.
- Pombal Jr., S.P., Wistuba, E.M., & Bornschein, M.R. (1998) A new species of Brachycephalidae (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Herpetology*, 32(1), 70–74.
- Ribeiro, L.F., Alves, A.C.R., Haddad, C.F.B., & Reis, S.F. (2005) Two new Species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the State of Paraná, Southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional*, (518), 1–18.
- Roth, G., Dicke, U., & Nishikawa, K. (1992) How do Ontogeny, Morphology, and Physiology of Sensory Systems Constrain and Direct the Evolution of Amphibians? *The American Naturalist*, (139), 105–124.
- Trueb, L. & Alberch, P. (1985) Miniaturization and the anuran skull: a case study of heterochrony. In H. R. Duncker and G. Fleischer, (Eds). *Functional Morphology of the Vertebrates*. Gustav Fischer Verlag, New York, 113–121.
- Vorobyeva, E. & Smirnov, S. (1987). Characteristic features in the formation of anuran sound-conducting systems. *Journal of Morphology*, 192(1), 1–11.
- Yeh, J. (2002) The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution*, 56(3), 628–641.

Appendix. Material examined

- Brachycephalus didactylus*– Sacra Família do Tingua, Rio de Janeiro, Brazil: EI 5011-5012.
- Brachycephalus ephippium* – Cotia, São Paulo, Brazil: AS00466, AS 00484, AS 00485, AS 00491, AS 00492, AS 00502, AS 00517, AS 00521, AS 00524, AS 00599, AS 00602, AS 00603, AS 01511 e AS 01513; Atibaia, São Paulo, Brazil: AS 00455, AS 00447, AS 00468, AS 00474, AS 00509-00511; Itamonte, Minas Gerais, Brazil: AS 02428-2437; Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil: AS 02439-02450; Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil: AS 02451-02458;
- Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil: AS02417-02427, 02438;
- Brachycephalus hermogenesi* – Ubatuba, São Paulo, Brazil: AS 02460;
- Brachycephalus nodoterga* – Biritiba Mirim, São Paulo, Brazil: CHUNB 37676;
- Brachycephalus* cf. *vertebralis* – Ubatuba, São Paulo, Brazil: AAG 000841, 001572, 001616, 001620, 001918;
- Brachycephalus vertebralis* – Parati, Rio de Janeiro, Brazil: MNRJ 11102-11105;
- Brachycephalus pernix* – Quatro Barras, Paraná, Brazil: AS2399, AS 2401, AS 2459;
- Brachycephalus bruneus* – Campina Grande do Sul, Paraná, Brazil: AS 02462;
- Euparkerella brasiliensis* – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil: EI 585, 1195, 4259.
- Euparkerella cochranæ* – Magé, Rio de Janeiro, Brazil: EI 7280, 7699.
- Euparkerella robusta* – Mimoso do Sul, Espírito Santo, Brazil: EI 1993, 7284.
- Euparkerella tridactyla* – Santa Tereza, Espírito Santo, Brazil: EI 7254, 7259.