

UniRV-UNIVERSIDADE DE RIO VERDE
FACULDADE DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA E BACHARELADO

**VARIAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DO FÍGADO DE *Phrynops*
geoffroanus (TESTUDINES, CHELIDAE) DURANTE O CICLO
REPRODUTIVO FEMININO**

LUIS ANTONIO BORGES DOS SANTOS

ORIENTADORA: PROF. Ms. SILVIA ROSANA PAGLIARINI CABRAL

Artigo apresentado à Faculdade de
Biologia e Química da UniRV –
Universidade de Rio Verde, como parte
das exigências para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

RIO VERDE - GOIÁS

2013

**VARIAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DO FÍGADO DE *PHRYNOPS*
GEOFFROANUS (TESTUDINES, CHELIDAE) DURANTE O CICLO
REPRODUTIVO FEMININO**

**Luis Antonio Borges dos santos¹
Silvia Rosana Pagliarini Cabral²**

Resumo

O presente estudo descreve as variações histológicas e morfométricas do fígado de *Phrynops geoffroanus*, popularmente conhecido como cágado de barbicha. Foram examinadas seis fêmeas adultas, capturadas nos córregos urbanos de Rio Verde, Goiás, Brasil. A análise envolveu métodos anatômicos e histológicos. Preparações convencionais de rotina histológica foram empregadas utilizando as colorações de Hematoxilina e Eosina, PAS, Tricômico de Gomori e reticulina. O fígado de *P. geoffroanus* é um órgão largo de formato retangular e cor variando de marrom claro a vermelho escuro, com pontos pretos que representam depósitos de melanina. Está dividido em quatro lobos. Os índices hepatossomáticos variaram ao longo do período com maiores médias nos meses de outubro e novembro, quando foram observadas as menores medias dos índices gonadossomáticos.. Os hepatócitos estão organizados em estruturas semelhantes a cordões. Apresentam aspecto poliédrico, com tamanhos variados. O citoplasma é vacuolizado e a maioria dos núcleos estão posicionados na periferia. Grande quantidade de melanomacrófagos estão presentes no parênquima hepático.

Palavras-chave: testudines, morfologia, histologia, hepatócitos, índice hepatossomáticos

¹Acadêmico do curso de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. Universidade de Rio Verde - UNIRV.

²Professora Mestre adjunta da Universidade de Rio Verde – FESURV do Curso Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado.

INTRODUÇÃO

Os Testudines ou Chelonia são os mais antigos grupos de répteis da atualidade. São caracterizados pela presença de casco (carapaça e plastrão), que é a chave do seu sucesso evolutivo. Contam atualmente com 280 espécies. Na América do Sul sua fauna é rica e variada, com aproximadamente 20% das espécies catalogadas na região neotropical (PRITCHARD e TREBBAU, 1984), incluindo representantes de oito das treze famílias viventes, destacando-se a família Chelidae, cujos membros são conhecidos como cágados de pescoço de cobra. O gênero *Phrynops* é um dos mais comuns, com 20 espécies.

A espécie *Phrynops geoffroanus*, apresenta ampla distribuição na região neotropical (Amazônia colombiana, Venezuela, Guianas, Uruguai, norte da Argentina e Brasil, de norte a sul) (GUIX et al., 1989; DUELLMAN, 1979). São comuns em rios e córregos urbanos que recebem esgoto de origem doméstica não tratado das cidades brasileiras, incluindo o córrego Barrinha e Sapó, que atravessam a cidade de Rio Verde.

Apesar de parecerem bem adaptados ao ambiente degradado, estudos indicam que ocorrem alterações celulares, sendo a espécie considerada como sentinela (RIBEIRO, et al., 2010) em estudos de monitoramento ambiental.

Os quelônios são animais de vida longa, mesmo espécies pequenas demoram anos para atingir a maturidade sexual. Espécies maiores têm vida mais longa. A longevidade dificulta o estudo da história de vida do grupo e está geralmente associada a uma baixa taxa de reposição de indivíduos na população, o que pode aumentar o risco de extinção em ambientes poluídos (POUGH et al., 2003).

Assim como nos demais répteis, os padrões de atividade reprodutiva estão geralmente associados aos fatores ambientais (MARION, 1982; SAINT GIRONS, 1982), causando variações cíclicas na morfologia das gônadas, nos níveis de hormônios, e no fígado (CABRAL et al., 2011; MAHMOUD e KLICKA, 1972). Tais modificações influenciam o comportamento reprodutivo da espécie.

Quanto aos aspectos morfológicos o sistema urogenital de tartarugas adultas é constituído em ambos os sexos por um par de rins e ureteres, uma bexiga urinária, um par de bexigas acessórias, gônadas e cloaca (HILDEBRAND, 1995; MALVASIO, 1986; CABRAL et al., 2011).

O fígado da maioria dos vertebrados é formado por dois lobos e situa-se na frente do estômago. Em muitos mamíferos é dividido por fissuras. Nos répteis,

delimitam em até 5 a 6 lobos hepáticos, dependendo da espécie (HILDEBRAND, 1995; ROMER e PARSONS, 1985; ASHLEY, 1969)

O fígado possui múltiplas e complexas funções no organismo. É o local de processos metabólicos vitais, destacando a síntese, armazenamento e degradação de glicogênio, participando do controle da concentração de glicose no sangue, síntese de colesterol e lipoproteínas, ácido láctico, ácido pirúvico, entre outros. Influencia portanto, várias atividades, tais como a hibernação, comum em muitos Testudines, e a reprodução (MOURA, et al., 2009; MARYCZ, et al., 2009; MACHADO-JUNIOR ET AL., 2005). No que se refere ao ciclo sexual feminino, é o local de síntese da vitelogenina, substância precursora da produção do vitelo, durante a fase vitelogênica dos ovários.

O hábito aquático da maioria dos quelônios dificulta as observações na natureza e contribuem para a falta de informações detalhadas sobre sua história natural. São poucos os estudos com ênfase na morfologia e fisiologia dos órgãos associados à reprodução, e este foi um dos principais fatores que motivou-nos a desenvolver esta pesquisa. As informações referentes à biologia reprodutiva de quelônios brasileiros estão direcionadas, geralmente, para estudos da ecologia, estratégias reprodutivas e a interferência da temperatura na determinação do sexo.

A reprodução é um dos imperativos para a perpetuação da espécie e está diretamente relacionada às condições ambientais. No presente trabalho, fêmeas de *Phrynops geoffroanus* serão coletadas em seu ambiente natural, ao longo de um ano, para demonstrar a interferência da sazonalidade na morfofisiologia do fígado e relacionar as possíveis alterações com o ciclo sexual. Este estudo faz parte de pesquisas que investigam a biologia reprodutiva da espécie, desenvolvidos no IBILCE/UNESP e na Universidade de Rio Verde.

Os dados obtidos poderão contribuir para um maior conhecimento dos aspectos relacionados à atividade reprodutiva dos cágados permitindo o desenvolvimento de ações e técnicas de manejo que minimizem o impacto da atividade humana nos ambientes onde estes animais vivem. A degradação dos sistemas aquáticos é uma triste realidade, e é a principal ameaça à sobrevivência do grupo, que sofre com a poluição e o envenenamento da água por esgoto doméstico e agrotóxicos, com a retirada da vegetação natural, que provoca a perda de sombreamento e nutrientes, erosão da margem que diminui os locais de nidificação, e a modificação do substrato dos rios.

MÉTODOLOGIA

1 Coleta e preparação dos animais

Fêmeas adultas de *Phrynops geoffroanus* (N=6) foram coletadas mensalmente no período de agosto de 2012 a junho 2013. (Licença de captura SISBIO, nº 27636-1, código de autenticação: 93479743). As coletas foram separadas de acordo com as estações do ano, sendo consideradas as estações seca (maio a setembro) e chuvosa (outubro a abril). Os animais foram capturados por meio de pesca manual com a utilização de anzóis com fisga em córregos urbanos de Rio Verde, GO, Brasil. Os pontos de coleta recebem esgoto de origem doméstica, e estão bastante degradados devido à atividade antrópica.

Os animais capturados foram transportados ao Laboratório de Zoologia FESURV/Universidade de Rio Verde. Foram mortos de acordo com as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), utilizando-se dosagens elevadas do anestésico Cloridrato de Ketamina administrados por injeção intraperitoneal, e/ou decapitação.

Dados biométricos como o comprimento máximo da carapaça (cmc), e comprimento máximo do plastrão (cmp) foram obtidos, segundo o método descrito por Cagle (1939) apud Molina (1998).

Os animais foram abertos com serra circular vibratória, adequada para osteotomia. Após a remoção do plastrão, os órgãos foram afastados para melhor visualização das vísceras e posterior foto documentação. O sistema reprodutor e o fígado foram removidos e submetidos aos demais procedimentos.

O fígado e gônadas foram pesados (g) por uma balança analítica de precisão (0,01g) e suas massas (peso em gramas), combinadas com o peso do corpo para o cálculo do índice hepatossomático e gonadossomático (IHS= massa total do fígado/ massa total do corpo x 100. IGS= massa total do ovário/ massa total do corpo x 100). Os índices de cada animal serão comparados entre si e ao longo do período estudado.

2 Preparação do tecido para microscopia

Fragmentos do fígado, foram retirados de diferentes lobos hepáticos. Após serem fixados em solução de Formalina 10% por 24 horas, e desidratados em série crescente de álcool, foram incluídos em parafina. Secções de 5 µm cortadas e posteriormente coradas com Hematoxilina-Eosina e PAS (Periodic Acid Schiff's), Tricômico de Gomori e reticulina.

3 Análise Biométrica, histológica e fotomicrográfica

Para análise biométrica o IHS e o IGS foram comparados entre si e ao longo das estações seca e chuvosa. Para análise histológica, as lâminas montadas foram observadas por microscópio de luz e analisadas por meio do programa de análise de imagens, do Laboratório de processamento Histológico e Análise de Imagens da UniRV/Universidade de Rio Verde. Três laminas para cada secção foram analisadas. Para verificar se houve variação morfológica do fígado, os dados biométricos foram correlacionados entre si, com as estações seca e chuvosa e como *status* dos ovários. Para as análises morfométricas foram analisados 30 hepatócitos por animal. Foram fotografados 10 campos diferentes por laminas, padronizando a objetiva de 40X. Em seguida, foram aleatoriamente selecionados 3 hepatócitos em corte transversal por lamina, medindo-se a área e o perímetro do núcleo e citoplasma.

Para verificar se houve variação morfológica do fígado, os dados biométricos e morfométricos serão correlacionados entre si, com as estações seca e chuvosa e com o status dos ovários.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais apresentaram peso médio de 2,29 kg (1,69- 2,84). O comprimento médio da carapaça foi de 31 cm e a largura média de 25,52 cm. A média de tamanho das fêmeas adultas desta espécie e de 25 cm (MOLINA, 1998). Em *Phrynops geoffroanus* as fêmeas são maiores que os machos.

O fígado de *P. geoffroanus* é um órgão bastante volumoso, ocupando grande parte da cavidade geral do corpo, posicionado na região pleuroperitoneal. Topograficamente está relacionado em sua face ventral com os pulmões, na porção cranial dos lobos medial e lateral esquerdos com o coração, na porção ventrocaudal dos

lobos esquerdos com o estômago e ventrocaudal direita com o intestino. Sua porção caudal esta em contato também com os ovários e ovidutos. (Figura 1 A)

Apresenta formato retangular e sua cor variou entre marrom claro a vermelho escuro. Possui grande quantidade de pontos pretos que representam deposito de melanina. É dividido em 4 lobos, separados por fissura, assim denominados: lateral e medial direito e lateral e medial esquerdo. (Figura 1B). A vesícula biliar está inserida na porção ventral do lobo lateral direito, de onde parte o ducto biliar, que desemboca no duodeno (Figura 1C). Esta descrição esta de acordo com Moura, Santos e Belleti, 2009 para a mesma espécie, porém difere de outros Testudines como *Kinosternon scorpioides*, que possui cinco lobos (Machado Junior, 2005), *Trachemys scripta elegance* com dois (PAGANOTTO e RODRIGUES, 2007) e três nas tartarugas marinhas *Chelonia midas*, *Lepidochelys olivacea*, *Eretmochelys imbricata* e *Dermochelys coriácea* (OLIVEIRA et al., 2010).

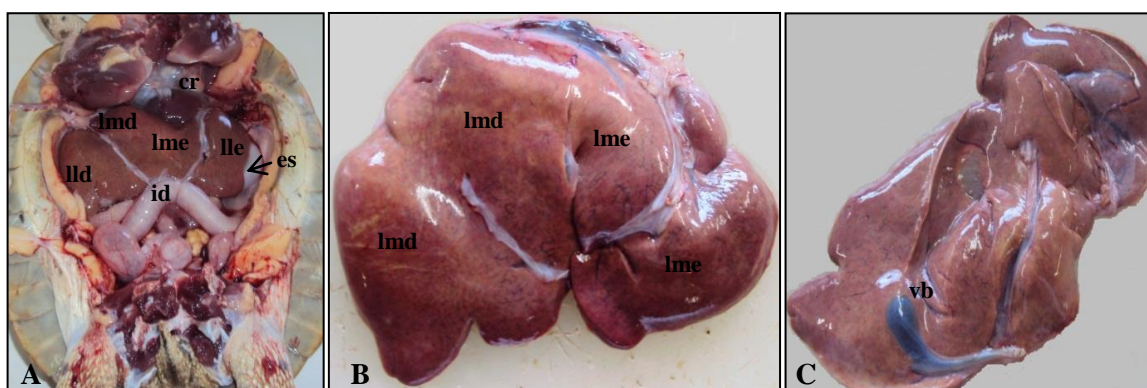


Figura 1. Fígado de *Phrynops geoffroanus*. A. Vista ventral da cavidade geral do corpo onde são indicados os lobos do fígado: lobo lateral direito (lld), lobo medial direito (lmd), lobo medial esquerdo (lme), lobo lateral esquerdo (lme) e sua relação com as vísceras: intestino delgado (id), estômago (es) coração (cr). B. Detalhe do lobos hepáticos: lobo lateral direito (lld), lobo medial direito (lmd), lobo medial esquerdo (lme), lobo lateral esquerdo (lme). Vista ventral do fígado indicando a vesícula biliar (vb) no lobo lateral direito.

O peso do fígado variou de 55,7g a 77,1g e os índices hepatossomáticos variaram de 2,46 a 4,76, sendo que os maiores índices foram observados no mês de outubro e o menor no mês de maio. (Figura 2A). Comparando com a condição dos ovários, os índices gonadossomáticos apresentaram as menores médias no mês de outubro e maiores no mês de maio. Agrupando os animais entre estação seca e chuvosa

foram observados os menores índices hepatossomáticos e gonadossomáticos na estação seca e maiores na estação chuvosa (Figura 2B).

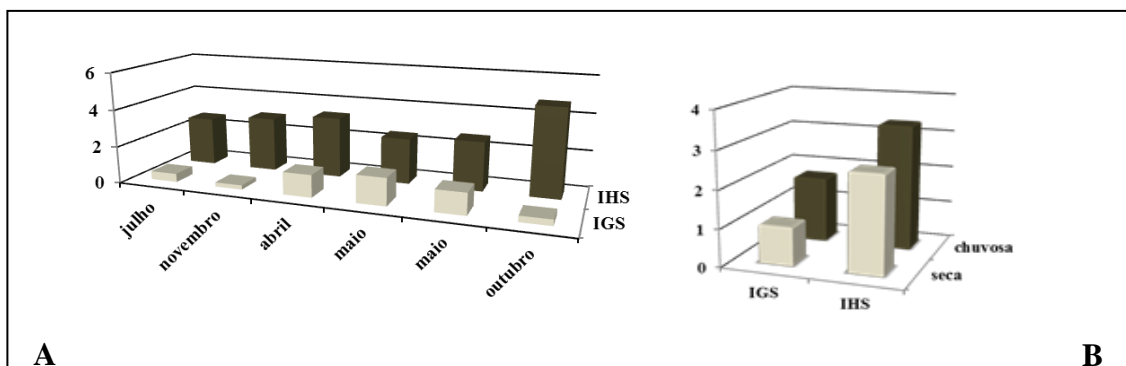


Figura 2. Variação dos índices hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS). A. Variação mensal do IGS e IHS. B. Variação do IGS e IHS entre as estações seca e chuvosa.

As variações nos índices hepatossomáticos e gonadossomáticos são esperadas durante o ciclo reprodutivo devido ao papel desempenhado pelo fígado no processo vitelogênico e ao grau de desenvolvimento dos ovócitos nos ovários, respectivamente. É no fígado que ocorre a síntese de vitelogenina, a partir de substâncias precursoras. Este processo é induzido por estrogênios (PALMER e PALMER 1995). Em seguida, a vitelogenina é liberada para a circulação sanguínea, transportada para os ovários e captada pelos ovócitos em crescimento, onde será convertida em formas de armazenamento.

Os maiores índices hepatossomáticos observados neste estudo coincidiram com as menores medias de IGS (Figura2A). No mês de outubro, quando foi observada grande diferença entre o IHS e IGS, nos ovários do animal haviam ovócitos pouco desenvolvidos e somente alguns de coloração amarelada, o que indica o início da vitelogênese nos ovários. Podemos inferir que o fígado de *P. geoffroanus* neste período está em fase vitelogênica devido ao seu peso aumentado e a grande quantidade de grânulos de secreção. Não haviam ovos nos ovidutos do animal.

Histologicamente o fígado de *P. geoffroanus* é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denominada cápsula hepática, responsável pela divisão do fígado em lobos (MOURA et al., 2009).

Assim como descrito para *Testudo graeca*, (FERRER, ZUASTI, BALESTRA et al., 1987) o fígado de *P. geoffroanus* está organizado em lóbulos em forma de cordões

laminares, sendo cada cordão envolto por vasos do sistema portal e ductos biliares (Figura 3 A e B). Cada lóbulo contém células parenquimatosas chamadas hepatócitos.

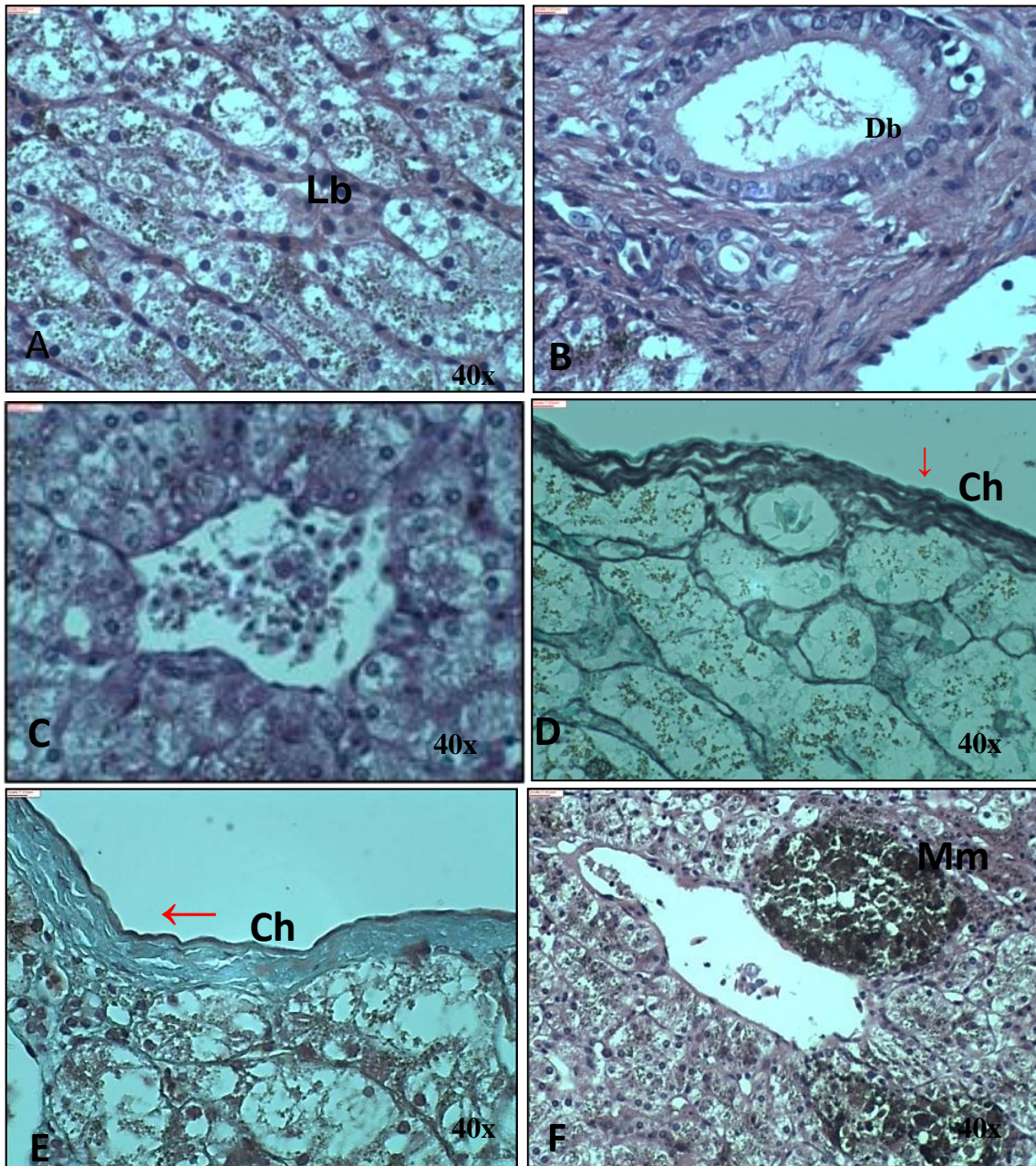


Figura 3. Fotomicrografia do fígado de *Phrynos geoffroanus*. A. Aspecto geral do parênquima hepático organizado em lóbulos (Lb), formando cordões onde estão inseridos os hepatócitos (Hp) hematoxilina e eosina. Seta: núcleo dos hepatócitos. B. Secção onde é visualizado um vaso portal (Vp) e ducto biliar (Db) (HE). C Secção evidenciando reação positiva ao PAS. D. Cápsula hepática (Ch) e parênquima hepático evidenciando as fibras reticulares (Reticulina). .E. Cápsula hepática (Ch) evidenciando as fibras colágenas(Tricomico de masson). F. Agregação de células pigmentares: melanomacrófagos (Mm) Hematoxilina e Eosina.

Os hepatócitos possuem formato poliédrico e os tamanhos são variados. Os núcleos foram observados no centro e na periferia da célula (maioria). O citoplasma é altamente vacuolizado e com grande quantidade de grânulos.

As diferentes técnicas de coloração empregadas no estudo evidenciaram a presença de fibras reticulares na cápsula e em torno dos hepatócitos (coloração por reticulina) e fibras colágenas (Figura 3 D e E). A coloração por hematoxilina e eosina revelou um citoplasma pouco eosinofilo e altamente vacuolizado. Os hepatócitos são fortemente reativos ao PAS, o que pode ser atribuído a grande quantidade de glicogênio (Figura 3C).

Todas as técnicas de coloração empregadas neste trabalho revelaram grande quantidade agregações de células pigmentares no parênquima hepático de *P. geoffroanus*. Estas células são depósitos de melanina geralmente denominadas de melanomacrófagos (Figura 3F). Tais células foram descritas para vários grupos de vertebrados incluindo peixes, anfíbios e répteis (JOHSON et al., 1999), e estão distribuídas em diferentes órgãos. As funções atribuídas aos melanomacrófagos incluem a síntese de melanina, e fagocitose e neutralização de radicais livres.

Os hepatócitos apresentaram área média de 302,26 μm^2 e perímetro médio de 68,11 μm . Os núcleos dos hepatócitos apresentaram área média de 25,95 μm^2 e perímetro médio de 18,02 μm (Tabela 1). Os valores das médias obtidas da área e perímetro dos hepatócitos foram mais altas em abril e outubro, quando foram observados os maiores índices hepatossomáticos. As medidas de área e perímetro do núcleo dos hepatócitos foram semelhantes entre os meses analisados.

Tabela 1. Variação morfométrica dos hepatócitos de *Phrynops geoffroanus* durante o ciclo reprodutivo feminino.

Meses	Área do núcleo	Perímetro do núcleo	Raio do núcleo	Área dos Hepatócitos	Perímetro dos hepatócitos
Abril	25,06	17,65	2,79	370,75	73,32
Mai	25,99	18,23	4	261	67,64
Setembro	25,47	17,82	2,91	241,27	60,19
Outubro	27,3	18,4	2,92	336,05	71,32
Médias	25,95	18,02	3,15	302,26	68,11

Histologicamente os hepatócitos mostraram aumento de área citoplasmática nos meses de abril e outubro que coincidem com os período de menores valores de IGS. Isto se dá por ser uma época do ano em que está havendo reposição energética para o próximo período reprodutivo e que inclui a produção de vitelogenina depositada no citoplasma destes hepatócitos.

CONCLUSÃO

A organização histológica do fígado é semelhante às descrições de outras espécies, formado por células parenquimatosas chamadas hepatócitos, que possuem formato poliédrico e tamanhos variados. Os núcleos foram observados no centro e na periferia da célula. Houve variação dos índices hepatossomáticos e gonadossomáticos durante o ciclo reprodutivo. Por está havendo reposição energética para o próximo período reprodutivo e que inclui a produção de vitelogenina depositada no citoplasma destes hepatócitos.

A área dos hepatócitos aumentou, quando foram observadas as maiores médias de IHS.

REFERÊNCIAS

- ASHLEY, L.M. 1969. **Laboratory Anatomy of the Turtle**, 1ª ed. WM. C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa p.32-36.
- CABRAL, S.R.P.; SANTOS, L.R.S; FRANCO-BELUSSI, L; ZIER I.R.; ZAGO, C.E.S.; e OLIVEIRA, C. Anatomy of the male reproductive system of *Phrynops geoffroanus*(Testudines: Chelidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá**, v. 33, n. 4, p. 487-492, 2011
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. Atheneu, SP.700p.
- MACHADO JÚNIOR, A.A.N.; SOUSA, A.L.; CARVALHO, M.A.M.; SANTOS, F.C.F.; ALVES, F.R. ANATOMIA DO FÍGADO E VIAS BILÍFERAS DO MUÇUÃ (*Kinosternon scorpioides*) Archives of Veterinary Science v. 10, n. 2, p. 125-133, 2005.
- MOLINA, F.B. 1998. Comportamento e biologia reprodutiva dos cágados *Phrynops geoffroanus*, *Acanthochelis radiolata* e *Acanthochelis spixii* (Testudines, Chelidae) em cativeiro. **Revista Brasileira de Etologia** (nº especial) p 25-40.

MOURA, L.R.; SANTOS, A.L.Q.; BELLETI, M.E.; VIEIRA, L.G.; ORPINELLI, S.R.T.; DE SIMONE, S.B.S. Morphological aspects of the liver freshwatet turtle *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae). Braz. J. Morphol. Sci, Vol 26 n 3-4, p.129-134.