



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PORTO NACIONAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JONATAS CARVALHO DE SOUZA

**HISTOLOGIA DESCRITIVA DO PULMÃO E DAS BOLSAS CLOACAIS DE
JUVENIS DE *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (TESTUDINES:
PODOCNEMIDIDAE)**

Porto Nacional

2023

JONATAS CARVALHO DE SOUZA

**HISTOLOGIA DESCRITIVA DO PULMÃO E DAS BOLSAS CLOACAIS DE
JUVENIS DE *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (TESTUDINES:
PODOCNEMIDIDAE)**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Tocantins (UFT), *Campus* Universitário de Porto Nacional, como requisito à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Ana Beatriz Nunes Ribeiro
Co-orientadora: Dr^a Kellen Lagares Ferreira Silva

Porto Nacional

2023

JONATAS CARVALHO DE SOUZA

**HISTOLOGIA DESCRITIVA DO PULMÃO E DAS BOLSAS CLOACAIS DE
JUVENIS DE *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (TESTUDINES:
PODOCNEMIDIDAE)**

Monografia apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Porto Nacional, Curso de Ciências Biológicas foi avaliado como requisito para obtenção do título de bacharel.

Data de aprovação: 14 / 11/ 2023

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Ana Beatriz Nunes Ribeiro, UEAP

Prof. Dr. Thiago Nilton Alves Pereira, UFT

Ma. Débora dos Santos Pereira, UFOPA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S729h Souza, Jonatas Carvalho.
Histologia descritiva do pulmão e das bolsas cloacais de juvenis de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1843) (Testudines: Podocnemididae). / Jonatas Carvalho Souza. – Porto Nacional, TO, 2023.
40 f.
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Ciências Biológicas, 2023.
Orientadora : Ana Beatriz Nunes Ribeiro
Coorientadora : Kellen Lagares Ferreira Silva
1. Quelônios. 2. Respiração. 3. Conservação. 4. Manejo. I. Título

CDD 570

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À minha família (Mãe, tias, avó, padrasto e irmãos), que sempre esteve ao meu lado, oferecendo apoio emocional. A minha mãe por ter trabalhado muito para me proporcionar uma boa qualidade de vida na graduação e ter sempre suprido a ausência do meu pai. A minha avó por sempre confiar no meu potencial, não me deixando desistir, e por ter me apoiado tanto emocionalmente quanto financeiramente durante o curso. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido. As minhas tias (Gercionilia e Gercivane), meu padrasto (Giovane) e irmãos (Ana Lúcia, Ana Luiza e Ronaldo) por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Em especial minha tinha Gercivane, cujo amor e estímulo pelo estudo desde a minha infância moldaram o meu caminho acadêmico, expressei minha profunda gratidão. Mesmo enfrentando desafios de saúde, seu legado perdura, inspirando-me a perseverar e a dedicar-me à busca do conhecimento. Sua influência é eterna e seu apoio inestimável.

À minha orientadora, Ana Beatriz Nunes (Bia), muito obrigado pelo apoio e pela nossa amizade construída durante esses últimos três anos. Só tenho a agradecer pelos momentos, conselhos, correções na escrita e na fala, por ter me apresentado a herpetologia e pelas pitucas (Bolsonara, Chica e Coral) que foram minha companhia na escrita do projeto deste trabalho. Te conhecer foi uma das melhores coisas que a graduação me proporcionou.

À Kellen Lagares por ter me apresentado a Bia e pelo apoio e incentivo durante a graduação. Sem você esse trabalho não seria possível. A equipe do Laboratório de Técnicas Histológicas e Anatomia vegetal, em especial a Rita, Victorina, Clemilda, Kayo, Paulo, João Marcelo e Fernanda. Muito obrigada pela amizade, companhia e apoio em todos os protocolos realizados.

Bia, Carol, Celine, Danilo (minha gay), Gustavo, Rizia e Yasmin (minha gêmea xipófaga) obrigado pelo apoio, pelos litros no intervalo, rolês aleatórios na casa da Rizia, PT's, rolês nas segundas e por todas as risadas e fofocas compartilhadas. Quero agradecer em especial a Yasmin, Celine e Danilo principalmente pela companhia de segunda a segunda, amo vocês.

À Shayene e Gaby muito obrigado pela amizade e por sempre terem me apoiado mesmo de longe, a amizade de vocês foi a melhor coisa que o IF me deu.

Quero agradecer em especial minha amiga Bruna, muito obrigado por me aturar e morar comigo boa parte da minha graduação. Te considero minha irmã. A Flora muito obrigada pela companhia na escrita desse trabalho, suporte emocional e por ter me deixado mais pobre durante a graduação. Valeu a pena cada centavo gasto com ração premium - enquanto eu comia miojo e salsicha. O pai ama você.

RESUMO

Podocnemis unifilis é a espécie de quelônio semiaquático mais abundante do gênero *Podocnemis* podendo medir até 50cm de comprimento e pesar até 12.5kg. As bolsas cloacais são órgãos do sistema urogenital dos quelônios semiaquáticos e são utilizadas para trocas gasosas, controle de flutuabilidade e trocas iônicas. Já os pulmões são órgãos do sistema respiratório que são utilizados para trocas gasosas. O presente trabalho teve como objetivo descrever os aspectos morfológicos e histológicos das bolsas cloacais e pulmões. Os espécimes foram coletados nos rios Tocantins e Javaés, estado do Tocantins, através do método de pesca de anzol e técnica do pulo. Após coletados foram realizadas biometria e eutanásia. Na eutanásia foram retiradas as bolsas cloacais e pulmões, que foram fixados em formol tamponado por 72 horas. Posterior a fixação, foram armazenados em frascos com álcool 70% até emblocamento em parafina, microtomia e coloração em Hematoxilina e Eosina para análise em microscopia de luz. Para a microscopia de varredura das bolsas cloacais, o material foi lavado após a fixação, armazenado em uma solução de 1000µL de glicerol 16% onde permaneceu por 24 horas. As amostras foram desidratadas e secas em câmara de ponto crítico para fixação em “stubs” e metalização a partir do banho em ouro. Nas bolsas cloacais foram observadas quatro camadas: a mucosa, a submucosa, a muscular e a serosa, apresentando tecido epitelial cilíndrico simples sobre lâmina própria, a presença de vasos sanguíneos e capilares, e tecido muscular liso. Nos pulmões foi observada a presença de projeções que formam câmaras, um epitélio com presença de cílios e células caliciformes. Neste órgão foi observada uma grande quantidade de vasos sanguíneos e capilares, camada mucosa, muscular e a presença de cartilagem de hialina. Conclui-se que as bolsas cloacais são relevantes para trocas gasosas, sendo os pulmões mais eficientes, tendo em vista que esse órgão apresenta mais capilares abaixo do epitélio e um número maior de células secretoras de muco. Além disso, as bolsas cloacais correspondem a órgãos acessórios peculiares e que podem se diferenciar entre as espécies, e desempenham, além das trocas gasosas, outras funções.

Palavras-chaves: Quelônios; respiração; conservação; manejo; tracajá.

ABSTRACT

Podocnemis unifilis is the most abundant semi-aquatic turtle species within the *Podocnemis* genus, capable of reaching up to 50 cm in length and weighing up to 12.5 kg. Cloacal bursae are organs in the urogenital system of semi-aquatic turtles, used for gas exchange, buoyancy control, and ionic exchange. Lungs, on the other hand, are part of the respiratory system and are utilized for gas exchange. The aim of this study was to describe the morphological and histological aspects of the cloacal bursae and lungs. Specimens were collected from the Tocantins and Javaés rivers in the state of Tocantins, Brazil, using hook-and-line fishing and 'pulo' technique. After collection, biometrics were taken, and euthanasia was performed. During euthanasia, the cloacal bursae and lungs were removed and fixed in buffered formalin for 72 hours. Following fixation, they were stored in 70% alcohol in containers until paraffin embedding, microtomy, and Hematoxylin and Eosin staining for light microscopy analysis. For scanning electron microscopy of the cloacal bursae, the material was washed after fixation, stored in a 1000 μ L 16% glycerol solution for 24 hours. Samples were dehydrated and dried in a critical point chamber, attached to 'stubs,' and gold-coated. In the cloacal bursae, four layers were observed: mucosa, submucosa, muscular, and serosa, featuring a simple columnar epithelium on the lamina propria, the presence of blood vessels and capillaries, and smooth muscle tissue. In the lungs, there were projections forming chambers, an epithelium with cilia and goblet cells. This organ showed a significant number of blood vessels and capillaries, mucosal and muscular layers, and the presence of hyaline cartilage. In conclusion, the cloacal bursae are relevant for gas exchange, although the lungs are more efficient. This is due to the presence of a higher number of capillaries beneath the epithelium and a greater number of mucus-secreting cells. Additionally, the cloacal bursae are unique accessory organs that can differentiate among species and serve various functions beyond gas exchange.

Key-words: Turtles; respiration; conservation; handling; Yellow-spotted Amazon River turtle.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|--------------------------------------|
| Figura 1- Área de estudo. Fonte: RIBEIRO, 2023 | 16 |
| Figura 2 - Espécimes de <i>P. unifilis</i> - Macho (a direita) e fêmea (a esquerda) - Sexagem por coloração da cabeça. Fonte: Acervo pessoal | 17 |
| Figura 3 - (A) Biometria do espécime (B)Pesagem. Fonte: Acervo pessoal..... | 17 |
| Figura 4 - Montagem dos blocos de parafina. Fonte: Acervo pessoal | 19 |
| Figura 5 - (A) Cintura pélvica de <i>P. unifilis</i> e bolsas cloacais (B) Anatomia das bolsas cloacais. BCe: bolsa cloacal esquerda; BCd: bolsa cloacal direita; Ap: ápice; Cp: corpo; Cl: cólo, Prot: protodeu | 23 |
| Figura 6 - Corte histológico bolsas cloacais – 10x. A: camada mucosa, B: camada submucosa, C: camada muscular, D: camada serosa | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 7 - Corte histológico das bolsas cloacais - 40x - EPC: Epitélio estratificado cúbico, LP: lâmina própria, VS: vaso sanguíneo | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 8 - Corte histológico das bolsas cloacais - 10x - EPC: Epitélio estratificado cúbico, VS: vaso sanguíneo, CP: capilares, ML: musculatura lisa, → células caliciformes | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 9- Corte histológico das bolsas cloacais - 40x EPC: Epitélio estratificado cúbico, CP: capilar, TM: túnica muscular | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 10 - Corte histológico das bolsas cloacais - 10x EPC: Epitélio estratificado cúbico, VS: vaso sanguíneo, TM: túnica muscular, CS: camada serosa..... | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 11 - (A) Camadas das bolsas cloacais (B) Epitélio - CS: camada serosa, CM: camada muscular, EP: epitélio..... | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 12 - (A) Pulmão direito e esquerdo (B) Ligação gastropulmonar (C) Brônquios (D)Traqueia. Fonte: Acervo pessoal..... | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 13 - Corte histológico do pulmão - 10x - CH: cartilagem de hialina, *: câmara, VS: vaso sanguíneo, TM: tecido muscular, E: epitélio, CP: capilar..... | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 14 - Corte histológico do pulmão - 4x - *: Câmaras | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 15 - Corte histológico do pulmão - 10x - VS: vaso sanguíneo, CP: capilar | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 16 - Corte histológico do pulmão - 40x - E: Epitélio cúbico simples ciliado, TCF: tecido conjuntivo frouxo, TCD: tecido conjuntivo denso, c: condrócitos, → células caliciformes | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 17 - Corte histológico do pulmão - 10x - CH: cartilagem de hialiana .. | Erro! Indicador não definido. |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| Ap | Apíce |
| BCd | Bolsa cloacal direita |
| BCe | Bolsa cloacal esquerda |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CFMV | Conselho Federal de Medicina Veterinária |
| Cl | Cólo |
| CM | Camada muscular |
| CMC | Comprimento Máximo da Carapaça |
| CMP | Comprimento Máximo do Plastrão |
| CP | Capilar |
| Cp | Corpo |
| CS | Camada serosa |
| EP | Epitélio |
| EPC | Epitélio estratificado cilíndrico |
| ICMBIO | Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade |
| LMC | Largura Máxima da Carapaça |
| LMP | Largura Máxima do Plastrão |
| Lp | Lâmina própria |
| ML | Musculatura lisa |
| SISBIO | Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade |
| TM | Túnica muscular |
| UFT | Universidade Federal do Tocantins |
| UHE | Usina Hidrelétrica |
| VS | Vasos sanguíneos |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 GERAL | 14 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 14 |
| 3. METODOLOGIA | 15 |
| 3.1 ÁREA DE ESTUDO | 15 |
| 3.2 CAPTURA DOS ANIMAIS | 16 |
| 3.3 EUTANÁSIA | 17 |
| 3.4 MICROSCOPIA DE LUZ | 18 |
| 3.4.1 Desidratação, diafanização, impregnação e inclusão | 18 |
| 3.4.3 Microtomia | 19 |
| 3.4.4 Coloração em hematoxilina de Harris e eosina (HE) | 19 |
| 3.4.5 Montagem das lâminas permanentes | 20 |
| 3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA | 20 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| 4.1 BOLSAS CLOACAIS | 22 |
| 4.2 PULMÕES | 28 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 33 |
| REFERÊNCIAS | 34 |
| APÊNDICE | 39 |
| APÊNDICE A – Protocolo de coloração em Hematoxilina de Harris – Eosina (HE) | 39 |
| ANEXO | 40 |
| ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA | 40 |

1 INTRODUÇÃO

A ordem Testudines ou Chelonia é formada pelos jabutis, cágados e tartarugas, sendo essa ordem dividida em duas subordens, Cryptodira e Pleurodira, que são diferenciadas de acordo a forma em que retraem a cabeça para dentro do casco (SHAFFER, 2009). A subordem Pleurodira retrai a cabeça lateralmente, e a Cryptodira verticalmente em forma de “S”.

Atualmente, estão descritas 363 espécies de quelônios, divididas em 14 famílias (UETZ; HOSEK, 2023); e no Brasil ocorrem 38 espécies, tornando o país um dos cinco países mais ricos em espécies de quelônios (COSTA et al., 2022). A região amazônica se destaca quanto a diversidade desse grupo, apresentando 17 espécies, sendo 15 com hábitos semiaquáticos e duas com hábitos terrestres (VOGTV, 2008; VAN DIJK et al., 2014; FERRARA et al., 2017).

Os quelônios, assim como demais répteis e grande parte dos vertebrados, apresentam o pulmão como principal órgão respiratório, podendo ser do tipo unicameral - serpentes -, paucimeral - iguanas -, multicameral - testudines, crocodilos e anguimorpha (PERRY, 1998). Os pulmões do tipo unicameral possuem uma única câmara, com seu ápice apresentando tecidos típicos para a realização de trocas gasosas e na região caudal apresenta um tecido avascular. O paucimeral apresenta poucas câmaras e não apresenta brônquio intrapulmonar. O pulmão multicameral apresentam muitas câmaras e possui brônquios intrapulmonares (O’MALLEY, 2005; DEVOE, 2010).

Os cágados e as tartarugas possuem respiração bimodal, ou seja, podem realizar trocas gasosas nos ambientes aquáticos e terrestres (STONE et al., 1992), tendo então o pulmão como principal órgão respiratório (BAÚ, 2016). Devido a rigidez da carapaça e apresentarem a coluna vertebral e costelas fusionadas a ela, não é possível a expansão da cavidade abdominal, o que afeta o seu processo respiratório não permitindo a ventilação costal (BRAINERD, 1999; ALMONACID et al., 2007; LYSON et al 2014; CORDEIRO, 2019). Trabalhos indicam que para auxiliar nas trocas gasosas esse grupo utiliza o integumento, o epitélio bucofaringeal, a bolsa cloacal e/ou epitélio da cloaca (GORDOS; FRANKLIN, 2002; JACKSON et al., 2002 CORDEIRO, 2019).

As bolsas cloacais são constituintes do sistema urogenital dos testudines semi-aquáticos (HERNANDEZ-HENAO et al., 2013). Esse órgão ocorre como um par de apêndices da cloaca, é bastante vascularizado e utilizado para trocas gasosas na água, a partir da difusão ativa entre o animal e a água (PETTERS, 1964; KING; HEATWOLE 1994; ROSA, 2008; CORDEIRO, 2019). Além das trocas gasosas, alguns estudos mostram que está relacionado com estocagem de água, umidificação de substrato, controle de flutuabilidade e trocas iônicas (JEFFREE;

JONES, 1992; JORGESSEN, 1998). Esse órgão foi descrito nas famílias Pelomedusidae, Emydidae, Chelydrae, Platysternidae, Chelidae e Podocnemididae, onde o gênero *Podocnemis* está incluído (SMITH; JAMES, 1958).

Dentro dessa família estão incluídos três gêneros que são: *Podocnemis* (Wagler, 1830), *Peltocephalus* (Duméril & Bibron, 1835) e *Erymnochelis* (Baur, 1888). No gênero *Podocnemis* são descritas seis espécies: *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848), *Podocnemis sextuberculata* (Cornalia, 1849), *Podocnemis lewiana* (A. Duméril, 1852) e *Podocnemis vogli* (Muller, 1935) (VOGT, 2008; VANZOLINI, 2003); e todas ocorrem na América do Sul (ZUG et al., 2001). Quatro dessas espécies ocorrem na Amazônia brasileira, sendo elas: *P. unifilis*, *P. sextuberculata*, *P. expansa* e *P. erythrocephala* (VAN DIJK, 2014). A espécie *P. vogli* ocorre em território colombiano no rio Magdalena e na bacia do rio Sinú; e *P. lewiana* é encontrada na Colômbia e na Venezuela, na bacia do rio Orinoco (VANZOLINI, 2001).

A espécie *P. unifilis*, comumente conhecida como tracajá, pode pesar até 12.5kg e medir até 50cm de comprimento. Possui uma ampla distribuição na América do Sul com ocorrência descrita nos países Bolívia, Equador, Guianas, Peru, Suriname, Venezuela; e no Brasil nos estados do Amapá, Acre, Pará, Maranhão, Rondônia, Goiás, Mato Grosso e Tocantins (VOGT, 2008). É uma espécie com características ecológicas e reprodutivas estudadas em diversas áreas de ocorrência, mas adaptações anatômicas que podem indicar adequações do seu modo de vida ou descrever caracteres peculiares da espécie são pouco pesquisados.

A investigação da anatomia e histologia dos órgãos respiratórios dos Testudines semiaquáticos é de suma importância, tendo em vista que esses animais apresentam adaptações respiratórias que permitem respirar em ambiente aquático e terrestre, além da presença da carapaça que, por ser rígida, limita sua capacidade morfofisiológica devido as costelas estarem fusionadas a essa estrutura, impossibilitando a respiração através da rotação das costelas (BRAINERD, 1999). Malvasio (1996) destaca a relevância dos dados anatômicos dos Testudines brasileiros tanto para a sistemática dessas espécies quanto para a preservação.

Compreender a biologia animal e as características das espécies pode contribuir para o manejo e conservação, porque a partir desses estudos é possível entender a adaptação desses organismos ao ambiente e inferir os impactos que podem ser ocasionados a partir de mudanças em seu habitat. Análises anatômicas e histológicas de quelônios são escassas, principalmente o que se refere a bolsas cloacais. Dados provenientes dessas técnicas são importantes para o melhor conhecimento da biologia desses animais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho descrever os aspectos histológicos dos pulmões e bolsas cloacais - região que auxilia as trocas

gasosas em quelônios semiaquáticos - de espécimes juvenis de *P. unifilis*. Considerando que são animais que utilizam além do pulmão as bolsas cloacais como um órgão acessório relevante, podendo realizar trocas gasosas em alguns grupos, novos dados podem se tornar instrumentos para caracterização e diferenciação de espécies no gênero. Dessa forma, nossa hipótese é que as bolsas cloacais são órgão capazes de realizar trocas gasosas nessa espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever os aspectos anatômicos e histológicos do pulmão e das bolsas cloacais de juvenis de *Podocnemis unifilis*.

2.2 Específicos

- Descrever a morfologia do pulmão e das bolsas cloacais;
- Descrever os constituintes dos tecidos do pulmão e das bolsas cloacais;

3. METODOLOGIA

3.1 Área de estudo

Os espécimes de *P. unifilis* foram coletados em dois pontos do rio Tocantins, nas proximidades do município de Tupiratins até o município de Tocantínia, e no rio Javaés, na região próxima à Ilha do bananal (Figura 1).

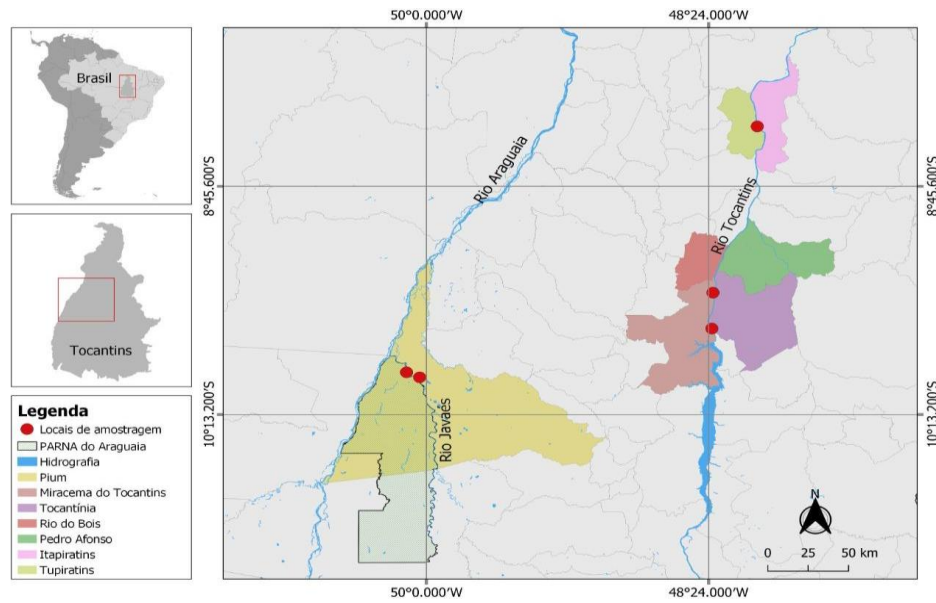
O rio Tocantins apresenta extensão total de aproximadamente 2400 km e é oriundo da confluência dos rios Almas e Maranhão, cujas nascente está localizada no planalto de Goiás, a cerca de 1000m de altitude, ao norte da cidade de Brasília (ANA, 2006). Corta o país no sentido sul-norte, recebendo as águas do rio Araguaia na divisa dos Estados do Tocantins e Pará. É formado por três segmentos distintos: o alto Tocantins, que começa na nascente se perpetuando até a cachoeira do Lajeado, com 1050km de comprimento; o médio Tocantins que vai da cachoeira do Lajeado à cachoeira do Itaboca, medindo 980 km; e o baixo Tocantins, da cachoeira de Itaboca até a foz (OLIVEIRA, 2008).

No rio Tocantins, os animais foram coletados entre as coordenadas 8°23'11.2" S 48°06'50.1" W e 8°14'16.4" S 48°08'35.5" W, compreendendo as regiões de Tocantínia até o município de Tupiratins, locais com bastante ação antrópica e relevante quando se trata de expansão agrícola, principalmente na produção de cana-de-açúcar e soja (IBGE, 2017). Alguns pontos de amostragem estão localizados nas proximidades da Usina Hidrelétrica (UHE) Luiz Eduardo Magalhães, um relevante fator que altera a dinâmica fluvial da região.

O rio Javaés possui sua bacia hidrográfica localizada no estado do Tocantins, na porção média da bacia do rio Araguaia abrangendo a região oeste e sudoeste do estado. Possui aproximadamente 385 km de extensão, da nascente que sai do leito do rio Araguaia até a foz, também no rio Araguaia (Barbosa, 2019).

No rio Javaés, os espécimes foram coletados, entre as coordenadas 10°08'45.3" S 49°59'49.8" W e 9°54'47.9" S 50°06'48.5" W, nas proximidades do Centro de Pesquisa Canguçu, em uma região com diferentes áreas destinadas à conservação ambiental, como o Parque Nacional do Araguaia e Área de Proteção Ambiental Ilha do Bananal/Cantão, além das várias terras indígenas (UCAMBIENTAL, 2021). Essa região trata-se de uma área de transição formada por elementos do Cerrado e Floresta Amazônica (SILVA, 2007).

Figura 1- Área de estudo



Fonte: Ribeiro, 2023

3.2 Captura dos animais

As capturas foram aprovadas no Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade (SISBIO), vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO), sob licença n° 69837. No rio Javaés foi coletado um espécime em setembro de 2021 e três espécimes em outubro de 2021, e no rio Tocantins foram coletados quatro espécimes em junho de 2022.

O método aplicado de captura foi a pesca de anzol com iscas vegetais - milho e a soja – e a técnica do “pulo” onde, após a visualização do animal na superfície da água é necessário pular da embarcação e perseguir o animal para capturá-lo (MIORANDO, 2016; MALVASIO et al., 2019; ATAÍDES et al., 2021). Essa técnica é efetiva durante o dia, principalmente entre as 10h e 13h, quando o sol é incidente perpendicularmente no leito do rio, facilitando a visualização.

Após a coleta, esses animais foram sexados (Figura 2) observando as características de dimorfismo sexual da espécie, e pesados conforme Ribeiro (2012). Foram então transportados em caixas organizadoras para a Universidade Federal do Tocantins – *Campus* Palmas – onde foram posteriormente eutanasiados, de acordo com a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária n°1000/2012 (CFMV, 2012), para retirada das bolsas cloacais e pulmões.

Figura 2 - Espécimes de *P. unifilis* - Macho (a direita) e fêmea (a esquerda) - Sexagem por coloração da cabeça.

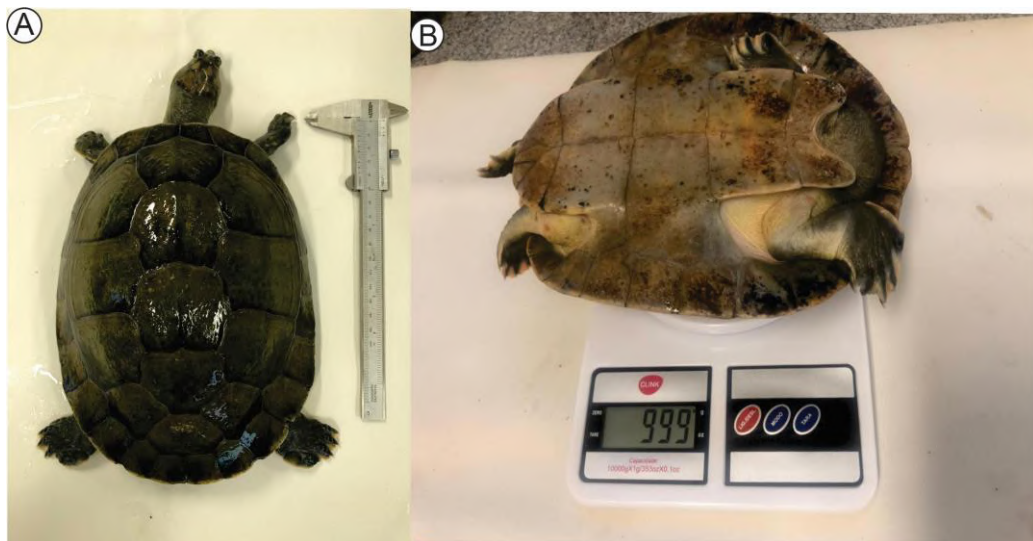


Fonte: Acervo pessoal

3.3 Eutanásia

Após a sexagem, os animais foram medidos com auxílio de um paquímetro manual ou fita métrica – para animais maiores – para o comprimento máximo da carapaça (CMC), largura máxima da carapaça (LMC), comprimento máxima do plastrão (CMP), largura máxima do plastrão (LMP) (Figura 3 – A); e pesados em balança digital comum (Figura 3 – B).

Figura 3 - (A) Biometria do espécime (B) Pesagem.



Fonte: Acervo pessoal

Após realizada a biometria, os animais foram colocados em um recipiente com gelo por 60 minutos para dessensibilização. Posterior a dessensibilização, os espécimes foram eutanasiados, com autorização do Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Tocantins (CEUA/UFT) no Processo nº 23101.002389/20-31 (Anexo B). A eutanásia se iniciou pela sangria (corte da jugular) e separação da carapaça e plastrão com auxílio de um alicate de corte. Após a separação, foi feita a evisceração, toaleta e a retirada das bolsas cloacais e pulmões, respectivamente.

3.4 Microscopia de luz

Após retirados, os pulmões e as bolsas cloacais foram cortados em fragmentos de 0,5 a 1 cm – para facilitar a entrada do fixador no tecido – fixados e armazenados em formol 10% tamponado em tampão fosfato por 72 horas.

A fixação teve como objetivo preservar a estrutura e a composição dos tecidos, evitar a degradação do tecido por microrganismos e enzimas da própria célula (autólise) e enrijecer o material com intuito de facilitar o corte fino para ser analisado no microscópio. Algumas condições podem influenciar nesse processo como a temperatura, pH, concentração do fixador, espessura do tecido e tempo de fixação (SANTOS et al., 2021).

Após fixados, o material foi transferido para álcool 70% até o processo de inclusão em parafina, sendo o álcool um reagente de armazenamento que não muda a estrutura e a composição dos tecidos (CARVALHO, 2012).

3.4.1 Desidratação, diafanização, impregnação e inclusão

Para inclusão em parafina, o material passou por um processo de desidratação para remover a água e o fixador, que foi gradativamente substituído pelo agente desidratante, já que a parafina não se mistura com a água. O material foi processado em cinco etapas de desidratação em álcool em ordem crescente (álcool 70% - álcool 95% I - álcool 95% II - álcool absoluto I - álcool absoluto II), e permaneceu 60 minutos em cada etapa.

Após o processo de desidratação, esse material passou pelo processo de diafanização, uma etapa que tem como função remover o álcool da amostra visto que o álcool não é miscível em parafina, utilizada para impregnação do material. Para esse processo as amostras passaram em duas etapas de diafanização em xilol (xilol 100% I - xilol 10% II), onde permaneceram por 60 minutos em cada.

Após a diafanização, o material foi impregnado em parafina líquida. A impregnação é o processo que retira o agente diafanizador para a entrada do meio de impregnação. Nesse

procedimento as amostras foram colocadas em duas parafinas a 60°C, sendo as duas parafinas puras, e uma terceira parafina com cera de abelha a 8%, onde permaneceram por 60 minutos em cada, até o processo de inclusão.

A inclusão em parafina teve o objetivo de gerar um bloco para auxiliar no corte do processo de microtomia. Esse processo faz com que se obtenha um corte sem destruição do tecido. Assim, o material foi colocado em parafina, com intuito de dar suporte ao micrótomo. Os blocos foram feitos com papel tendo o auxílio de um molde de madeira, onde foi colocado parafina com cera de abelha a 8% e fragmentos das bolsas cloacais e pulmões (Figura 4).

Figura 4 - Montagem dos blocos de parafina.



Fonte: Acervo pessoal

3.4.3 Microtomia

Os blocos foram resfriados por 24 horas e desbastados para a remoção do excesso de parafina, com o intuito de se obter toda a superfície do tecido para facilitar a microtomia. Esse processo foi realizado com um micrótomo rotativo semi-motorizado, modelo RM2245 (Leica Wetzlar - GER). Os desbastes foram realizados em 10 μ m e os cortes de tecido no tamanho máximo de 6 μ m. Esses cortes foram fixados em lâminas de vidro com adesivo de Haupt e formalina a 5%, aquecidas a 60°C para expansão dos cortes.

As lâminas foram secas em temperatura ambiente e após a secagem foram submetidas ao processo de coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina.

3.4.4 Coloração em hematoxilina de Harris e eosina (HE)

Para iniciar o processo de coloração, as lâminas foram hidratadas em duas etapas: a primeira em xilol (xilol 100% I e xilol 100% II) onde permaneceram por 10 minutos em cada,

e a segunda em álcool, com concentração diminuindo gradativamente (álcool absoluto I - álcool absoluto II - álcool 95% I - álcool 95% II - álcool 70%) onde permaneceram por um minuto em cada etapa.

Após o processo de hidratação, as lâminas foram submetidas a água corrente por dois minutos, e posteriormente permaneceram 2 minutos em hematoxilina de Harris. Após a hematoxilina, as lâminas foram colocadas em água destilada e passaram por um banho em ácido clorídrico a 1% (diferenciador) para eliminar o excesso da coloração inicial. Após o diferenciador, ficaram submersas em água corrente por 10 minutos. Essa etapa de coloração tem como objetivo corar as partes ácidas (os núcleos) de roxo-azulado.

Posterior à etapa de hematoxilina, as lâminas foram colocadas em eosina por um minuto. Após a eosina passaram pelo diferenciador e permaneceram por um minuto em água corrente. Essa etapa em eosina cora os citoplasmas e fibras do tecido conjuntivo de rosa-alaranjado.

3.4.5 Montagem das lâminas permanentes

Para a montagem de lâminas permanentes, estas foram submetidas ao processo de diafanização, onde foram banhadas em álcoois (álcool 70% - álcool 95% - álcool absoluto) e permaneceram por um minuto em xilol 100% I e xilol 100% II. Posteriormente, as lâminas foram submersas em xilol 100% III onde permaneceram até a montagem. A montagem foi realizada com lamínulas de vidro aderidas às lâminas com bálsamo do Canadá (sintético).

Posterior a secagem das lâminas montadas, elas foram fotografadas com um microscópio óptico, modelo Leica DM 500 com câmera Leica ICC 50 HD acoplada (Leica, Wetzlar - GER) e foram processadas em software específico. Os processos descritos no item 3.4 foram adaptados pelos protocolos laboratoriais de Caputo et al. (2010) e Carvalho (2012).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram cortadas de 0,2 a 0,4 mm, lavadas em água destilada por 10 minutos para retirar o excesso do fixador e após isso foram armazenadas em tampão fosfato por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água ultrapura e armazenadas em *ependorf* 2,5ml com água ultrapura por 30 minutos. A água foi substituída por glicerol a 18%, onde as amostras permaneceram por 24 horas.

Após esse processo, as amostras foram desidratadas em série alcoólica (Álcool 50% - Álcool 70% - Álcool 90% - Álcool 95% - Álcool absoluto I- Álcool absoluto II) e secas na câmara de ponto crítico com etanol para retirada da umidade das amostras, nesse processo foi utilizado o gás carbônico que substitui o álcool das amostras - já que a umidade pode causar

problemas na formação da imagem (OSATCHUCK, 2022). Posterior a secagem, as amostras foram fixadas em “*stubs*” e metalizadas a partir do banho em ouro.

Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia do INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram capturados oitos espécimes de *P. unifilis*, sendo quatro coletados no rio Javaés e quatro coletadas no rio Tocantins. Os espécimes do rio Javaés apresentaram média 19,2 cm de comprimento, e peso médio de 655,75 gramas. Em contrapartida, os espécimes do rio Tocantins apresentaram média 15,9 cm de comprimento e peso médio de 377,25 gramas (Tabela 01).

Tabela 1- Dados biométricos dos espécimes de *P. unifilis*- CMC: Comprimento máximo da carapaça; LMC: Largura máxima da carapaça; CMP: Comprimento máximo do plastrão; LMP: Largura máxima do plastrão

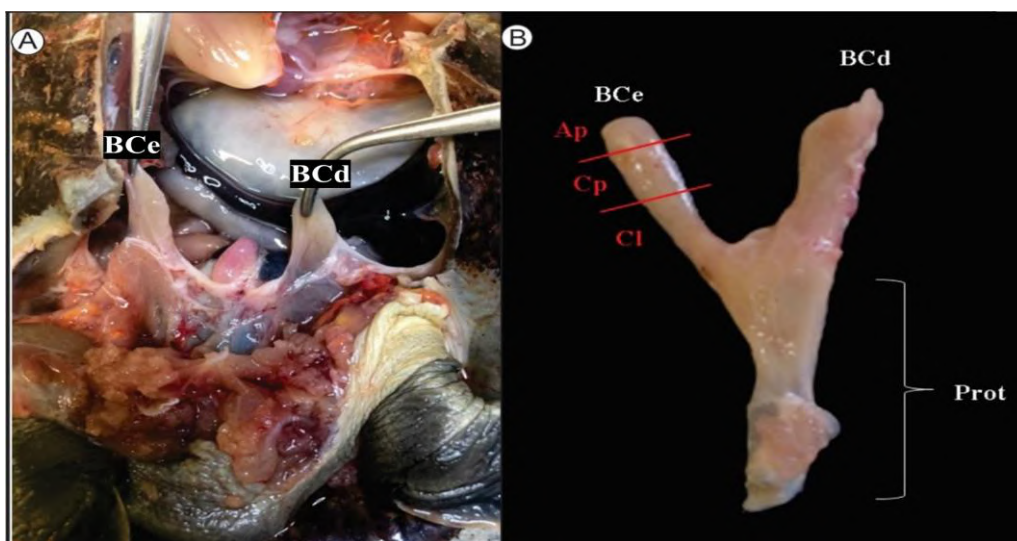
| Sexo | Local | CMC (cm) | LMC (cm) | CMP (cm) | LMP (cm) | Peso (g) |
|-------------|--------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fêmea | Javaés | 17,4 | 13,2 | 14,2 | 9,7 | 525 |
| Fêmea | Tocantins | 15,2 | 14,8 | 12,5 | 11,4 | 372 |
| Fêmea | Tocantins | 16,5 | 13,7 | 13,2 | 9,2 | 400 |
| Macho | Javaés | 18,9 | 17,8 | 13,4 | 10,4 | 581 |
| Macho | Javaés | 20,2 | 19 | 14,6 | 11,1 | 744 |
| Macho | Javaés | 20,3 | 19,3 | 14,6 | 10,7 | 773 |
| Macho | Tocantins | 16 | 15,5 | 12,1 | 9,2 | 384 |
| Macho | Tocantins | 15,9 | 14,4 | 12,4 | 9,7 | 353 |

Os espécimes coletados se tratava de juvenis da espécie, tendo em vista que para essa espécie só são considerados adultos os espécimes machos com comprimento da carapaça ≥ 25 cm, e para as fêmeas ≥ 35 cm (SOARES, 2000; FACHÍN-TERÁN; VOGT, 2004).

4.1 Bolsas cloacais

A cloaca é dividida em três partes: coprodeu, urodeu e proctodeu; e todas juntas constituem o sistema digestório e urogenital. As bolsas cloacais são componentes do sistema urogenital dos Testudines, e estão localizadas na cintura pélvica, sendo dilatações da parede do proctodeu que se comunica com o exterior (Figura 5 - A). São estruturas anexas da cloaca, formadas pelo cólo – que é ligado a cloaca –, corpo e ápice (Figura 5 - B).

Figura 5 - (A) Cintura pélvica de *P. unifilis* e bolsas cloacais (B) Anatomia das bolsas cloacais. BCe: bolsa cloacal esquerda; BCd: bolsa cloacal direita; Ap: ápice; Cp: corpo; Cl: cólo, Prot: proctodeu



Fonte: Acervo pessoal

As aves possuem o proctodeu, que é um segmento que se comunica com exterior (OLIVEIRA et al., 2004), assim como em *P. unifilis*. Nas aves o proctodeu está localizado na parte posterior da cloaca enquanto as bolsas se encontram na parte anterior, sendo estruturas anatômicas distintas. Em contrapartida, em *P. unifilis* o proctodeu forma dilatações que originam as bolsas cloacais nessa espécie. Além das diferenças anatômicas entre as bolsas cloacais de aves e dos Testudines, há uma diferença funcional. Em aves esses órgãos são responsáveis pela imunidade humoral e é onde ocorre a diferenciação e maturação dos linfócitos B (HODGES, 1974). Enquanto nos Testudines já foram descritas funções como trocas gasosas (CORDEIRO, 2019), estocagem de água para umidificação do substrato, controle de fluutuabilidade e trocas iônicas (JEFFREE; JONES, 1992; JORGENSEN, 1998).

Em *Phrynops geoffroanus* (cágado de barbicha) as bolsas cloacais estão inseridas na cintura pélvica e são dilatações da parede do proctodeu (CORDEIRO, 2019), corroborando com esse estudo e o estudo de Rosa (2008) que caracterizou as bolsas cloacais em posição semelhante em *P. expansa* (tartaruga da amazônia) e em *Chelus fimbriatus* (matá-matá). Além disso, esses autores também dividiram esse órgão em colo, corpo e ápice.

As bolsas cloacais são formadas por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e a serosa (Figura 6). Apresentam características de órgão ocos, onde a mucosa é úmida devido a presença de células secretoras e glândulas exócrinas que secretam muco, protegendo o epitélio contra agentes químicos e biológicos. Além disso, a mucosa tem como função absorção e

secreção. O epitélio de revestimento das bolsas cloacais é do tipo estratificado cúbico (Figura 7).

Figura 6 - Corte histológico bolsas cloacais – 10x. A: camada mucosa, B: camada submucosa, C: camada muscular, D: camada serosa

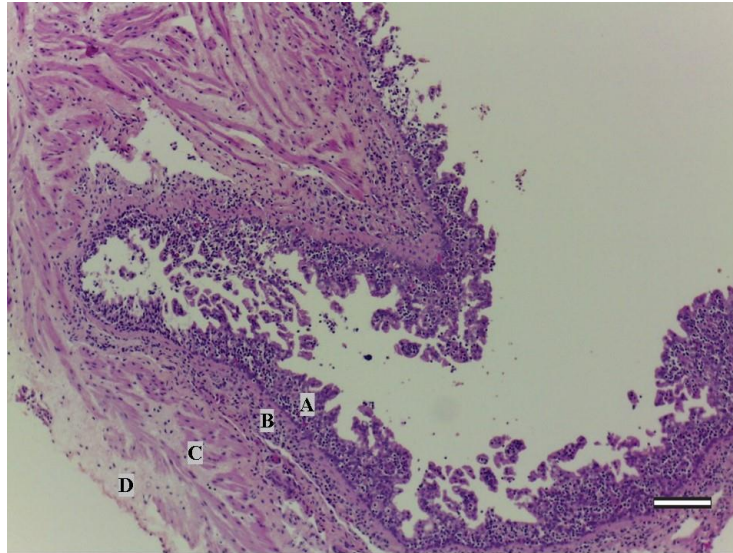
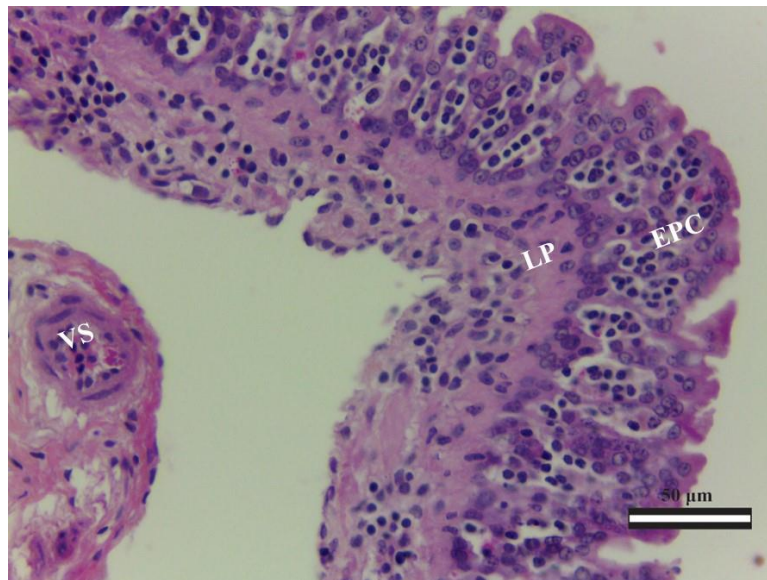
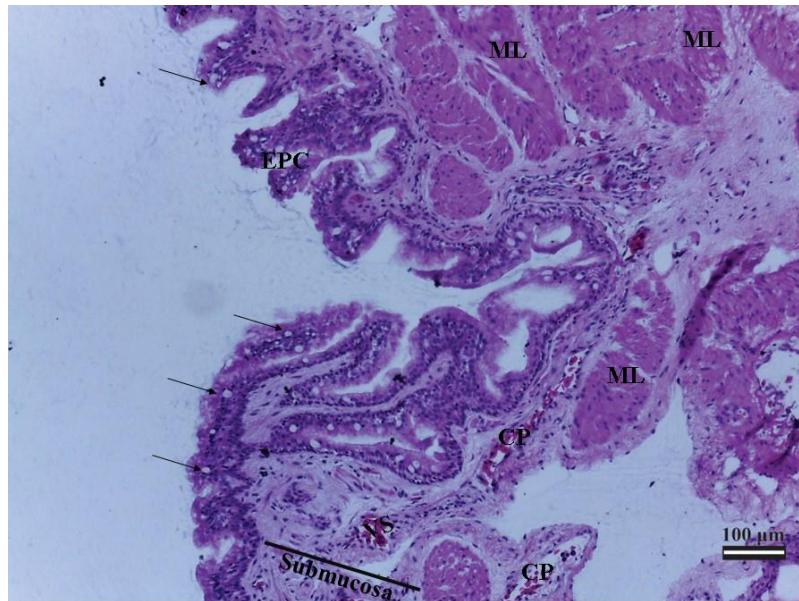


Figura 7 - Corte histológico das bolsas cloacais - 40x - EPC: Epitélio estratificado cúbico, LP: lâmina própria, VS: vaso sanguíneo



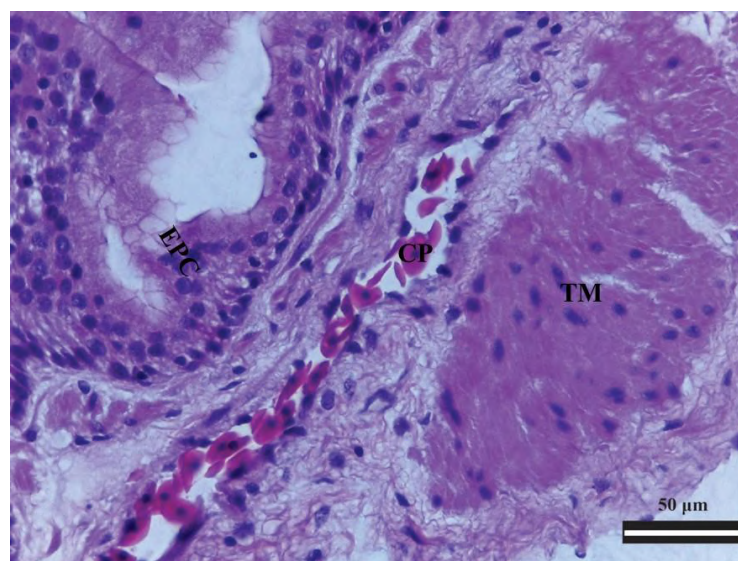
A região da mucosa é nutrida e sustentada pela lâmina própria que faz parte da submucosa. A submucosa é formada por tecido conjuntivo frouxo e possui a presença de vasos sanguíneos e capilares, sendo observada a presença de células produtoras de muco (caliciformes) no epitélio (Figura 8).

Figura 8 - Corte histológico das bolsas cloacais - 10x - EPC: Epitélio estratificado cúbico, VS: vaso sanguíneo, CP: capilares, ML: musculatura lisa, → células caliciformes



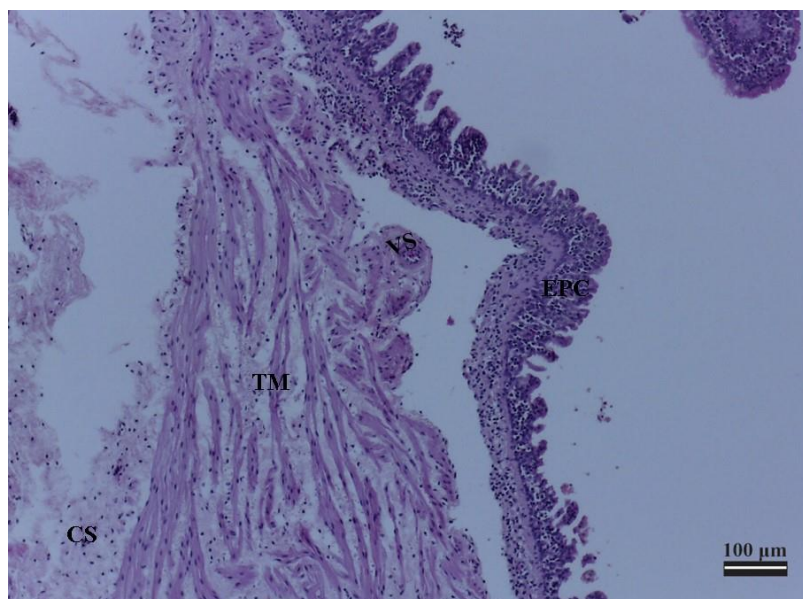
A região muscular é formada por túnicas musculares, que se encontram sobre tecido conjuntivo denso que oferece resistência e proteção, podendo haver a presença de vasos sanguíneos nessa região. Essa camada muscular é importante para deslocar e movimentar a água no interior do órgão (Figura 9).

Figura 9 - Corte histológico das bolsas cloacais - 40x EPC: Epitélio estratificado cúbico, CP: capilar, TM: túnica muscular



A camada serosa é formada por tecido conjuntivo e é delimitada por um epitélio pavimentoso simples que é denominado mesotélio (Figura 10).

Figura 10 - Corte histológico das bolsas cloacais - 10x EPC: Epitélio estratificado cúbico, VS: vaso sanguíneo, TM: túnica muscular, CS: camada serosa



Hernandez-Hernao *et. al.*, (2013) descreveu a anatomia macroscópica e microscópica do sistema urogenital de *P. vogli*, uma espécie do mesmo gênero dos espécimes estudados. As bolsas cloacais da *P. vogli* apresentaram um epitélio cilíndrico simples sobre uma lâmina própria, presença de túnicas musculares (musculatura lisa) e a presença de uma camada serosa. Neste estudo com *P. unifilis*, foram observadas estruturas semelhantes, mas houve uma distinção quanto ao tipo de epitélio presente. Nesta espécie foi identificada a presença de um epitélio estratificado cúbico.

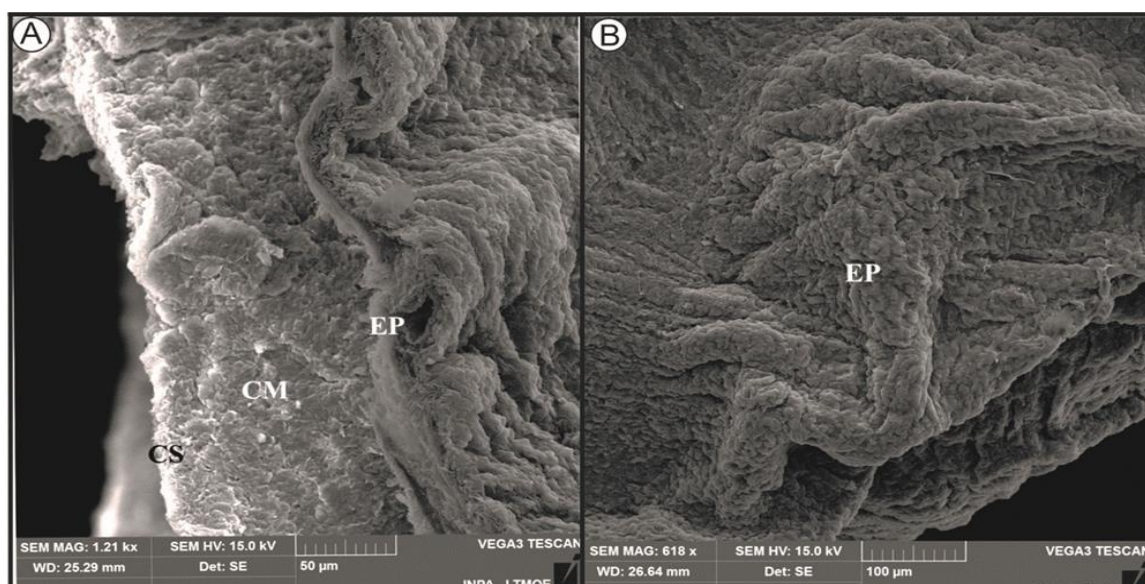
Em *P. geoffroanus*, o estudo conduzido por Cordeiro (2019) identificou a presença de uma mucosa formada por epitélio de revestimento estratificado com células colunares no ápice, lâmina própria, submucosa com tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos, túnicas musculares e uma camada serosa. Estes dados corroboraram com o presente estudo.

Esses dados corroboram com a hipótese de que o tipo de epitélio varia de acordo com os hábitos e habitat desses espécimes, apesar de serem do mesmo gênero a *P. vogli* apresentam hábitos distintos da *P. unifilis*. e *P. geoffroanus* possui hábitos e habitats semelhantes à da espécie estudada, mesmo sendo de família e gênero diferentes. *P. unifilis* e *Phrynops geoffroanus* possui locais de ocorrência na região amazônica da Venezuela, Bolívia e Peru (FERRARA *et. al.*, 2017) e nos estados brasileiros Amapá, Acre, Pará, Maranhão, Tocantins, Goiás, Rondônia, Mato Grosso (VOGT, 2008; RHODIN *et al.*, 2018), com ocorrência em comum em grandes rios e lagos (VOGT, 2008; FERRARA *et al.*, 2017).

De acordo Rueda-Almonacid et al., (2007) e Portocarrero-Aya (2008), *P. vogli* não é encontrada em cursos de grandes rios. Essa espécie é descrita em corpos de água pequenos e pouco profundos, tendo preferência por águas turvas com fundo argiloso ou lamacentos com pouca vegetação (SEGURO, 2018).

As imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciaram as camadas de mucosa, muscular e serosa (Figura 11 - A). O órgão apresentou um aspecto enrugado (Figura 11 - B), e isso ocorre devido a sua capacidade de aumentar a área de superfície, pois esses enrugamentos do epitélio criam dobras que aumentam seu volume com a entrada de água, melhorando a absorção e reabsorção.

Figura 11 - (A) Camadas das bolsas cloacais (B) Epitélio - CS: camada serosa, CM: camada muscular, EP: epitélio



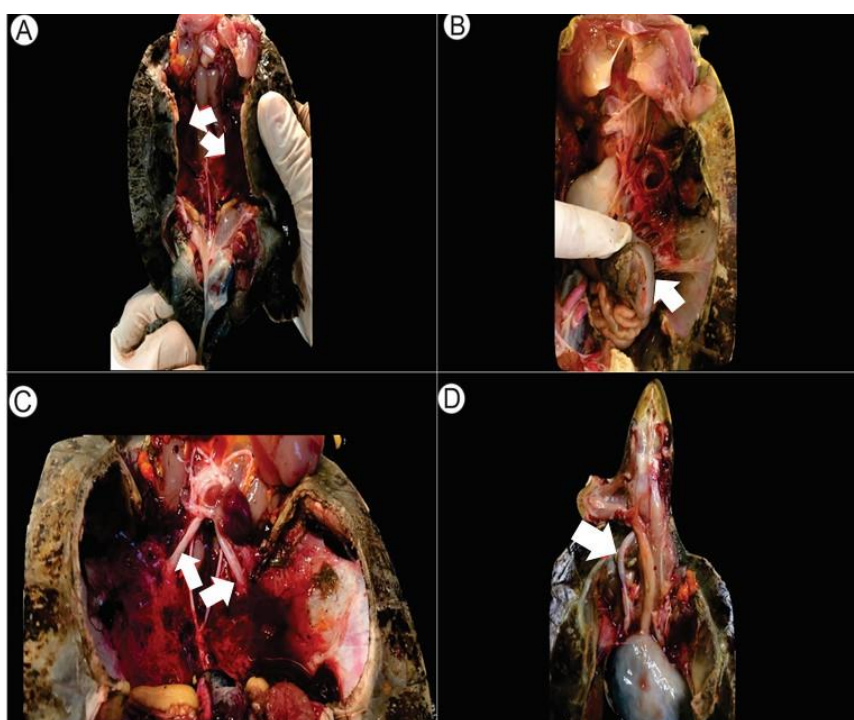
Em resumo, as bolsas cloacais de *P. unifilis* apresentaram estruturas semelhantes a *P. vogli*, espécie do mesmo gênero, diferindo-se apenas quanto ao tipo de epitélio. Os espécimes estudados apresentaram quatro camadas de tecido: a mucosa (com epitélio estratificado cilíndrico), a submucosa (com tecido conjuntivo frouxo e presença de capilares e vasos sanguíneos), a camada muscular (com túnicas musculares sobre um tecido conjuntivo denso, com presença de capilares e vasos só que em menor quantidade quando comparado com a submucosa) e a camada serosa. A espécie *P. geoffroanus* apresentou estruturas similares a *P. unifilis*, apesar de serem de gênero distintos.

4.2 Pulmões

Os espécimes analisados apresentaram dois pulmões bem desenvolvidos e com aspecto esponjoso, com uma coloração rósea devido à grande vascularização do órgão. Os pulmões encontram-se posicionados dorsalmente em relação aos demais órgãos do corpo e presos à parede interna da carapaça.

Os pulmões estavam dorsalmente ligados à carapaça (Figura 12 - A), e ventralmente no lado esquerdo conectado ao estômago pelo ligamento gastropulmonar (Figura 12 - B) e no lado direito ligado ao fígado pelo ligamento hepatopulmonar, como descrito também em *P. expansa* (VARGAS, 2015). Os brônquios estão inseridos no pulmão (Figura 12 - C) e são oriundos da bifurcação da traqueia, que é um tubo flexível cartilaginoso que apresenta coloração branca que se encontra próximo ao esôfago (Figura 12 - D).

Figura 12 - (A) Pulmão direito e esquerdo (B) Ligaçãõ gastropulmonar (C) Brônquios (D)Traqueia.



Em *P. geoffroanus* os pulmões também se encontraram ligados dorsalmente a carapaça e ventralmente ligados ao fígado (ligaçãõ hepatopulmonar) e estômago (ligaçãõ gastropulmonar) (Cordeiro, 2019), semelhante também em *P. expansa* (Vargas, 2015).

Vargas (2015) relatou que em *P. expansa* a traqueia é um tubo curto com anéis cartilagosos completos e flexíveis, sendo essa uma condição relacionada com a retraçãõ da cabeça desses animais. Este tubo apresenta uma bifurcaçãõ na regiãõ cervical e origina os

brônquios, corroborando com este trabalho realizado com *P. unifilis*. Wyneken (2001) descreve que em outros répteis essa bifurcação se encontra na região mais caudal.

Os pulmões apresentaram projeções sobre uma camada de tecido muscular liso (Figura 13) que se encontra sobre tecido conjuntivo e essas projeções se estenderam formando aberturas que constituem pequenas câmaras. Essas câmaras permitem uma área adicional de superfície para a trocas gasosas (Figura 14).

Figura 13 - Corte histológico do pulmão - 10x - CH: cartilagem de hialina, *: câmara, VS: vaso sanguíneo, TM: tecido muscular, E: epitélio, CP: capilar

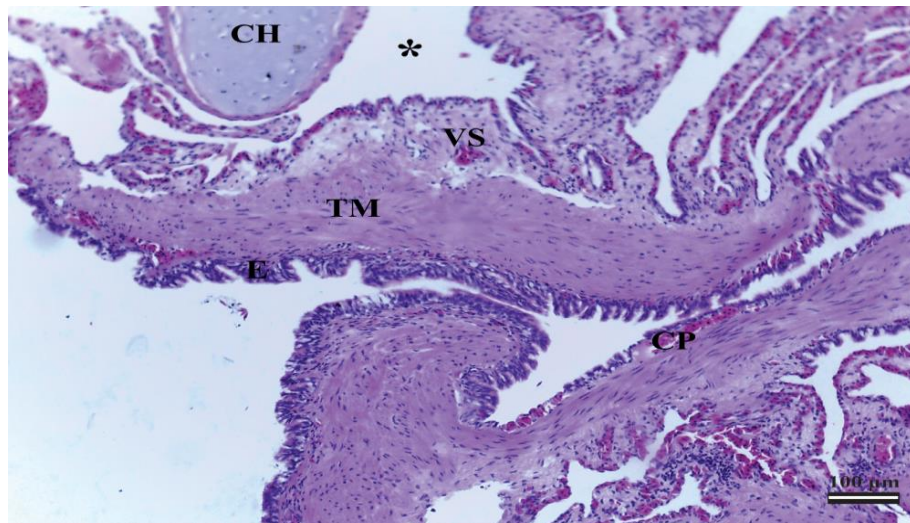
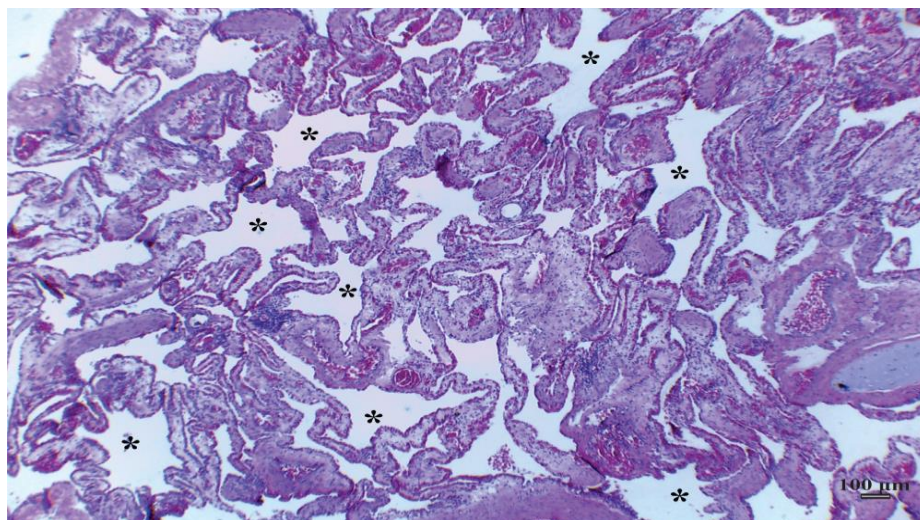


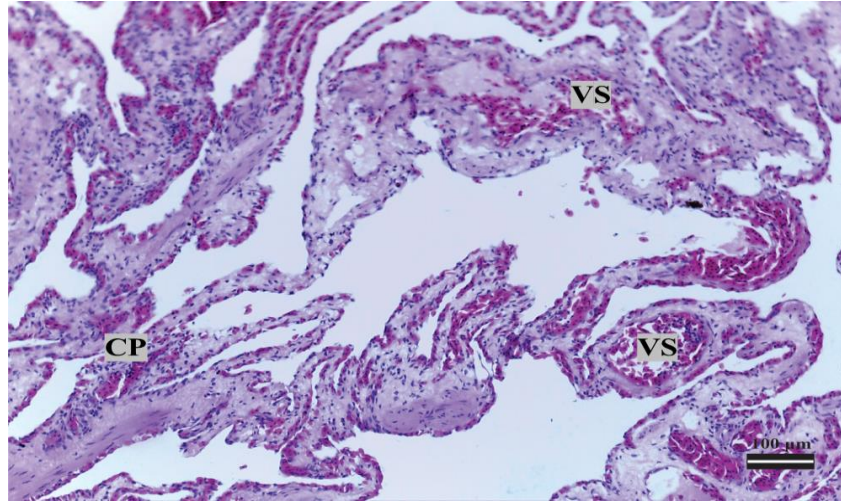
Figura 14 - Corte histológico do pulmão - 4x - *: Câmaras



Foi observado em algumas regiões a estrutura do epitélio que reveste as vias aéreas associadas com sistema vascular. O epitélio dessa região é uma única camada de células epiteliais formando um epitélio do tipo simples, que permite uma troca gasosa eficiente,

facilitando a absorção de oxigênio a partir de membranas celulares e capilares sanguíneos. Há uma rede densa de vasos sanguíneos abaixo do epitélio, com capilares envolvendo as câmaras respiratórias (Figura 15).

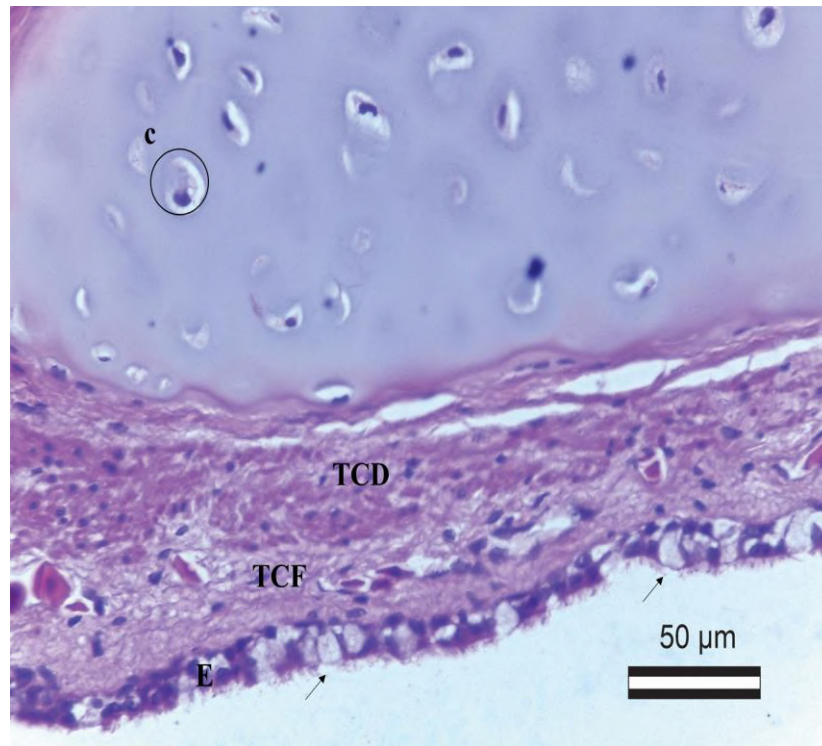
Figura 15 - Corte histológico do pulmão - 10x - VS: vaso sanguíneo, CP: capilar



Em *P. Geoffroanus* os pulmões apresentaram-se ricos em capilares e vasos sanguíneos, a presença de células secretoras de muco e foi observado projeções que originam câmaras (CORDEIRO, 2019), corroborando com trabalhos realizados com *P. expansa* (VARGAS, 2015) e com este trabalho com *P. unifilis*.

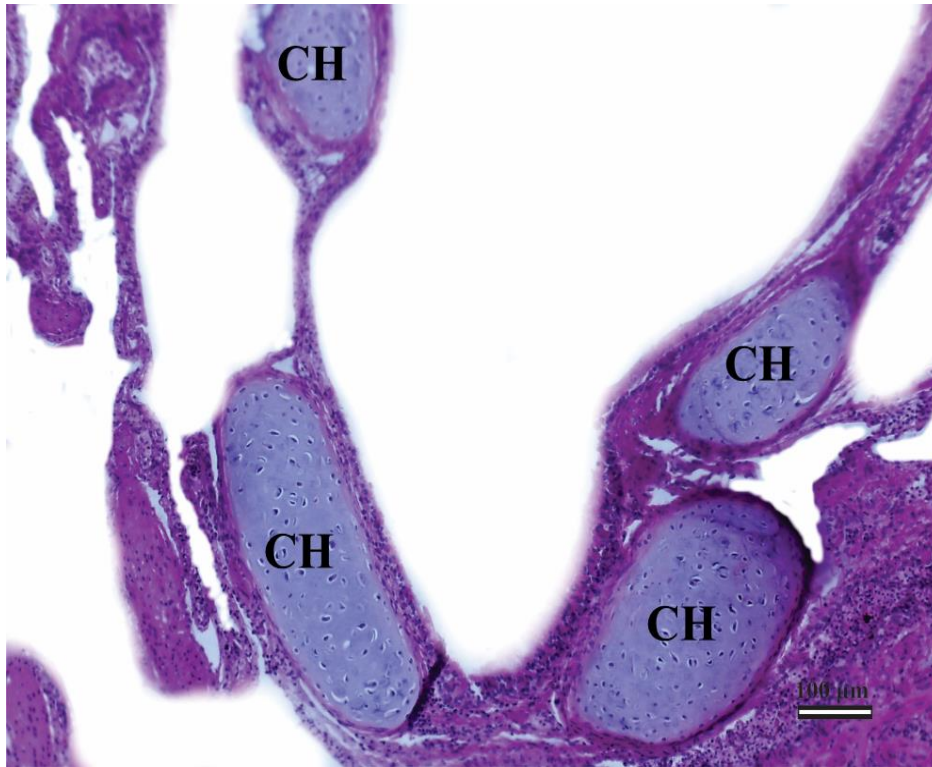
Algumas regiões dos pulmões apresentaram um epitélio cúbico simples, com a presença de cílios e células especializadas na produção de muco. Logo abaixo desse epitélio, foi observado a presença de tecido conjuntivo frouxo, cuja função é oferecer suporte e nutrição à camada epitelial. Ademais, observou-se a presença de tecido conjuntivo denso e não modelado sobre o tecido conjuntivo cartilaginoso (cartilagem de hialina) com condrócitos (Figura 16).

Figura 16 - Corte histológico do pulmão - 40x - E: Epitélio cúbico simples ciliado, TCF: tecido conjuntivo frouxo, TCD: tecido conjuntivo denso, c: condrócitos, → células caliciformes



A cartilagem de hialina presente neste órgão tem como função dar forma e evitar que as vias aéreas se fechem, permitindo a contração e expansão durante o processo de respiração. Os condrócitos presentes nessa cartilagem são responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (Figura 17).

Figura 17 - Corte histológico do pulmão - 10x - CH: cartilagem de hialiana



Em *P. expansa*, no trabalho realizado por Vargas (2015), a região da traqueia apresentou maior quantidade de cartilagem de hialina, e essa cartilagem vai desaparecendo na medida em que os brônquios se ramificam. Além disso, o tipo de tecido epitelial modifica-se de cilíndrico para cúbico.

Em síntese, os pulmões apresentaram projeções sobre a musculatura lisa que formam câmaras que permitem uma área adicional para trocas gasosas. Foi observado epitélio do tipo simples com células secretoras sobre vasos e capilares sanguíneos e a presença de cartilagem de hialina, assim como o descrito em *P. expansa* no trabalho realizado por Vargas (2015).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados corroboram com a hipótese de que as bolsas cloacais podem realizar trocas gasosas. A partir do estudo histológico do órgão, foi possível visualizar a presença de capilares e vasos sanguíneos abaixo do epitélio e a presença de células caliciformes que pode estar relacionada com a produção e secreção de muco. Dessa forma, sugerimos, que podem desempenhar funções semelhantes aos pulmões, confirmando que esse órgão em *P. unifilis* podem realizar trocas gasosas. Entretanto, os pulmões são mais eficientes quando se trata de trocas gasosas, tendo em vista que esse órgão apresenta mais capilares abaixo do epitélio e um número maior de células secretoras de muco, características de órgãos respiratórios, que secretam muco para proteção contra lesões ou desidratação, tendo em vista que o epitélio é uma camada fina.

Se fazem necessários mais estudos anatômicos, fisiológicos e histológicos acerca das bolsas cloacais em *P. unifilis* com a finalidade de testar a hipótese de que esse órgão faz o controle de fluutuabilidade, estocagem de água, umidificação de substrato, controle de fluutuabilidade e trocas iônicas funções que já foram descritas em outras espécies. Além disso, torna-se necessário estudos com espécies com hábitos e habitats diferentes para confirmar a hipótese que o tipo de epitélio desses organismos varia de acordo com os habitats, tendo em vista que em *P. vogli* apesar de ser do mesmo gênero apresentou epitélio diferente, enquanto em *Phrynos geoffroanus* apresentou epitélio semelhante a *P. unifilis* mesmo sendo de família e gênero diferentes.

Quanto aos pulmões não houve diferença, apresentando semelhança com a *Podocnemis expansa*.

REFERÊNCIAS

- ANA – Agência Nacional das Águas. Plano Estratégico da Bacia Hidrográfica dos Rios Tocantins e Araguaia. Disponível em: <https://central.to.gov.br/download/222079>. Acesso em, 21 de junho de 2023.
- ATAÍDES, A. G. et al. Avaliação da influência de fatores hidroclimáticos sobre a estrutura populacional de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) no Rio Formoso, sudeste da Amazônia brasileira. *Lheringia. Série Zoologia*, v. 111, 2021.
- BARBOSA, E. D. Análise da paisagem da bacia hidrográfica do rio Javaés a partir do método GTP – Geossistema, território e paisagem. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente), Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins. 2019. 136 p.
- BAÚ, P. H. T. Mecânica ventilatória, padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius* (Testudines: Cryptodira). Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. Universidade de São Paulo. 2016. 73 p.
- BRAINERD, E. L. New perspectives on the Evolution of lung ventilation mechanisms in vertebrates. *Exp. Biol. On.* V.4; n.2, p. 11-28, 1999.
- CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P.P. Técnicas histológicas. Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, p. 89-188, 2010.
- CARVALHO, A. V.; LOPES, T. K. M., & MALVASIO, A. Importância social de *Podocnemis expansa*, tartaruga-da-amazônia, no rio Javaés, Tocantins, Brasil. *Amazônia-Revista de Antropologia*, p. 609-620. 2021.
- CARVALHO, Y. K. Estudo histomorfofuncional de fígado de primatas (*Callithrix jacchus*) criados em cativeiro / Yuri Karaccas Carvalho. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. Departamento de cirurgia, São Paulo. 2012. 100p.
- CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução N° 1000, de 11 de maio de 2012. Procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Disponível em: <http://portal.cfmv.gov.br/lei/index/idq326> Acesso em 30 de agosto de 2023.
- CORDEIRO, T. E. F. Aspectos comportamentais e morfo-fisiológicos das trocas gasosas de *Phrynops geoffroanus* (Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2019. 188 p.
- COSTA, H. C.; GUEDES, T. B.; BÉRNILS, R. S. Lista de Répteis do Brasil: padrões e tendências. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5838950>, v. 1, 2022, 171p.

DEVOE, R. Anatomia e Fisiologia de Anfíbios e Répteis. In: COLVILLE, TT. & BASSERT, J. M. Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária. 2 Ed. Editora Elsevier Saunders, Rio de Janeiro, 2010, p. 455—478.

FERRARA, C. R. et al. Sound communication in embryos and hatchlings of *Lepidochelys kempii*. Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal, v. 18, n. 2, p. 279-283, 2019.

FERRARA, C. R. et al. Quelônios amazônicos: guia de identificação e distribuição. Manaus: Wildlife Conservation Society Brasil, 2017. 1182 p.

GARCEZ, J. R. et al. Composição da dieta de três espécies de quelônios *Podocnemis* spp. no rio Juruá, Amazonas. Igapó, v.14, n.1, 2020.

GORDOS, M. A; FRANKLIN C. E. Diving behaviour of two Australian bimodally respiring turtles. *Rheodytes leukops* and *Emydura macquarii*, in a natural setting. J. Zool. (Lond.). v. 258, p. 335-342, 2002.

HERNÁNDEZ-HENÃO et al., Anatomia macroscópica e microscópica del sistema urogenital de la Tortuga sabanera *Podocnemis vogli* Muller, 1935 (Testudines, Pelomedusidae). Orinoquia, v. 17, n. 1, p. 120-133, 2013.

HODGES R. D. Histology of the bursa of Fabricius and the thymus. The Histology of the Fowl. Academic Press, London, 1974. p. 205-213.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agro 2017 – Resultados definitivos. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censosagro/index.html> Acesso em, 21 de junho de 2023.

JACKSON, D. C. et al. Avenues of extrapulmonary oxygen uptake in western painted turtles (*Chrysemys picta belli*) at 10°C. Comp. Biochem. Physiol. A, v. 139, p. 221-227, 2002.

JEFFREE, R. A.; JONES, M. K. Accumulation of radiocalcium from the aquatic médium via the cloacal and buco-pharynx of australian freshwater turtles (Cjelidae). Comp. Bioch. Physiol. V. 102^a, n. 1, p.85-91, 1992.

JÖRGENSEN, C. B. Role of urinary and cloacal bladder in chelonian water economy: historical and comparative perspectives. Biological Review Cambridge, n.73, p.347-366, 1998.

KING, P.; HEATWOLW, H. Non-pulmonary respiratory surfaces of the chelid turtle *Elseya lattisternum*. Herptol. V.50, p. 262-265, 1994.

LUZ, V. L. F. et al. Morfometria do trato digestória da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. Revista Brasileira de Zootecnia. p. 10 – 18. 2003.

LYSON, T. R., et al. Origin of the unique ventilatory apparatus of turtles. Nature Communications, v. 5, n. 2014. 5211p.

MALVASIO, A. Estudo anatômico do sistema urogenital e aspectos do sistema digestivo durante o desenvolvimento pós-natal de *Trachemys dorbignyi* (Dumeril & Bibron, 1835) (Reptilia, Testudines, Emydidae). Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. 1996. 68p.

MALVASIO, A. et al. Biologia populacional e reprodutiva de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* no Parque Nacional do Araguaia, Tocantins: um histórico entre os anos 2004 e 2012. p. 77-102. In: PINHEIRO, Biodiversidade na região da ilha do Bananal/Cantão [recurso eletrônico] / Renato Torres Pinheiro. Tocantins: EDUFT, 2019. 150p.

MIORANDO, P. S. Ecologia comparada do tracajá, *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae), em água branca e clara na bacia Amazônica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca. Universidade Federal do Pará. 2016. 111 p.

MOLINA F. D. B. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynops geoffroanus*, *Acanthochelys radiolata* e *Acanthochelys spixii* (Testudines, Chelidae) em cativeiro. Revista de Etologiam v. 1998, p.25-40, 1998.

O'MALLEY, B. Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species. Editora Elsevier Saunders, London, 2005, p. 17-93.

OLIVEIRA, C. A. et al. Location of the ureteral openings in the cloacas of tinamous, some Ratite birds, and crocodilians: a primitive character. Journal of Morphology, p. 234-246, 2004.

OLIVEIRA, M. DE F. Rio Tocantins: lugar de memórias e identidades. Mosaico, v.1, p. 163-168, 2008.

OSATCHUK, B. C. M. Avaliação de microplásticos presentes em concentrados de plaquetas. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2022. 58p.

PERRY, S. F. L. Comparative anatomy, functional morphology, and Evolution. Biology of the Reptilia. (Ed. C. Gans and A. S. Gaunt). 1 – 80. Ithaca, New York: Society for Study of Amphibians and Reptilians, 1998.

PETERS, J. A. Dictionary of herpetology. A brief and meaningful definitions of words and terms used in herpetology. Hafner publishing Company, New York and London. Xii, p. 426, 1964.

PORTOCARRERO-AYA, M. Tortugas del género *Podocnemis*. En: Trujillo, F., Portocarrero-Aya, M., & Gómez, C. (Eds.), Plan de manejo y conservación de especies amenazadas en la Reserva de Biósfera El Tuparro: Delfines de río, Manatíes, Nutrias, Jaguares y Tortugas del género *Podocnemis*. Proyecto Pijiwi Orinoko (Fundación Omacha - Fundación Horizonte verde). Bogotá: Unión gráfica Ltda., p. 77-89. 2008.

RHODIN, A. G. J. (org.). Global Conservation Status of Turtles and Tortoises (Order Testudines). **Chelonian Conservation and Biology**, v. 17, n. 2, p. 135-161, 2018.

RIBEIRO, A. B. N. Captura e implicações da pressão antrópica para o tracajá (*Podocnemis unifilis* Troschel, 1848) na região lagos do município de Pracuúba, Amazônia, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical). Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá. 2012. 81p.

ROSA, M. A. Aspectos anatômicos da cloaca de Testudines. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Uberlândia. 2008. 32p.

RUEDA-ALMONACID, J. V. et al. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo No. 6. Conservación Internacional. Bogotá: Editorial Panamericana, p. 537. 2007.

SALERA G. J. et al., Avaliação da predação de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Javaés, Tocantins. *Acta Amazonica*, v.39, p. 207-213, 2009.

SALERA JUNIOR, G.S. Avaliação da biologia reprodutiva, predação natural e importância social em quelônios com ocorrência a bacia do Araguaia. Tese de Doutorado, Departamento de Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil. 2005. 191 p.

SANTOS J., L. B. Dieta de *Podocnemis erythrocephala* (Testudines: Podocnemididae) no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. 2009.

SANTOS, A. J. B. Aspectos da biologia reprodutiva de *Eretmochelys imbricata* (Testudines, Cheloniidae) no litoral sul do Rio Grande do Norte, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2008.

SANTOS, K. R. P. et al. Manual de técnicas histológicas de rotina e de colorações. 2021.

SEGURO, A. M. S. Acercamiento a las características demográficas y de uso del hábitat de la Tortuga galápagu *Podocnemis vogli* (Testudines, Podocnemididae), en la Reserva Natural Privada Bojonawi (Vichada, Colombia) durante la estación seca. Tese de Doutorado. Instituto de Biología. 2018. 71 p.

SHAFFER, H. B. Turtles (Testudines). **The timetree of life**, v. 398, p. 401, 2009.

SILVA, L. A. G. C. Biomas presentes no estado do Tocantins. Consultoria Legislativa Nota Técnica Câmara dos Deputados, Brasília, DF, Brasil, p. 2-9, 2007.

SMITH, H. M.; JAMES, L. F. The taxonomy significance of cloacal brusae in turtles. *Trans. Kansas Acad. Sci.* 61. 86-96. 1958.

UCAMBIENTAL. Unidades de Conservação no Brasil. Disponível em: <https://uc.socioambiental.org/#pesquisa>. Acesso em 03 de julho de 2023.

UETZ & HOSEK. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/>. Acessado em 21 de junho de 2023.

van DIJK et al. Turtles of the world, 7th Ed. Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. Chelonian Research Monographs, v. 5, p. 329-479. 2014.

VANZOLINI, P. E. On the eggs of Brazilian *Podocnemis* (Testudines, Podocnemididae). Bio Geral Experiment, p. 3-17. 2001.

VANZOLINI, P.E. On clutch size and hatching success of the South American turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Podocnemididae). Anais da Academia Brasileira de Ciências, p. 415-430. 2003.

VARGAS, R. F. Caracterização morfológica da traqueia e pulmão de *Podocnemis expansa* (Podocnemididae, Chelonia) Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2015. 58p.

VOGT, R. C. Tartaruga da Amazônia. Lima, Peru, 2008. 104p.

WINEKEN, J. Respiratory Anatomy – Form and Functions in Reptiles. Exotic Dvm, v. 3.2, 2001.

ZUG, G. R; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. Herpetology, na introductory biology of amphibians and reptiles. Second edition. San Diego, USA, Academic press. 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Protocolo de coloração em Hematoxilina de Harris – Eosina (HE)

Hidratação

1. Xilol 100% – 10 minutos
2. Xilol 100% – 10 minutos
3. Álcool Absoluto I – 1 minuto
4. Álcool Absoluto I – 1 minuto
5. Álcool 95% I – 1 minuto
6. Álcool 95% I – 1 minuto
7. Álcool 70% – 1 minuto

Coloração

8. Água corrente – 2 minutos
9. Hematoxilina de Harris – 2 minutos
10. Água corrente – banho¹
11. Diferenciador (Ácido Clorídrico 1%) – banho
12. Água corrente – 10 minutos
13. Eosina – banho
14. Diferenciador (Ácido Clorídrico 1%) – banho²
15. Água corrente - 1 minuto

Diafanização:

15. Álcool 70% – banho
16. Álcool 95% I – banho
17. Álcool Absoluto – banho
18. Xilol 100% – 1 minuto
19. Xilol 100% – 1 minuto
20. Xilol 100% – Montagem

¹ O banho corresponde à passagem rápida e imediata não superior a 8 segundos entre a colocação do material no produto, retirada e colocação no próximo produto.

² A depender do material, a etapa de banho em diferenciador após a coloração em eosina pode ser suprimida.

ANEXO

Anexo A: Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Araguaína, 10 de novembro de 2020.

O projeto intitulado “Efeito de agrotóxicos em *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) e possíveis implicações em comunidades tradicionais” processo nº 23101.002389/20-31 sob a responsabilidade, **Kellen Lagares Silva Ferreira** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Atenciosamente,

CEUA/UFT