



Universidade Federal do Pará
Campus Universitário de Altamira
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

PPGBC

Brenda Stefany dos Santos Braga

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Kinosternon scorpioides*
(Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae)

ALTAMIRA – PA

MARÇO – 2019

Universidade Federal do Pará
Campus Universitário de Altamira
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

Brenda Stefany dos Santos Braga

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Kinosternon scorpioides*
(Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^{ra}. Dr^a. Diva Anélie de Araújo
Guimarães

ALTAMIRA – PA
MARÇO – 2019

Brenda Stefany dos Santos Braga

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Kinosternon scorpioides*
(Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Diva Anélie de Araújo

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Karina Dias da Silva
UFPA

Prof^a. Dr^a. Rosemar Silva Luz-Ramos
UFPA

Prof^a. Dr^a. Simone do Socorro Damasceno Santos
UFPA

ALTAMIRA-PA

2019

*A todos os embriões utilizados
neste estudo.*

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de carácter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem. A compaixão por todos os seres vivos é a prova mais firme e segura da conduta moral”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Diva Guimarães, pelo apoio, reuniões, advertências e ensinamentos transmitidos. Sou grata, por ter confiado em meu trabalho desde a iniciação científica e por estar comigo durante toda a minha trajetória acadêmica.

A Prof^ª. Dr^ª. Verônica Oliveira-Bahia, pelo apoio e dedicação à uma aluna que tomou conta de todo o seu laboratório e ainda tem a coragem para culpar seus alunos. Brincadeiras à parte, todos os ensinamentos repassados a mim, foram de absoluta importância para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Gratidão aos meus pais, pelo amor, carinho e paciência. E por terem respondido todos os meus porquês, durante a infância, o que com certeza me instigaram a ser a pesquisadora que se encontra aqui hoje. A minha irmã, por ter demonstrado a mim que paciência é uma virtude, e que se você consegue dividir o espaço com sua irmã, você com certeza sabe se virar em uma república, com oito meninas.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC) pela formação. Assim como, a todo corpo docente deste Programa que nos acolheram, e nos engradeceram como mestrandos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte.

A Fundação Amazônia de Amparo à Estudos e Pesquisa, pelo apoio financeiro.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Campus Emerson Salimos de Salvaterra, por nos cederam o espaço físico. Ao Professor Ribamar Marques, que nos permitiu a realização deste trabalho, e pela concessão das amostras. Aos técnicos da empresa e principalmente ao Relionan Leal pela companhia, apoio e orientações durante o tempo no alojamento. Ao Professor Dário Lisboa-Neto pelas orientações, por ter cavados diversos ninhos para a nossa pesquisa, por todas as caronas e cervejas na orla de Salvaterra. Ao Leonardo por ter saído de casa, para cavar ninhos e cuidar os ovos de muçãs, quando lhe foram solicitados.

Ao Laboratório Multidisciplinar de Morfofisiologia Animal pelo suporte, e a todos os amigos que compõem essa equipe: Aliceane, Gabriella, Jhennifer, Maria Luiza, Tiago, João, Juliana, Gabriel, Bianca. As minhas irmãs científicas que trilharam caminhos diferentes, mas sempre que podem estão presentes e tenho certeza que torcem por todas as nossas realizações: Cereja, Cynthia, Ailin. E a todos os alunos que já passaram por lá, seja como rotatórios ou voluntários, ver o interesse de vocês pelas tartaruguinhas, me fez gostar ainda mais do meu trabalho. Ao Professor Marcelo Bahia, pelas discussões divertidas e tantos *abstracts*.

Ao laboratório de Técnicas Histológicas, de Imunohistoquímica e Biologia do Desenvolvimento e ao de Ultraestrutura celular. Muito obrigada, Professora Dr^ª. Maria Auxiliadora Ferreira, pelos conselhos acadêmicos e apoio. Gratidão também a Professora Dr^ª. Rossineide Rocha, por todo apoio. E a toda equipe de histologia da UFPa.

Muito obrigada, Marília Ribeiro, alguém que considero muitíssimo importante na trajetória deste trabalho, pois durante toda esta jornada estive comigo, escutando todas as reclamações e sendo um ombro amigo nas horas em que o desespero vinha à tona. E por ler todos os meus trabalhos e ainda ter que adicionar comentários.

Também agradeço, aos meus amigos da Biologia, Raissa Couteiro pelo carinho e amizade, a Lorena Sanches por responder minhas mensagens desesperadas, sobre a diafanização dos embriões e ao Yuri Willkens por ter tido a paciência de junto comigo, fotografar todos os meus embriões e por fazer automontagem de 15 imagens.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Helminologia “Prof^ª. Dr^ª. Reinalda Marisa Lanfredi, e ao Professor Dr. Tiago Melo, por ter cedido o estereomicroscópio para fotografar estas lindas imagens apresentadas neste trabalho.

As amigas de Altamira: Samantha, Liriann, Tamyris, Leandra, Renara, Keila e Iluany pela companhia, momentos divertidos e troca de conhecimento. O enriquecimento pessoal que tive com vocês, foi de suma importância. Os campos da Leandra foram ótimos, e o Rio Xingu é lindo.

A todos os colegas da turma PPGBC 2017, pelas contribuições, aprendizado, cervejas, milk-shakes, marmitas, churrascos e cafés.

A Professora Dr^ª. Karina Dias e ao Professor Dr. Leandro Brasil pelas orientações com a estatística e por sempre me lembrarem que se tratando dessa disciplina, as vezes o mais simples é o mais eficaz para representar nossos dados.

A toda minha família, que torceram durante toda essa trajetória, e se preocupavam comigo durante minhas viagens ao Marajó, principalmente meus avós Graça e Francisco.

A minha pequena escudeira Eva (minha cadela), que esteve ao meu lado enquanto eu escrevia, que me procurava pela casa quando ouvia minha voz ao telefone, durante o tempo em que estive em Altamira.

A toda natureza em toda sua perfeição, eterno objeto de pesquisa dos profissionais que estudam a vida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com esta etapa da minha trajetória acadêmica.

Muita Obrigada.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1- <i>Kinosternon scorpioides</i> (Chelonia: Kinosternidae)	16
1.2- Embriologia de quelônios.....	19
1.2.1- Osteogênese de quelônios	21
2- OBJETIVO	23
2.1- Objetivo geral.....	23
2.2- Objetivos específicos.....	23
3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
4- CAPÍTULO I: Desenvolvimento embrionário de <i>Kinosternon scorpioides</i> (Linnaeus, 1776) (Chelonia: Kinosternidae).....	30
5- CAPÍTULO II: Desenvolvimento esquelético dos membros de <i>Kinosternon scorpioides</i> (Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae)	57
6- CONCLUSÃO GERAL	83

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1: Espécime adulto de *K. scorpioides*. Fonte: Brenda Braga em 19/10/2017 16
- Figura 2: A) Dimorfismo sexual de *K. scorpioides*, onde os machos (esquerda) possuem o plastrão côncavo e a cauda é mais robusta (circulo), e nas das fêmeas (direita) é plano e a cauda é menor. B) Acasalamento de *K. scorpioides*. Fonte: Brenda Braga (28/08/2018) 18
- Figura 3: Fêmea de *K. scorpioides* em postura. Fonte: Brenda Braga (29/07/2017). 19

CAPÍTULO I

- Figura 1: Estágios de desenvolvimento embrionário em função dos dias de incubação de *K. scorpioides*..... 46
- Figura 2: Estágios de 10 a 14 de *K. scorpioides* (escala igual a 2mm), destaque para a morfologia do membro posterior e anterior à direita. A) Estágio 10: Presença de quatro arcos faríngeos (Ar), da vesícula óptica (Vs op) e do membro anterior (M a). B) Estagio 11: região da pupila (Pu) pode ser vista, além do membro posterior (M p). C) Estagio 12: pode ser notada a presença do processo maxilar (P mx) e mandibular (P md). D) Estágio 13: região da íris (Ir) presente e pigmentada, exceto na lista branca na região inferior do olho. E) Estágio 14: Conexão do processo nasal (P ns) com o processo maxilar (P mx), presença da borda lateral da carapaça (Ca), presença da placa digital (P d) nos membros 47
- Figura 3: Estágios de 15 a 18 de *K. scorpioides* (escala igual a 2mm), destaque para a morfologia dos membros posterior e anterior. A) Estágio 15: carapaça (Ca) formada, começo dos dígitos (Di) é percebido na placa digital. B) Estagio 16: Pálpebra superior (Pa s) foi visualizada, além do plastrão (Pl) e dígitos (Di) (de forma evidente) na placa digital. C) Estágio 17: visualização da pálpebra inferior (Pa i), maxila (Mx) e mandíbulas (Md) formados, escudos vertebrais (Es v) presentes na carapaça, borda (Bo) da placa digital serrilhada. D) Estágio 18: Escudos marginais (Es M) da carapaça, dígitos (Di) além da placa digital..... 48
- Figura 4: Estágios de 19 a 22 de *K. scorpioides* (escala igual a 4mm), destaque para a morfologia dos membros posterior e anterior. A) Estágio 19: princípio do escudo peitoral (Es p) do plastrão. B) Estágio 20: garras (Ga) despigmentadas com pontas grossas. C) Estagio 21: garras (Ga)

pigmentadas e curvas. D) Estágio 22: escudo peitoral (Es p) formado, garras com pigmentação (Pig) na parte proximal 49

Figura 5: Estágios de 23 a 26 de *K. scorpioides* (escala igual a 6mm), destaque para a morfologia dos membros posterior e anterior. A) Estágio 23: garras (Ga) longas e curvas. B) Estágio 24: narinas (Na) abertas, formação da falange ungueal (Fa un). C) Estágio 25: escamas (Ec) nos membros são evidentes, falange ungueal vista coberta por um involucro translúcido. D) Estágio 26: hérnia (He) umbilical fechada, involucro que recobria falange ungueal (Fa un) estão gastos 50

Figura 6: Volume do tubo gastroentérico (TG), coração (CO) e fígado (FI), em função do volume do corpo de embriões de *K. scorpioides*..... 53

Figura 7: Probabilidade de ocorrência de caracteres externos macroscópicos, em embriões de *K. scorpioides*, em função do comprimento da carapaça 54

CAPÍTULO II

Figura 1: Anatomia dos membros de *K. scorpioides*. A) Visão latero-dorsal do membro anterior direito, demonstrando os ossos úmero (Um), ulna (Ul), rádio (Ra), intermédio (I), ulnar (U); região carpal (CA): central III (C III), central II (C II), carpal distal I (Dc I), carpal distal V (Dc V); Metacarpais (MC): metacarpal V (Mc V); Falanges (FA): falange proximal V (Fp V), falange medial V (Fc V) e falange distal V (Fd IV). B) Visão latero-dorsal do membro posterior esquerdo, nota-se os ossos fêmur (Fe), tíbia (Ti), fíbula (Fi); região tarsal (TA): astrágalo-calcâneo (A-C), tarsal distal I (Dt I), tarsal distal IV (Dt IV); Metatarsais (MT): metatarsal V (Mt V); Falanges (FA): falange proximal V (Fp V), falange medial V (Fc V) e falange distal V (Fd IV). 74

Figura 2: Osteogênese dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpioides*. A) Estágio 14, aparecimento do úmero (Um) e do fêmur (Fe) (escala 5 mm). B) Estágio 15 centros de condrogênese, no rádio (Ra) e ulna (Ul), na tibia (Ti) e fibula (Fi) (escala 4 mm). C) Estágio 16, surgimento do intermedio (I), ulnar (U) e central III (C III), carpais tarsais (Cd) e metacarpais (Mc), além do astrágalo (A), calcâneo (C), tarsais distais (Td) e metatarsais (Mt) (escala 5 mm). D) Estágio 17, falanges proximais (Fp) e o astrágalo (A) (escala 5 mm). E) Estágio 18, aparecimento dos moldes de cartilagem do central II (C ii), das falanges centrais (Fc) e distais (Fd), e do pisiforme (Pi), (escala 5 mm). 75

Figura 3: Desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpioides*, (escala 5 mm). A) Estágio 19, junção do astrágalo-calcâneo (A-C). B) Estágio 20 começo de pigmentação com alizarina no úmero (Um) e fêmur (Fe). C) Estágio 21, semelhante ao estágio anterior. D) Estágio 22. Os ossos longos apresentaram a diáfase corada com Alizarina, são eles: úmero, ulna (Ul), rádio (Ra), metacarpais (Mc), falanges distais (Fd), centrais (Fc) e proximais (Fp), tibia (Ti), fibula (Fi), metatarsais (Mt) e falanges distais (Fd), centrais (Fc) e proximais (Fp). E) Estágio 23 membros com cartilagem articulares (Ar) 76

Figura 4: Desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpioides*, (escala 2 cm). A/B) Estágio 24 e 25, semelhante ao estágio anterior. C) Estágio 26, embrião em pré-eclosão apresentando cartilagens na região carpal e tarsal (U) (A-C), exceto em carpais/tarsais distais (Mc)..... 77

Figura 5: Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido esquelético dos membros anteriores de embriões de *K. scorpioides*. A) estágio 14, células mesenquimais formando o membro, e aglomerado de células onde virá a ser o úmero (Um). B) estágio 15, mostrando o condensamento de células onde vira a ser a ulna (Ul) e o rádio (Ra)..... 78

Figura 6: Cortes histológicos dos membros anteriores de *K. scorpioides*. A) estágio 16, condrogênese dos ossos úmero, ulna (Ul), rádio (Ra), ulnar (U), intermédio (I), centrais (Ce), carpais distais (Cd) e metacarpais (Mc). B) estágio 16, condrogênese do rádio, mostrando o pericôndrio (P), a região crescimento (RC), condrócitos (Ci) imaturos, e condrócitos (Co) em desenvolvimento..... 79

Figura 7: Cortes histológicos dos membros anteriores de *K. scorpioides*. A) Estágio 17, região autopodial da mão, mostrando os metacarpais (Mc), falanges proximais (Fp) e mediais (Fm). B) Estágio 17, região carpal mostrando os carpais distais (Cd), intermédio (I), centrais (C) ulnar (U)..... 80

Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido esquelético dos membros posteriores embriões de *K. scorpioides*. A) estágio 15, mostrando o condensamento de células onde vira a ser a tibia (Ti) e a fíbula (Fi). B) estágio 16, condrogênese dos ossos tibia, fíbula, calcâneo (C), distais tarsais (Td) e metatarsais (Mt) 81

Figura 9: Cortes histológicos dos membros posteriores de *K. scorpioides*. A) Estágio 17, mostrando o fêmur (Fe), tarsais distais, metatarsais e falanges proximais (FP). B) Estágio 17, região tarsal mostrando astrágalo (A) e calcâneo (C) e carpais distais (Cd). C) Estágio 17, região autopodial do pé, mostrando os metatarsais (Mt), falanges proximais (Fp) e centrais (Fc)..... 82

RESUMO

Kinosternon scorpioides é um quelônio presente nas América do Sul e Central, que é muito utilizado para o consumo, como o que ocorre na ilha de Marajó-PA, Brasil. Devido a poucas pesquisas realizadas com esta espécie, é necessário ampliar os estudos sobre a sua biologia, visando a conservação *in situ* e o manejo *ex situ*. Assim, o estudo sobre o desenvolvimento embrionário em quelônios contribui para o melhor entendimento da influência da temperatura na determinação sexual, nas condições ideais para a incubação e na eclosão dos ovos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os estágios de desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides*, além de descrever a osteogênese dos membros anteriores e posteriores. As amostras foram coletadas no criatório científico de muçuãs do Campus experimental Ermerson Salimos-Embrapa Amazônia Oriental. Durante o período de incubação, a cada cinco dias, foram coletados os ovos fertilizados, a partir da desova até a eclosão. Foram realizadas análises morfológicas, descrições dos estágios de desenvolvimento embrionário, verificado o volume do corpo, coração, fígado e do tubo gastroentérico. Os estágios 10 a 12 foram classificados pela presença dos arcos branquiais, vesícula óptica e ótica, além de membros; 13 a 17 pelos membros, carapaça e broto urogenital; 18 a 22 notou-se a membrana interdigital nos membros, a formação da falange ungueada e pigmentação ao longo do corpo; e 23 a 26 pela presença de garras, pigmentação densa, absorção do vitelo e fechamento da hérnia umbilical. As análises osteogênicas foram realizadas em três animais, de cada fase de desenvolvimento. A partir do estágio 10 e 11 foram observadas as células mesenquimais. Estas foram vistas condensadas no estágio 14, sugerindo a presença do primeiro centro de condrogênese do úmero e do fêmur. No estágio 15 foram observados: ulna, rádio, tíbia e fíbula. No estágio 16 estavam presentes os ossos carpais/tarsais e metacarpais/metatarsais. No estágio 17 foram observadas as falanges. No estágio 18 foram vistos todos os moldes de cartilagem que compõem os ossos da mão e do pé. No estágio 20 foi notada ossificação a partir da diáfase do úmero e do fêmur, que seguiu para os metacarpais e metatarsais no estágio 22. No 23 os ossos longos dos membros já apresentavam ossificação, que se estendeu até a eclosão. Os resultados contribuem para o melhor entendimento dos aspectos ontogênicos desta espécie, auxiliando as boas práticas de manejo *ex situ* durante a incubação, e servem de base para os estudos filogenéticos entre esses grupos, além de facilitar a compreensão dos efeitos climáticos e ambientais na temperatura pivotal e diferenciação sexual de embriões durante desenvolvimento embrionário de quelônios.

Palavras-chave: Embriologia, morfometria, ontogenia, osteogênese, Kinosternidae.

ABSTRACT

Kinosternon scorpioides is a chelonium from South and Central America, which is widely used as food, such as occurs on the island of Marajó-PA, Brazil. Due to the few research done with this species, it is necessary to expand the studies on its biology, aiming its *in situ* conservation and *ex situ* management. Thus, the study on embryo development in chelonians contributes to a better understanding of the influence of temperature on sexual determination and in the ideal conditions for incubation and egg hatching. The objective of this work was to characterize the stages of embryonic development of *K. scorpioides* and, in addition, to describe the osteogenesis of the anterior and posterior limbs. The samples were collected in the scientific nursery of the experimental Campus Ermerson Salimos-Embrapa Amazônia Oriental. During the incubation period, every five days, the fertilized eggs were collected, from spawning to hatching. Morphological analyzes and descriptions of the stages of embryonic development, body volume, heart, liver and gastroenteric tube were performed. Stages 10 to 12 were classified by the presence of the gill arches, optic vesicle and otic, in addition to limbs; 13 to 17 by limb morphology, carapace and urogenital protuberance; 18 to 22 the interdigital membrane in the limbs was noted, the formation of the phalangeal ungulate and pigmentation along the body; and 23 to 26 by the presence of claws, dense pigmentation, absorption of the calf and closure of the umbilical hernia. Osteogenic analyzes were carried out on three animals at each stage of development. From stage 10 and 11 the mesenchymal cells were observed. These were condensed in stage 14, suggesting the presence of the first center of chondrogenesis of the humerus and femur. In stage 15, ulna, radius, tibia and fibula were observed. In stage 16, the carpal / tarsal and metacarpal / metatarsal bones were present. In stage 17, the phalanges were observed. In stage 18 all the cartilage molds that make up the bones of the hand and foot. In stage 20 ossification was noted from the diaphase of the humerus and femur, which followed to the metacarpal and metatarsals in stage 22. In stage 23, the long bones of the limbs already showed ossification, which extends until the hatching. The results contribute to a better understanding of the ontogenic aspects of this species, helping in good *ex situ* management practices during incubation procedures, and maybe used as a basis for phylogenetic studies among these groups, as well as facilitating the understanding of climatic and environmental effects in the pivotal temperature and sexual differentiation of embryos during the embryonic development of chelonians.

Key words: Embryology, morphometry, ontogeny, osteogenesis, Kinosternidae.

1- INTRODUÇÃO GERAL

Os quelônios estão entre os táxons mais ameaçados de extinção, entre os organismos que compõem o ecossistema amazônico (FAGUNDES, 2015). Devido à diversos fatores como a demanda elevada para o consumo (CRISTO et al., 2017), pelas populações amazônicas desde antes a chegada dos europeus, tida como um aspecto da cultura local (RÊBELO e PEZZUTI, 2000; JUNIOR et al., 2016; MATEUS e HIGUCHI, 2018), e a descaracterização de seus habitats (FEARNSIDE, 2003).

Além disso, existem algumas características biológicas desse grupo, as quais favorecem a sua extinção, tais como: crescimento lento, maturidade sexual tardia, período de vida longo, e conseqüentemente, as taxas baixas de substituição de indivíduos na natureza (SILVA, 2011). Um dos impactos atuais para as populações de quelônios é o aumento da temperatura global, a qual poderá alterar toda a razão sexual destes animais (FERREIRA JÚNIOR, 2009). Sabe-se que a maioria dos quelônios não apresentam cromossomos sexuais, e possuem a determinação sexual dependente de temperatura (TSD) (VALENZUELA, 2008). Okada et al. (2011) mostraram que existe uma intensa variação na razão sexual de tartarugas japonesas, ligadas a temperatura em áreas de nidificação. Esse mesmo efeito foi relatado para as tartarugas amazônicas do gênero *Podocnemis*, onde se notou que as características do meio de nidificação alteram drasticamente a viabilidade e a razão sexual dos ovos (CARNEIRO, 2012).

A ordem Testudines é formada aproximadamente por 300 espécies, e estas apresentam em sua maioria um status de conservação preocupante (TORRE-LORANCA, 2004). Esses animais fornecem proteína para as populações humanas que vivem em locais mais distantes dos grandes centros urbanos (CASTRO, 2006; CRISTO et al., 2017; SILVA, 2011). Na região amazônica os quelônios mais explorados são: tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*), tracajá (*Podocnemis unifilis*) e muçã (*Kinosternon scorpioides*) (FAGUNDES, 2015). Onde *K. scorpioides* é uma das espécies menos conhecidas e, provavelmente, uma das mais ameaçadas (BERRY e IVERSON, 2011). No arquipélago do Marajó (Pará, Brasil) são intensamente consumidas e comercializadas, e possivelmente, devido a isso, as populações de vida livre vêm diminuindo (CRISTO et al., 2017). Além disso, não existem estudos que comprovem o tamanho populacional desta espécie nesta região, e nem as taxas de renovação desses estoques.

Rebelo e Pezzuti (2000) afirmaram que são necessárias mais as discussões acerca de como mitigar a destruição dos estoques e manusear as populações naturais de quelônios, e a falta de

informações confiáveis gera dúvida sobre a sua eficácia. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de projetos de manejo de quelônios, que favoreçam o seu consumo nas comunidades rurais e que combatam a exploração ilegal (TORRE-LORANCA, 2004). Segundo MATEUS e HIGUCHI (2018) um projeto de conservação do tracajá (*P. unifilis*), em comunidades do Amazonas gerou uma aprendizagem social, autonomia nas comunidades e controle sobre o manejo, transmitidos ao longo de anos de projeto, onde esses ensinamentos continuaram sendo seguidos, após a ausência do programa.

Por outro lado, MILLER et al. (2004) afirmaram que há um esforço para fortalecer a criação conservacionista em cativeiro devido a sua grande importância, pois além de facilitar a realização de pesquisas, promove a educação ambiental. Além disso, os animais nascidos em cativeiro podem ser destinados à reintrodução, em áreas com taxas populacionais baixas, ou onde foram extintos (BALMFORD et al., 1995; WAZA, 2005).

Sob esta perspectiva, existem algumas ações conservacionistas que realizam o manejo de populações de quelônios, visando preservar o seu habitat, integrando as comunidades de áreas vizinhas, e gerando renda alternativa para as mesmas (FERRI, 2002). Assim, a utilização de espécies como o muçã serviria tanto para a alimentação, quanto na complementação de renda, para a pequena produção familiar ou comunitária, e na criação comercial legalizada (CASTRO, 2006; CRISTO et al., 2017). Este animal possui grande aptidão zootécnica, como por exemplo, a capacidade de se reproduzir bem em cativeiro, e responder aos insumos para o crescimento e ganho de peso (COSTA et al., 2017). Todavia, são necessários mais estudos que visem melhorar a sua eficiência em termos de manejo reprodutivo.

Neste cenário, o estudo do desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides*, interessa tanto ao manejo *in situ*, como ao *ex situ*, contribuindo para o melhor entendimento sobre a influência da temperatura na determinação sexual, nas condições ideais para a incubação e na eclosão dos ovos. Assim, compreender as questões básicas envolvidas nesses processos é fundamental para evitar o surgimento de anomalias ou morte embrionária, ligadas às enfermidades (DOS SANTOS MENDONÇA et al., 2016; LAINSON e SHAW, 1971), questões genéticas (VELO-ANTÓN et al., 2011), e aos distúrbios ambientais (OKADA et al., 2011).

1.1- *Kinosternon scorpioides* (Chelonia: Kinosternidae)

A família Kinosternidae, pertencente a subordem Cryptodira (que apresenta retração do pescoço para dentro do casco, em forma de S). Possuem cerca de quatro gêneros, sendo um deles *Kinosternon*, com cerca de 19 espécies, entre as quais está *K. scorpioides*. Esta por sua vez, é formada por quatro subespécies: *K. scorpioides scorpioides* (LINNAEUS, 1766), presente no território brasileiro, e as demais ocorrendo entre os países da América Latina: *K. scorpioides abaxillare*, *K. scorpioides albogulare* e *K. scorpioides cruentatum*.

K. scorpioides scorpioides, conhecido como muçua ou jurará (Figura 1), apresenta distribuição geográfica por grande parte do continente Americano. Ocorre no México, América Central e do Sul, com exceção do Chile e Uruguai (CABRERA e COLANTONIO, 1997; MACIP-RIOS et al., 2009; COSTA et al., 2010; BERRY e IVERSON, 2011; FORERO-MEDINA e CASTANO-MORA, 2011). No Brasil pode ser encontrado nas regiões norte e nordeste, e nos Estados de Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais (SANTOS et al., 2008; BERRY e IVERSON, 2011).



Figura 1: Espécime adulto de *K. scorpioides*. Fonte: Brenda Braga em 19/10/2017.

A espécie é de fácil identificação, por apresentar três quilhas longitudinais na carapaça estreita, a cabeça é um pouco larga, com o queixo forte e arqueado. O plastrão largo é ligado à carapaça através de pontes, onde existem lobos articulados por uma área central como uma mola (BERRY e IVERSON, 2011). A carapaça ovalada é formada por cinco escudos vertebrais, quatro costais direitos, quatro costais esquerdos, um nucal, 11 marginais direitos e 11 marginais esquerdos (CABRERA e COLANTONIO, 1997).

Quando adulto atinge entre 9,2 a 27,0 cm de comprimento da carapaça (BERRY e IVERSON, 2011). As populações de vida livre adultas possuem em grande parte, comprimento de carapaça entre 110 a 140 mm, com poucos indivíduos apresentando tamanho superior a 140 mm ou inferior a 110 mm (FORERO-MEDINA et al., 2007) e segundo Viana et al. (2014), o tamanho dos animais de vida livre é semelhante a animais adultos criados em cativeiro.

De acordo com Berry e Iverson (2011), a carapaça apresenta coloração variando do marrom ao verde oliva, a cabeça pode ser marrom, cinza ou preta, com manchas creme, vermelho, amarelo, laranja e rosa. As patas e cauda são cobertas por uma pele de cor cinza. Na ponta da cauda, observa-se um apêndice córneo como o de um escorpião, o que deu origem ao epíteto específico da espécie.

Esses animais são, predominantemente, carnívoros quando juvenis, tornando-se carnívoros oportunistas na idade adulta (CLARK e GIBBONS, 1969; HART, 1983; MOREIRA e LOUREIRO, 1992; TERAN et al., 1995). Em vida livre, se alimentam de peixes, girinos, anfíbios, insetos e algas, e essa dieta pode variar em função do sexo e da idade do indivíduo (BERRY e IVERSON, 2011). Apresentam maior peso corporal no período chuvoso (VIANA et al., 2014) e o comportamento é diurno e noturno, sendo mais ativos à noite. Na natureza são caçados por canídeos, felinos e aves de rapina, e os seus ovos são predados por lagartos e mamíferos (FORERO-MEDINA e CASTANO-MORA, 2011).

K. scorpioides apresenta dimorfismo sexual (Figura 2 A), sendo que as fêmeas adultas são maiores de que os machos (MARQUES, 1995). Costa et al. (2017) afirmam que apesar do peso ser maior em fêmeas, os machos possuem tamanho retilíneo de carapaça maior. Estes possuem plastrão côncavo e a cauda maior e mais grossa, enquanto que as fêmeas apresentam o plastrão plano e a cauda mais curta (CARVALHO et al., 2010). A maturidade sexual nos machos, em vida livre, ocorre entre quatro a sete anos, e nas fêmeas entre cinco a oito anos (MAHMOUD, 1967). Em cativeiro os machos formam haréns (RODRIGUES et al., 2014). Acasalamentos (Figura 2 B) no Marajó-Pará ocorre nos meses mais chuvosos (janeiro a junho) (COSTA et al., 2017), e a cópula ocorre na água, podendo o cortejo do macho se iniciar em áreas rasas (CASTRO, 2006). O período de desova se estende de março a agosto na região norte e sudeste do Brasil, sendo os meses de junho a julho os que apresentam maior quantidade de posturas, caracterizando uma reprodução sazonal (VIANA et al., 2013; VIANA, 2016; COSTA, 2017).

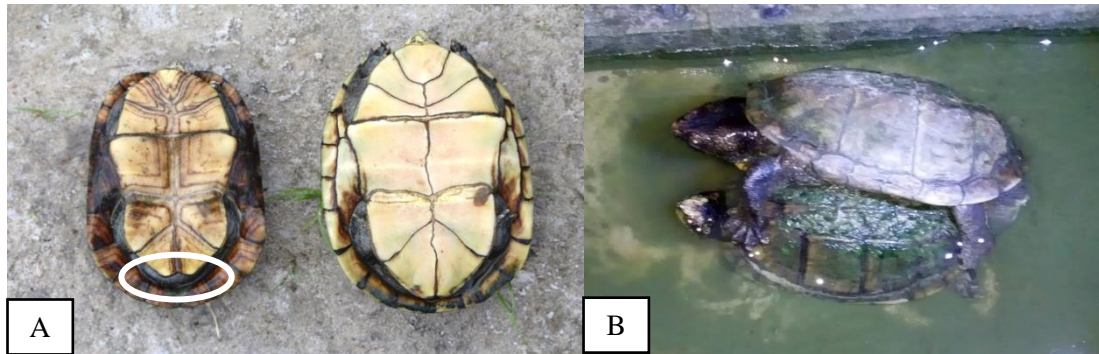


Figura 2: A) Dimorfismo sexual de *K. scorpioides*, onde os machos (esquerda) possuem o plastrão côncavo e a cauda é mais robusta (circulo), e nas das fêmeas (direita) é plano e a cauda é menor. B) Acasalamento de *K. scorpioides*. Fonte: Brenda Braga (28/08/2018).

A ovipostura é feita na terra, em buracos cavados com as patas traseiras (Figura 3). Iverson (2010) relata que as fêmeas de *K. scorpioides cruentatum*, podem ter anualmente até cinco posturas, contendo de um a quatro ovos. Os ovos são elipsóides, apresentam em média de 34,5 mm de comprimento e 18 mm de largura, e peso de 7,90 g (COSTA et al., 2017). A casca é rompida com uma estrutura localizada abaixo das narinas, chamada de ovorrupitor ou carúncula (ROCHA e MOLINA, 1990). A incubação artificial pode durar até 266 dias (ROCHA e MOLINA, 1990), porém esse período é muito variado. Castro (2006) afirma que a incubação pode ocorrer entre 111 a 164 dias; já Vogt (2008) afirma que em média são 176 dias; e Costa et al. (2017) afirmam que acontece em média de $129,3 \pm 19,6$ dias, o que estaria ligado as condições ambientais do cativeiro. O tamanho dos filhotes em cativeiro, segundo Castro (2006) é em média 3,1 cm de comprimento da carapaça, com peso médio de 6,5 g. Já Costa et al. (2017) observaram filhotes em média com 2,6 cm de carapaça, pesando 2,8 g.



Figura 3: Fêmea de *K. scorpioides* em postura. Fonte: Brenda Braga (29/07/2017).

1.2- Embriologia de quelônios

Em estudos morfológicos é fundamental ter referências sistematizadas para se verificar as características de desenvolvimento de um embrião, o que geralmente é feito através em um organismo modelo. No entanto, existem as heterocronias (SMITH, 1997; VELHAGEN, 1997), que são vistas quando embriões de diferentes espécies são comparados entre si, que seriam determinadas mudanças no tempo da origem dos caracteres, durante o desenvolvimento (HAECKEL, 1896). Dificultando o uso de um sistema de estadiamento entre duas espécies, como resultado, o uso de organismos modelo tem sido questionado (JENNER e WILLS, 2007), e novas tabelas estão sendo elaboradas para muitas espécies de um mesmo grupo.

Estudos sobre a embriologia de répteis, principalmente em quelônios, têm focado na elaboração e padronização de tabelas que especifiquem caracteres morfológicos durante o desenvolvimento embrionário, sob determinação condições de temperatura e umidade (YNTEMA, 1968, PACKARD et al., 1977; MILLER, 1985). O desenvolvimento de quelônios foi padronizado por Yntema (1968), utilizando embriões de *Chelydra serpentina*, no qual foram determinados 27 estágios de desenvolvimento, variando desde a gástrula, o surgimento e a diferenciação dos membros, e até a eclosão. Este autor definiu dois períodos principais: um antes da postura e o outro após a mesma. O primeiro período termina com o embrião em gástrula, com o canal cordomesodermal aberto. A fase de pós-postura, segundo período, pode ser subdividida em três: inicial (estágios: 0 ao 3); dos somitos (estágios: 4 ao 10); e o dos membros (estágios: 11 ao 26).

A partir destes estudos, outros pesquisadores publicaram trabalhos com tabelas de desenvolvimento embrionário para diversas espécies de quelônios, como em *Carettochelys insculpta* (BEGGS et al., 2000), para *Trachemys scripta* (GREENBAUM, 2002), para *Apalone spinifera* (GREENBAUM e CARR, 2002) e para a espécie *Chrysemys picta* (CORDERO e JANZEN, 2014). Wernerbug (2009), propôs um sistema de padronização de estágios de desenvolvimento que poderá facilitar as análises sistemáticas e filogenéticas, acerca do desenvolvimento de diversos seres vivos, por meio de um banco de dados *online*. E recentemente, foi proposta para tartarugas marinhas uma chave dicotômica de identificação que vise facilitar a identificação dos estágios de desenvolvimento (MILLER et al., 2017), porém, atualmente, não existe estudo que relate a embriologia de *K. scorpioides*, deixando uma lacuna neste aspecto tão importante para o manejo reprodutivo desses animais e para a taxonomia da família Kinosternidae.

Sendo assim, é de fundamental importância o melhor entendimento da embriologia do *K. scorpioides*, sobretudo das condições ideais para a incubação e a eclosão dos ovos, e assim do seu desenvolvimento e diferenciação sexual. Tais contribuições são indispensáveis tanto para o manejo em cativeiro, como para a conservação de populações de vida livre, que estão sob impacto das mudanças climáticas. Segundo Bodmer et al., (2013), tais alterações, com períodos de secas extremas e inundações intensas, já estão ocorrendo na Amazônia peruana, e afetam negativamente a biodiversidade, causando elevada mortalidade em animais silvestres, e prejuízo as populações humanas locais, que dependem destes recursos para a sua sobrevivência. Do ponto de vista embriológico, este problema ambiental afetaria diretamente a razão sexual dos quelônios, uma vez que a diferenciação sexual depende da temperatura (OKADA et al., 2011; CARNEIRO, 2012).

1.2.1- Osteogênese de quelônios

Os testudines estão entre os vertebrados mais especializados, morfologicamente, devido a presença de seu complexo carapaça-plastrão (GILBERT et al., 2001; POUGH et al. 2003; HILDEBRAND e GOSLOW 2006), podendo abranger com sucesso o habitat aquático e terrestre. Desta forma, a estrutura anatômica de seus membros é altamente variável, refletindo o ambiente e os tipos de locomoção. As tartarugas marinhas possuem os membros anteriores em forma de remo, e maiores que os posteriores. Já os cagados de água doce têm ambos espalmados, com dedos distintos possuindo quatro ou cinco garras. Enquanto que as espécies terrestres apresentam membros em forma de coluna com dedos indistintos.

O esqueleto desses animais é formado pelas seguintes linhagens embrionárias: 1- células da crista neural, que formam o esqueleto craniofacial; 2- mesoderma paraxial, que deriva o esqueleto axial; e 3- mesoderma lateral, formando os membros (OLSEN et al., 2000). A ossificação começa com a degeneração da matriz extracelular (ORTEGA et al., 2004). Este processo se caracteriza pela ossificação endocondral, com espessamento do mesênquima, em um modelo intermediário de cartilagem (SHUBIN e ALBERCH, 1986; BLUMER et al., 2008), ou por ossificação intramembranosa por diferenciação direta em células ósseas (ORTEGA et al., 2004).

O esqueleto desses animais está dividido em: esqueleto cranial, composto pelo osso do crânio; esqueleto axial, composto pelos ossos da coluna vertebral, carapaça e plastrão; e o esqueleto apendicular, formado pelos ossos das cinturas torácica e pélvica e pelos ossos dos membros anteriores e posteriores (RIEPEL 1993; SHEIL 2003). Já a osteogênese deste grupo apresenta variações entre as espécies. O tamanho e a idade são parâmetros importantes para o padrão de formação do osso. Os quelônios da mesma idade podem estar em estágios de desenvolvimento diferente, existindo variação mesmo entre animais de tamanhos iguais (GILBERT et al., 2001; RICHARDSON et al., 2009).

O complexo mecanismo da osteogênese envolve diversos fatores como temperatura, umidade, além de já ter sido demonstrado que índices de poluentes elevados afetam o desenvolvimento destes animais (BISHOP, 1994; HEWAVISENTHI e PARMENTER, 2001). Por sua vez, este processo é pouco definido para espécies específicas, e tem sido amplamente estudado do ponto de vista da formação de membros, especialmente em tetrápodos. Sendo que esta característica é importante para compreensão das relações filogenéticas dentro deste grupo

(RICHARDSON et al., 2009; WERNEBURG et al., 2009; LIMA et al., 2011; GREGOROVÍČOVÁ et al., 2018).

O sistema locomotor apresenta grande relevância, por ser um dos responsáveis pela sustentação do corpo e o deslocamento animal, assim como está associado a certas patologias (CUBAS e BAPTISTOTTE, 2007). Um dos exemplos destes estudos é o de Bell et al. (2005), que avaliaram a extensão das deformidades em embriões de *Chelydra serpentina* em ambientes contaminados por petróleo, e o aparecimento de deficiências durante o desenvolvimento.

Sendo assim, este trabalho analisou o desenvolvimento morfológico macroscópico dos embriões, ao longo do período de incubação, estabelecendo fases de desenvolvimento embrionário, além de focar na análise osteogênica dos membros desta espécie, o qual deverá fornecer subsídios para as análises comparativas e anatômicas. Tais contribuições são importantes ferramentas para os estudos acerca do manejo reprodutivo de quelônios, e também a respeito da conservação em populações de vida livre, pois auxiliam a compreensão do desenvolvimento morfofisiológico normal dos animais, o que poderia estar alterado sob condições ambientais desfavoráveis.

2- OBJETIVO

2.1- Objetivo geral

Estudar o desenvolvimento embrionário morfológico externo de embriões de *K. scorpioides* e a osteogênese dos seus membros, visando contribuir para o manejo e a conservação da espécie.

2.2- Objetivos específicos

- a) Descrever o desenvolvimento embrionário morfológico externo.
- b) Estabelecer os estágios de desenvolvimento embrionário da espécie.
- c) Relacionar as características macroscópicas morfológicas com o desenvolvimento embrionário.
- d) Descrever a anatomia dos membros da espécie.
- e) Descrever o processo de condrificação e ossificação dos membros.
- f) Determinar a fórmula falângica dos membros anteriores e posteriores.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. DA C. Parâmetros produtivos e qualidade de ovos de muçuãs (*Kinosternon scorpioides*). **Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG., 2009.**
- BALMFORD, A.; LEADER-WILLIAMS, N.; GREEN, M. J. B. Parks or arks: where to conserve threatened mammals? **Review of Industrial Organization**, v. 4, n. 6, p. 595–607, 1995.
- BEGGS, K. YOUNG, J.; GEORGES, A.; WEST, P. Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelydidae), from northern Australia. **Can. J. Zool.**, v. 78, p. 373–392, 2000.
- BELL, B; SPOTILA, J.R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles, in the John Heinz Nacional Wildlife refuge. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, p. 457-465, 2005.
- BERRY, J. F.; IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1766) – Scorpion Mud Turtle. **Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises**, v. 5, n. 1831, p. 1–15, 2011.
- BISHOP, C. A. BROWN, G. P.; BROOKS, R. J.; LEAN, D. R. S.; CAREY, J. H. Organochlorine Contaminant Concentrations in Eggs and Their Relationship to Body Size, and Clutch Characteristics of the Female Common Snapping Turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) in Lake Ontario, Canada. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, p. 82–87, 1994.
- BLUMER, M. J. F.; LONGATO, S.; FRITSCH, H. Structure, formation and role of cartilage canals in developing bone. **Ann Anatv.**190:301– 315, 2008.
- BODMER, R. E. FANG, T. G.; PUERTAS, P. E.; ANTUNEZ, M.; CHOTA, K.; BODMER, W.E. **Cambio Climático y Fauna Silvestre en la Amazonia Peruana Impacto de la Sequía e Inundaciones Intensas en la Reserva Nacional Pacaya Samiria**, 2013.
- CABRERA, M. R.; COLANTONIO, S. E. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal of Herpetology**, v. 31, p. 507–5013, 1997.
- CARNEIRO, C. C. Influência do ambiente de nidificação sobre a taxa de eclosão, a duração da incubação e a determinação sexual em podocnemis (Reptilia, Podocnemididae) no tabuleiro do Embaubal Rio Xingu, Pará. **Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca)- Universidade Federal do Pará. Belém, Pará, 2012.**
- CARVALHO, R. C. DE OLIVEIRA, S. R.; BOMBONATO, P. P.; OLIVEIRA, A. S.; DE SOUSA, A. L. Morfologia dos órgãos genitais masculinos do Juruá *Kinosternon scorpioides* (Chelonia: Kinosternidae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 289–294, 2010.
- CASTRO, A. B. **Biologia reprodutiva e crescimento do muçua Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1776) em cativeiro . Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará. Belém, Pará, 2006.**

CLARK, D. B.; GIBBONS, J. W. Dietary Shift in the turtle *Pseudemys scripta* (Schoepff) from Yorth to maturity. **Copeia**, n. 4, p. 704-706. 1969.

CORDERO, G. A.; JANZEN, F. J. An enhanced developmental staging table for the painted turtle, *Chrysemys picta* (Testudines: Emydidae). **Journal of Morphology**, v. 275, n. 4, p. 442–455, 2014.

COSTA, H. MOLINA, F; SÃO-PEDRO, V.; FEIO, R. Reptilia, Testudines, Kinosternidae, *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Linnaeus, 1766): Distribution extension. **Check List**, v. 6, n. 2, p. 314–315, 2010.

COSTA, J. S. Marques, L.C.; Matos, A.S.; Silva, C.S.; Figueiró, M.R.; Sales, R.L.; Da Silva Filho, E.; Guimarães, D.A.A.; Marques, J.R.F. Características produtivas de *Kinosternon scorpioides* nas fases de acasalamento, postura e eclosão, criados em cativeiro na Amazônia. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 255, p. 389–396, 2017.

CRISTO, S. S.; BAÍA JÚNIOR, P. C.; SILVA, J.S.; MARQUES, J. R. F.; GUIMARÃES, D. A. A. The trade of *Kinosternon scorpioides* on Marajó island, Brazilian Amazon: from hunting to consumption. **Herpetological Journal**, v. 27, n. 3, p. 361–367, 2017.

CUBAS, P. H.; BASTISTOTTE, C. **Chelonia (Tartaruga, cágado, jabuti)**. In: Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R; CATÃO-DIAS; J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: ROCA; p. 86-119, 2007.

DOS SANTOS MENDONÇA, J.; VIEIRA, L. G.; VALDES, S. A. C.; VILCA, F. Z.; TORNISIELO, V. L.; SANTOS, A. L. Q. Effects of the exposure to atrazine on bone development of *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 594–600, 2016.

FAGUNDES, C. K. estratégias e áreas prioritárias à conservação de quelônios aquáticos e semi-aquáticos na Amazônia. **Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior)-Manaus, Amazonas.**, 2015.

FEARNSIDE, P. M. A floresta Amazonica nas mudanças Globais. **A floresta Amazonica nas mudanças Globais**, p. 134, 2003.

FERNANDES NETO, D. L. Níveis de cálcio e fósforo na dieta de muçua *Kinosternon scorpioides* (LINNAEUS, 1766) em diferentes fases de criação em cativeiro. 2013.

FERREIRA JÚNIOR, P. D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 139–154, 2009.

FERRI, V. **TurtlesTortoises: A Firefly Guide**. **Firefly Books**, p 256, 2002.

FORERO-MEDINA, G.; CASTAÑO-MORA, O. V.; MONTENEGRO, O. Abundance, population structure, and conservation of *Kinosternon scorpioides albogulare* on the Caribbean Island of San Andrés, Colombia. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 6, n. 2, p. 163–169, 2007.

FORERO-MEDINA, G.; CASTANO-MORA, O. V. *Kinosternon scorpioides albogulare*

(Dumeril and Bocourt 1870) - White-Throated Mud Turtle, Swanka Turtle. **Chelonian Research Monographs**, v. 5, n. 1978, p. 064, 5pp., 2011.

GILBERT, S.F.; LOREDO, G.A.; BRUKMAN, A.; BURKE, A.C. Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. **Evol Dev**.3: 47- 58. 2001.

GREENBAUM, E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, n. 8, p. 1350–1370, 2002.

GREENBAUM, E.; CARR, J. L. Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifer* (Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, v. 254, n. 3, p. 272–291, 2002.

GREGOROVIČOVÁ, M.; KVASILOVÁ, A.; SEDMERA, D. Ossification Pattern in Forelimbs of the Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*): Similarity in Ontogeny of Carpus Among Crocodylian Species. **Anatomical Record**, v. 00, n. October 2017, 2018.

HAECKEL, E. Systematische Phylogenie. Zweiter Theil, Systematische Phylogenie der wirbellosen Thiere (Invertebrata). **Berlin**: Georg Reimer. 1896.

HART, D. R. Dietary and habit shift with size of red-eared turtles (*Pseudemys scripta*) in a Southern Louisiana Population. **Herpetologica**, v. 39, n.3, p. 285-290, 1983.

HEWAVISENTHI, S.; PARMENTER, C. J. Influence of Incubation Environment on the Development of the Flatback Turtle (*Natator depressus*). **Source: Copeia**, v. 2001, n. 3, p. 668–682, 2001.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G.E. Análise da estrutura dos vertebrados. São Paulo: **Atheneu**. 2006.

IVERSON, J. B. Reproduction in the red-cheeked mud turtle (*Kinosternon scorpioides cruentatum*) in southeastern Mexico and Belize, with comparisons across the species range. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 9, n. 2, p. 250–261, 2010.

JENNER, R. A.; WILLS, M. A. The choice of model organisms in evo-devo. **Nature Rev Genet**, v.8:311–319. 2007.

JÚNIOR, G. S.; BALESTRA, R. A. M.; LUZ, V. L. F. (2016). Breve histórico da conservação dos quelônios amazônicos no Brasil. In: BALESTRA, R. A. M. (Org.). *Manejo conservacionista e monitoramento populacional de quelônios amazônicos*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília: Ibama, p. 11-14.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Sarcocystis gracilis* n. sp. from the Brazilian Tortoise *Kinosternon scorpioides*. **The Journal of Protozoology**, v. 18, n. 3, p. 365–372, 1971.

LIMA, F. C. SANTOS, A. L. Q.; VIEIRA, L. G.; DA SILVA-JUNIOR, L. M.; ROMÃO, M. F.; SIMONE, S. B. S.; HIRANO, L. Q. L.; SILVA, J. M. M.; MONTELO, K. M.; MÁLVASIO, A. Ontogeny of the Shell Bones of Embryos of *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Podocnemididae). **Anatomical Record**, v. 294, n. 4, p. 621–632, 2011.

LINNAEUS, C. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentis, synonymis, locis.* **Stockholm:** L. Salvius 12 ed. 1. 1766.

MACIP-RIOS, R. CISNEROS, M D.; AGUILAR-MIGUEL, X. S.; CASAS-ANDREU, G. Population Ecology and Reproduction of the Mexican Mud Turtle (*Kinosternon Integrum*) in Tonatico, Estado De Mexico. **Western North American Naturalist**, v. 69, n. 4, p. 501–510, 2009.

MAHMOUD, I. Y. Courtship behavior and sexual maturity in four species of Kinosternidae turtles. **Copeia**, v.2, p. 314-319, 1967.

MARQUES, C. Historia natural y dimorfismo sexual de la tortuga *Kinosternon scorpioides* natural history and sexual dimorphism of the turtle *Kinosternon scorpioides* in palo verde. **Rev. Ecol. Lat. Am.**, v. 2, n. 1–3, p. 37–44, 1995.

MATEUS, W. D. D.; HIGUCHI, M. I. G. Processos estruturais do manejo e conservação da fauna silvestre em risco de extinção: casos amazônicos. **Sustentabilidade em Debate**, v. 9, n. 3, p. 64–78, 2018.

MILLER, J.D. Embryology of marine turtles. Gans C, Billett F, Maderson PFA, editors. **Biology of the Reptilia**, v. 14, p. 269–328, 1985.

MILLER, B.; CONWAY, W.; READING, R. P.; WEMMER, C.; WILDT, D.; KLEIMAN, D.; MONFORT, S.; RABINOWITZ, A.; ARMSTRONG, B.; HUTCHINS, M. Evaluating the Conservation Mission of Zoos, Aquariums, Botanical Gardens, and Natural History Museums. **Conservation Biology**, v, 18, n. 1, February, p.1-8, 2004.

MILLER, J. D.; MORTIMER, J. A.; LIMPUS, C. J. A Field Key to the Developmental Stages of Marine Turtles (*Cheloniidae*) with Notes on the Development of *Dermochelys*. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 16, n. 2, p. 111–122, 2017.

MOREIRA, G. R. S.; LOUREIRO, J. A. S. Contribuição al estudio de la morfología del tracto digestivo de individuos jóvenes de *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). **Acta Zoológica**, v. 41, n. 2, p. 345-348, 1992.

OKADA, Y.; YABE, T. A.; ODA, S I. Interpopulation Variation in Sex Ratio of the Japanese Pond Turtle *Mauremys japonica* (Reptilia : Geoemydidae). **Current Herpetology**, v. 30, n. 1, p. 53–61, 2011.

OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. Bone development. **Ann Rev Cell Dev Biol**v. 16:191-220. 2000.

ORTEGA, N.; BEHONICK, D.J.; WERB, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. **Trends Cell Biol**v.14:86–93. 2004.

PACKARD, G. C.; TRAEY, G. R.; ROTH, J. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and the evolution of viviparity within the class Reptilia. **Biol.Rev.** v. 52, p. 71-105, 1977.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. A vida dos vertebrados. São Paulo: **Atheneu**. 2003.

- REBÊLO, G., PEZZUTI, J. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia: sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. **Ambiente Sociedade**, 85–104, 2000.
- RICHARDSON, M. K.; GOBES, S. M. H.; VAN LEEUWEN, A. C.; POLMAN, J. A.E.; PIEAU, C; SÁNCHEZ-VILLAGRA, M. R. Heterochrony in limb evolution: Developmental mechanisms and natural selection. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 312, n. 6, p. 639–664, 2009.
- RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **J Zool**, v.231: 487-509. 1993.
- ROCHA, M. B.; MOLINA, F. B. Reproductive Biology of *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) in captivity. *Tortoises Turtles*, n. 5, 8, 1990.
- RODRIGUES, J. F. M.; BORGES-NOJOSA, D. M. Do male *Kinosternon scorpioides* (LINNAEUS, 1766) select and monopolize females? **Herpetozoa**, v. 26 n.3, p.186-188, 2014.
- SANTOS, F. J. M.; PEÑA, A. P.; LUZ, V. L. F. Considerações biogeográficas sobre a herpetofauna do submédio e da foz do Rio São Francisco, Brasil. **Estudos**, v. 35, n. 1/2, p. 59–78, 2008.
- SHEIL, C.A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **J Morphol**, v.256:42-78. 2003.
- SHUBIN, N.H.; ALBERCH, P. A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. **EvolBiol** v.20:318–390, 1986.
- SILVA, A. S. L. Aspectos reprodutivos do Muçã (*Kinosternon scorpioides*) em cativeiro. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.**, 2011.
- SMITH, K. K. Comparative patterns of craniofacial development in eutherian and metatherian mammals. **Evolution**, v. 51:1663–1678, 1997.
- TERAN, A. F.; VOGT, R. C.; GOMEZ, M. F. S. Food habits of an Assemblage of five species of turtle in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology** v. 29, n. 4, p. 536-547, 1995.
- TORRE-LORANCA, M. Á. Propuesta de manejo de las poblaciones de tortugas (*Kinosternon leucostomum* y *Staurotypus triporcatus*) en el ejido La Margarita, Catemaco, Veracruz, México. **Tesis Maestría in Ciencias (Manejo de Fauna Silvestre) - Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México**, 2004.
- VALENZUELA, N. Evolution of the gene network underlying gonadogenesis in turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination. **Integrative and Comparative Biology**, v. 48, n. 4, p. 476–485, 2008.
- VELHAGEN, W. A. Jr. Analyzing developmental sequences using sequence units. **Systemat Biol**, v.46:204–210. 1997.

- VELO-ANTÓN, G.; GUILHERME BECKER, C.; CORDERO-RIVERA, A. Turtle Carapace Anomalies: The Roles of Genetic Diversity and Environment. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18714, 2011.
- VIANA, D. C. SANTOS, A. C.; CHAVES, L. F. A; OLIVEIRA, A. S.; ASSÍS NETO, A. C.; SOUSA, A. L. Body and testicular biometric parameters of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 4, p. 477, 2014.
- VIANA, D. C. RUI, L. A.; MIGLINO, M. A.; ARAUJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S. SOUSA, A. L. Morphological study of epididymides in the scorpion mud turtle in natural habitat (*Kinosternon scorpioides* - Linnaeus, 1976). **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 153–162, 2013.
- VIANA, D. C. Sazonalidade reprodutiva em machos de tartaruga (*Kinosternon scorpioides*) de vida livre no Nordeste brasileiro evidenciado por imunolocalização de enzimas esteroidogênicas no testículo e epidídimo. **Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres**, 2016.
- VOGT, R.C. Amazon Turtles. **Gáfica Biblos**. Lima. p. 104, 2008.
- WAZA. Word Association of Zoos and Aquariums. Construindo um Futuro para a Vida Selvagem: Estratégia Mundial dos Zoos e Aquários para a Conservação. Peter J. S. **Olney** (Ed.). Tradução: Jardim Zoológico e de Aclimação em Portugal S.A, Lisboa, Portugal, 2005. 104 p.
- WERNEBURG, I. A standard system to study vertebrate embryos. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, 2009.
- WERNEBURG, I. HUGI, J.; MULLER, J.; SANCHEZ-VILLAGRA, M.R. Embryogenesis and ossification of *emydura subglobosa* (testudines, pleurodira, chelidae) and patterns of turtle development. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 11, p. 2770–2786, 2009.
- YNTEMA, C. L. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. **Journal of Morphology**, v. 125, n. 2, p. 219–251, 1968.

CAPÍTULO I

**Desenvolvimento embrionário de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776)
(Chelonia: Kinosternidae)**

Autor: Braga, B. S. S.

Instituição: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de
Reprodução Animal

RESUMO

Kinosternon scorpioides é utilizado de maneira predatória há décadas por populações tradicionais da Amazônia, como fonte alternativa de proteína. Este fato, associado aos desequilíbrios ambientais, como as mudanças climáticas, afeta diretamente a sobrevivência desta espécie na natureza. Foram realizadas poucas pesquisas a respeito da sua biologia reprodutiva e embriologia, e a determinação de estágios de desenvolvimento embrionário é essencial para estudos de anatomia comparada e relações filogenéticas, além de serem fundamentais em pesquisas experimentais a respeito da determinação sexual destes indivíduos, o que também pode ser utilizado em estudos ecológicos. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento embriológico macroscópico de *K. scorpioides*. De um a três ovos fertilizados, para cada fase de desenvolvimento, foram coletados de amostras provenientes de criatório. Após a morfometria, os embriões em estágios 9 a 12 foram classificados pela presença de arcos branquiais, vesícula óptica e ótica, além dos membros locomotores (anteriores e posteriores). Os embriões de estágios 13 a 17 foram identificados pela pigmentação ocular evidente, morfologia dos membros, aparecimento da carapaça e da protuberância urogenital. Nos estágios 19 a 22 notou-se a presença de dígitos nas placas digitais e a pigmentação ao longo do corpo. Nos estágios 23 a 26 foram determinadas a presença dos dígitos nos membros, pigmentação densa no corpo, além do desaparecimento da protuberância urogenital e da hérnia umbilical. Os resultados contribuem para o melhor entendimento dos aspectos ontogênicos desta espécie, auxiliando as boas práticas de manejo *ex situ* durante os procedimentos de incubação, e servindo de base para os estudos filogenéticos entre esses grupos, além de facilitar a compreensão dos efeitos climáticos e ambientais na temperatura pivotal e diferenciação sexual de embriões durante desenvolvimento embrionário de quelônios.

Palavras-chave: Kinosternidae, macroscopia, embrião, morfometria, incubação.

INTRODUÇÃO

As primeiras descrições embrionárias morfológicas a respeito da ordem Chelonia foram realizadas por Rathke (1848), Agassiz (1857) e Parker (1880), e posteriormente, o desenvolvimento embrionário de quelônios semiaquáticos foi padronizado por Yntema (1968) em 27 estágios (0-26), baseado em caracteres macroscópicos de *Chelydra serpentina*. Mahmoud et al., (1973) estabeleceu o desenvolvimento de *Chrysemys picta* em 23 estágios, e Miller (1985) padronizou o de tartarugas-marinhas das famílias Cheloniidae e Dermochelyidae em 31 estágios.

Segundo Werneburg (2009) as características espécies-específicas são importantes para o entendimento do desenvolvimento dos animais. Entretanto, esta distinção entre as espécies torna a padronização dos estágios de desenvolvimento mais difícil. Deste modo, surgiram tabelas para as diferentes espécies de quelônios (Guzma & Osma, 1990; Greenbaum & Carr, 2002; Okada et al., 2011), contudo estas tabelas ainda contêm variações no número de fases de desenvolvimento, o que pode dificultar a análise entre os táxons.

A família Kinosternidae possui pouca informação sobre a embriologia das suas espécies. O *Kinosternon scorpioides* ocorre na região norte e nordeste do Brasil, nas Américas Central e Sul, com exceção do Chile e Uruguai (Berry & Iverson, 2011). No arquipélago do Marajó (Pará, Brasil), e em muitas regiões da Amazônia brasileira, estes animais são intensamente caçados e comercializados ilegalmente, o que poderá levar a uma diminuição acentuada da população natural (Cristo et al., 2017). Assim, o manejo reprodutivo *ex situ* tem realizado esforços que possam contribuir para a conservação, e auxiliar nos planos de sustentabilidade *in situ* desta espécie (Costa et al., 2017).

O estudo das características embriológicas visa o melhor entendimento de cada etapa do desenvolvimento deste processo reprodutivo, uma vez que a fase de incubação dos ovos é o período mais crítico no ciclo de vida dos quelônios. Além disso, a padronização do desenvolvimento embrionário auxilia no estudo da taxonomia e filogenia, visto que este processo apresenta homologia que facilitam a compreensão das relações filogenéticas, entre os grupos de animais (Boughner et al., 2007). A melhoria do manejo dos ovos em quelônios é também a consequência de um bom estudo embriológico, visto que este serve de base para a caracterização da temperatura pivotal e a determinação sexual, sendo entendimentos necessários tanto para as práticas em cativeiro como em vida livre (Okada et al. 2011).

Este trabalho caracteriza os estágios embrionários de *K. scorpioides* a partir da incubação, estabelecendo as fases de desenvolvimento do embrião, e a relação dos caracteres morfológicos externos desta espécie com as fases de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos embrionados de *K. scorpioides* foram coletados entre os meses de abril a agosto, no criatório de pesquisa científica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental) (LO 7310/2014-SEMAS-PA), localizado na Ilha de Marajó (Salvaterra, Pará, Brasil, 48° 30' e 54" de longitude W e 00° 45' e 21" de latitude S). Este trabalho foi aprovado na Comissão de Ética de Uso de animais da Embrapa Amazônia Oriental (n° 001/2016).

Após as posturas, os ovos eram retirados do ninho, encaminhados para higienização com água, por fim eram transferidos para uma incubadora (Ecological Premium ® modelo IP-R), sob uma temperatura média de 30°C e umidade de 80%, onde permaneciam em um substrato de vermiculita umidificada. A partir do 15º dia de incubação até a eclosão, e em intervalos de cinco dias, os ovos foram abertos para fixação e posterior aferição das medidas morfométricas (comprimento, largura e altura da carapaça e comprimento, largura e altura do plastrão). Embriões a partir do estágio 18, foram eviscerados e o coração, fígado e tubo gastroentérico foram retirados para medição do volume. Para isso foi utilizado o Princípio de Arquimedes, que considera o volume deslocado de água, como um valor aproximado ao volume do órgão submerso. Essa mensuração foi realizada com a ajuda de agulhas hipodérmicas (contendo 0,01 de acurácia). Ao final das coletas foram obtidos 180 embriões, sendo no mínimo três embriões para cada fase de desenvolvimento.

Em seguida, os embriões foram fixados inteiros em solução *Bouin*, por 24 horas, e conservados em álcool 70%. Cada fase de desenvolvimento foi registrada com a ajuda do estereomicroscópio Leica EZ4 HD, que apresenta uma câmera digital acoplada. Animais com tamanhos maiores foram fotografados em câmera digital (CANON ® EOS Rebel T5 acoplada a um lente macro de 60mm), para a realização de desenhos esquemáticos. Os critérios de identificação dos embriões foram adaptados dos descritos por Yntema (1968).

Os estágios de desenvolvimento foram plotados em um gráfico em função dos dias de incubação. As medidas morfométricas (largura do olho, largura da cabeça, comprimento cabeça-nádega, comprimento e largura da carapaça e plastrão, além da altura), e volumétricas

(volume do coração, fígado, tubo gastroentérico e do corpo), tiveram as suas médias e desvios padrões dispostos na tabela. Para testar a existência de relação entre as medidas mensuradas, foi realizada a Correlação de Spearman entre as variáveis morfométricas e os estágios de desenvolvimento, e entre as medidas de volume e os estágios de desenvolvimento, com a ajuda do Software Statistica 8.0®.

Posteriormente, para se determinar a equação do crescimento dos embriões, foi realizada a regressão linear simples, entre a altura da carapaça-plastrão em função dos estágios de desenvolvimento dos embriões, com a ajuda do Software Statistica 8.0®. Em seguida foram realizadas as regressões lineares simples, para se determinar a relação entre o aumento de volume dos órgãos em função do volume total do corpo dos embriões. Em seguida, realizou-se a regressão logística, relacionando a presença de caracteres morfológicos e o tamanho da carapaça dos embriões.

RESULTADOS

Foram observados estágios embrionários *K. scorpioides* desde o estágio 10 até o 26, os estágios iniciais (0-9) foram assumidos como semelhantes ao da *C. serpentina*, comuns entre os demais táxons de quelônios (Greenbaum & Carr, 2002), por isso não foram apresentados aqui. Novas características de diagnóstico e o estágio pré-eclosão (26) foram descritos. As fotografias e os desenhos esquemáticos dos embriões estão dispostos nas figuras de 2 à 5. Nessas, pode-se observar o desenvolvimento embriológico, desde o surgimento dos olhos até a formação dos membros, descritos no Quadro 1.

Os estágios de 10 à 12 (Figura 2 A, B e C) foram determinados pela presença dos arcos branquiais, morfologia da vesícula óptica e de acordo com os primeiros aspectos da formação dos membros, já os estágios 13 a 14 (Figura 2 D e E), pela presença do processo nasal e broto cardíaco, além da placa digital dos membros, primórdio do broto urogenital e borda lateral da carapaça. De 15 à 18 (Figura 3 A, B, C e D), os estágios foram classificados pela presença da carapaça, costelas e plastrão, além da formação das três quilhas carapaciais, estruturas como pálpebras, carúncula e dígitos tiveram seu surgimento relatados neste período. Os estágios 19 a 22 (Figura 4 A, B, C e D), foram elaborados pela dispersão a pigmentação corporal, pelo surgimento de garras e retração do broto urogenital. Entre os estágios 23 a 26 (Figura 5 A, B, C e D), os estágios de desenvolvimento foram determinados devido fechamento da cloaca, abertura das narinas, formação da falange ungueal e fechamento da hérnia umbilical.

A duração máxima do período de incubação dos ovos foi de 145 dias (Figura 1), no qual foram observados embriões completamente formados, com absorção total do saco vitelínico. As medidas morfométricas dos embriões estão presentes na Tabela 1 e 2, com as suas médias e desvios, por estágio de desenvolvimento embrionário.

As correlações de Spearman atestaram que todas as variáveis analisadas apresentam relação. Já a regressão do crescimento mostrou que os embriões progrediram, rapidamente, nos estágios de 10 a 17, porém as suas maiores taxas de crescimento foram observadas a partir do estágio 21, função do crescimento foi $y=13,46+8,73*x$; $R^2=0,90$. As regressões feitas com as medidas volumétricas (figura 6) demonstraram que o coração cresce mais lentamente, se comparado ao fígado e ao tubo gastroentérico, este último apresentou crescimento mais acelerado. A regressão logística (figura 7) mostrou que caracteres importantes para esses embriões surgiram após 0,5 cm de carapaça (carapaça, mandíbula, carúncula), e outros a partir de 1,5 cm (garras).

DISCUSSÃO

Esta foi a primeira descrição do desenvolvimento embrionário de Kinosternidae, na qual foram caracterizados os estágios de 10 até ao 26 (Figuras 2, 3, 4 e 5) do *K. scorpioides* (Quadro 1). Apesar de apresentar características semelhantes ao observado por Yntema (1968) em *C. serpentina*, no presente trabalho foram considerados também os caracteres específicos dos estágios.

Os caracteres padrões dos estágios descritos nas tabelas de desenvolvimento embrionário de quelônios foram eficazes na determinação do desenvolvimento de *K. scorpioides*. Apesar disso, os trabalhos sobre o desenvolvimento embrionário de quelônios utilizam diferentes variações de temperatura, sendo a média de 30°C para *L. olivacea* (Crastz, 1982), *P. unifilis* (Guzmán & Bonilla, 1990), *Emydura subglobosa* (Werneburg et al., 2009), e *P. expansa* (Magalhães et al., 2017); 27°C para *T. scripta* (Greenbaum, 2002) e *C. picta* (Cordero & Janzen, 2014); e 26° para *M. japonica* (Okada et al., 2011). Devido a este fato, há uma grande dificuldade na comparação entre as tabelas, pois níveis diferentes de temperatura alteram as taxas metabólicas dos embriões, causando respostas variadas no desenvolvimento embrionário, como diferença entre períodos de extensão dos estágios de desenvolvimento (Yntema, 1979; Packard & Packard, 2000).

A identificação embriológica ocorreu a partir do estágio 15 (Quadro 1), com a formação da carapaça, assim como é observado nos demais quelônios (Yntema, 1968; Crastz, 1982;

Guzmán & Bonilla, 1990; Beggs et al., 2000; Tokita & Kuratani, 2001; Greenbaum & Carr, 2002; Werneburg et al., 2009; Okada et al., 2011; Cordero & Janzen, 2014; Magalhães et al., 2017; Miller et al., 2017). Além disso, a identificação espécie-específica aconteceu a partir do estágio 18, com o surgimento das três quilhas e dos escudos da carapaça. Sendo que estas duas características, além da pigmentação corporal, são padrões típicos de Kinosternídeos. Guzman & Bonilla (1990) também observaram caracteres específicos ocorrendo em *Podocnemis unifilis*, durante o período embriológico. O que pode ser considerado um fenômeno importante para o estudo taxonômico neste grupo, pois a homologia é fundamental no entendimento evolutivo dos organismos (Billet et al., 1985).

A duração do período de incubação nos quelônios dulciaquícolas é mais extensa em relação aos marinhos (Guzman & Bonilla, 1990), *K. scorpioides* apresentou um dos períodos de incubação mais longos (Figura 1). Tal fato pode ser explicado pela sazonalidade ambiental, onde o início das posturas desta espécie ocorre no meio do período chuvoso na Ilha de Marajó (que se estende de dezembro a maio) e três meses depois se inicia a estação mais seca. Nos primeiros meses deste período as eclosões ocorrem em maior quantidade, e os filhotes encontram as melhores condições para a sobrevivência (Cristo et al., 2017).

As características morfológicas observadas em animais adultos, não puderam ser notadas nos embriões e em filhotes recém-eclodidos de *K. scorpioides*, tais como: 1- presença da estrutura córnea na ponta da cauda; 2- carapaça de aspecto liso, com estruturas concêntricas; 3- plastrão de cor amarela, com estruturas concêntricas e bem delineadas. Esta última mostra que as manchas escuras observadas no plastrão são características somente de filhotes. Assim os indivíduos recém-eclodidos desta espécie podem apresentar padrões morfológicos, na cabeça, carapaça e plastrão que facilitem a sua camuflagem no ambiente, como o observado em filhotes de mamíferos *Cuniculus paca* por El Bizri et al. (2017), semelhante ao que foi relatado para jacarés *Melanosuchus niger* (Vieira et al., 2011).

O crescimento embrionário é explicado pela linearidade, seguindo uma regressão linear simples, a qual também foi verificada em *Pelodiscus sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001) e *C. picta* (Cordero & Janzen, 2014), além disso a morfometria das estruturas aferidas, demonstrou elevada correlação, reduzindo a necessidade de diversas mensurações. O aparecimento de caracteres morfológicos importantes, relacionados (Figura 7), por exemplo, a formação da carapaça e a presença de mandíbula, surgem precocemente no desenvolvimento embrionário, demonstra que filhotes são totalmente independentes e bem desenvolvidos, devido à ausência

de cuidado parental, estratégia reprodutiva adotada por quelônios (Molina & Gomes, 1998; Iverson et al., 2009; Iverson, 2010; Pantoja-Lima et al., 2009; Costa et al., 2017).

Segundo Guzman & Osma (1992), nos *P. unifilis* as fendas faríngeas, responsáveis pela aparência facial externa dos embriões são visualizadas no estágio 10 da mesma forma que no *K. scorpioides*, estão relacionadas ao desenvolvimento inicial dos sistemas digestório, respiratório e linfóide. Porém, assim como ocorre no *K. scorpioides*, estas estruturas desaparecem nos estágios 12 para *Apalone spinifera* (Greenbaum & Carr, 2002), ou no estágio 14 para a espécie *Trachemys scripta* (Greenbaum, 2002).

Os processos maxilar e mandibular foram descritos, na maioria das vezes, iniciando nos estágios 10 ou 11, e se estendendo em direção ao processo frontal até o 17, onde ocorre a sua formação completa (Yntema, 1968; Crastz, 1982; Beggs et al., 2000; Tokita & Kuratani, 2001; Greenbaum & Carr, 2002; Okada et al., 2011; Cordero & Janzen, 2014; Magalhães et al., 2017). No entanto, em *K. scorpioides* a formação completa dessas estruturas ocorreu mais precocemente, no estágio 17, semelhante ao observado em *Apalone spinifera* (Greenbaum & Carr, 2002).

A carúncula, ovorrupitor (Molina & Gomes, 1998), foi visualizada no *K. scorpioides* no estágio 17. Assim, o aparecimento desta estrutura é bem mais tardio, se comparado ao observado no estágio 14 em *Podocnemis expansa* (Magalhães et al., 2017), no estágio 16 em *C. picta* (Cordero & Janzen, 2014), e precoce quando comparado a *Lepidochelys olivacea* (Crastz, 1982) e *Chelonia mydas* (Al-Mukhaini et al., 2010), no estágio 18. Não estando presente em filhotes recém-nascidos, corroborando Molina & Gomes (1998), que notaram a sua degeneração em um à dois dias após a eclosão. As narinas foram observadas no estágio 24, semelhante à *Carettochelys insculpta*, *A. spinifera*, *T. scripta* (Beggs et al., 2000; Greenbaum & Carr, 2002; Greenbaum, 2002).

Na maioria dos quelônios a pigmentação nos olhos ocorre entre os estágios 11 à 13 (Beggs et al., 1998; Cordero & Janzen, 2014; Crastz, 1982; Greenbaum, 2002; Greenbaum & Carr, 2002; Okada et al., 2011; Tokita & Kuratani, 2001; Yntema, 1968). No entanto, em *K. scorpioides* estas características, assim como a coloração na cabeça, foram visualizadas um pouco mais tarde, a partir do estágio 12 e 16, respectivamente. Sendo esta uma variação intraespecífica, visto que os padrões de pigmentação diferem entre as espécies. A pigmentação dos membros também ocorreu a partir do estágio 16, semelhante ao encontrado em embriões de *C. serpentina* (Yntema, 1968).

Os membros, a partir de seu surgimento no estágio 10, foram critérios importantes para diferenciação e caracterização de todos os estágios de desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides*. Além disso, essas estruturas fornecem informações fundamentais à respeito da evolução de grupos tetrápodes (Billet et al., 1985; Sheil & Portik, 2008; Richardson et al., 2009; Joyce et al., 2013). As garras, vistas a partir do estágio 20, foram semelhantes ao observado em *Pelodiscus sinensis* (Tokita & Kuratani, 2001; Okada et al., 2011). A falange ungueal foi visualizada na bainha de embriões de *K. scorpioides* a partir do estágio 24 (Greenbaum, 2002; Okada et al., 2011; Yntema, 1968), tardiamente, ao que ocorre em *A. spinifera* e *T. scripta*, durante o estágio 22 (Beggs et al. 2000; Greenbaum & Carr 2002).

A formação da carapaça, que se iniciou a partir do estágio 14, foi semelhante ao observado em *C. serpentina* (Yntema, 1968). Já o padrão de formação do plastrão assemelhou-se ao encontrado em *Mauremys japonica*, no estágio 15 (Okada et al., 2011), e *T. scripta* (Greenbaum, 2002), na fase 17. Os escudos carapaciais observados no presente trabalho foram semelhantes à *M. japonica* (Okada et al., 2011). Já o surgimento dos escudos plastrais à *T. scripta*, *M. japonica* e *C. picta* (Greenbaum, 2002; Okada et al., 2011; Cordero & Janzen, 2014).

A papila urogenital, foi observada no estágio 14 até o 23, a partir deste estágio não foi mais identificada, diferente do encontrado em outras espécies de quelônios, onde esta estrutura foi visualizada a partir do estágio 12 (Cordero & Janzen, 2014; Crastz, 1982; Greenbaum, 2002; Okada et al., 2011). Neste contexto, para Larkins & Cohn (2015) a papila urogenital, por apresentar diferentes variações morfológicas entre os amniotas, pode contribuir para os debates sobre as questões de homologias nesse grupo.

Este estudo demonstrou o desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides*, apresentando-o desde o estágio 10 até o estágio 26, sob a uma temperatura de incubação de 30°C, durante um período médio de 145 dias. Foi observado que o desenvolvimento embrionário destes animais além de apresentar caracteres comuns aos demais quelônios, possui características específicas que são cruciais na descrição dos estágios de desenvolvimento desta espécie. Sendo assim, este conhecimento contribui para o melhor entendimento dos aspectos ontogênicos desta espécie, auxiliando as boas práticas de manejo *ex situ* durante os procedimentos de incubação, como a prática de ovoscopia e uso de substratos umedecidos. Por outro lado, serve de base para pesquisas sobre as relações sistemáticas entre os quelônios, e também para estudos que visem determinar a temperatura pivotal e período termossensível.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Agassiz, L. (1857). Contributions to the natural history of the United States of America. *First Monograph II. Boston: Little, Brown & Co.*
- Al-mukhaini, N., Ba-omar, T. A., Mahmoud, I. Y., & Al-barwani, S. (2010). Embryonic staging of the Green Turtle, *Chelonia mydas*. *Zoology in the Middle East* 51, 51, 39–50.
- Beggs, K., Young, J., Georges, A., & West, P. (2000). Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelydidae), from northern Australia. *Can. J. Zool.*, 78, 373–392.
- Berry, J. F., & Iverson, J. B. (2011). *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1766) – Scorpion Mud Turtle. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises*, 5, 1–15.
- Billet, F.; Guns, C.; Maderson, P. F. A. (1985). Why study reptilian development? In: Gans, C.; Billet, F.; Maderson, P. F. A. (eds). *Biology of the reptilia. Development A. Vol 14.* New York: Wiley. p. 1-40.
- Boughner, J.C.; Buchtová, M.; Fu, K.; Dewert, V.; Hallgrímsson, B., Richman, J.M. (2007). Embryonic development in *Python sebae* – I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology*, 110: 212-230.
- Cordero, G. A., & Janzen, F. J. (2014). An enhanced developmental staging table for the painted turtle, *Chrysemys picta* (Testudines: Emydidae). *Journal of Morphology*, 275, 442–455.
- Costa, J.S., Marques, L., Matos, A.S., Silva, C.S., Figueró, M.R., Sales, R.L., Da Silva Filho, E., Guimarães, D.A.A., Marques, J.R.F. (2017). Características produtivas de *Kinosternon scorpioides* nas fases de acasalamento, postura e eclosão, criados em cativeiro na Amazônia. *Arch. Zootec.* 66, 389–396.
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Rev. Biol. Trop.*, 30, 113–120.
- Cristo, S.S., Baía Júnior, P.C., Silva, J.S., Marques, J.R.F., Guimarães, D.A. de A. (2017). The trade of *Kinosternon scorpioides* on Marajó island, Brazilian Amazon: From hunting to consumption. *Herpetol. J.* 27.
- El Bizri, H. R., Monteiro, F. O. B., de Andrade, R. dos S., Valsecchi, J., Guimarães, D. A. de A., & Mayor, P. (2017). Embryonic and fetal morphology in the lowland paca (*Cuniculus paca*): A precocial hystricomorph rodent. *Theriogenology*, 104, 7–17.
- Greenbaum, E. (2002). A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, 80, 1350–1370.
- Greenbaum, E., & Carr, J. L. (2002). Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). *Journal of Morphology*, 254, 272–291.
- Guzma, N., & Osma, H. (1992). Serie normal del Desarrollo Organogenico embrionario de *Podocnemis unifilis* Troschel, 1949 (Testudinata, Pelomedusinae). *Acta Biologica Colombiana*, 7–8, 29–44.
- Guzmán, N; Osma de Bonilla, H. (1990). Serie normal del desarrollo morfológico embrionario de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudinata: Pelomedusidae). *Acta Biológica Colombiana*, 2, 129–150.
- Iverson, J. B. Reproduction in the red-cheeked mud turtle (*Kinosternon scorpioides cruentatum*) in southeastern Mexico and Belize, with comparisons across the species range. (2010). *Chelonian Conservation and Biology*, v. 9, n. 2, p. 250–261.
- Iverson, J. B., Prosser, R. L., & Dalton, E. N. (2009). Orientation in juveniles of a semiaquatic
- Artigo editado conforme Instruções para Autores da Revista Journal of Morphology, acessado pelo seguinte link [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1097-4687](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1097-4687)

- turtle, *Kinosternon flavescens*. *Herpetologica*, 65, 237–245.
- Joyce, W. G., Werneburg, I., & Lyson, T. R. (2013). The hooked element in the pes of turtles (Testudines): a global approach to exploring primary and secondary homology. *Journal of Anatomy*, 223, 421–441.
- Larkins, C. E., & Cohn, M. J. (2015). Phallus development in the turtle *Trachemys scripta*. *Sexual Development*, 9, 34–42.
- Linnaeus, C. (1766). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Stockholm, L. Salvius 12 ed. 1.
- Magalhães, M. S., Vogt, R. C., Sebben, A., Dias, L. C., de Oliveira, M. F., & de Moura, C. E. B. (2017). Embryonic development of the Giant South American River Turtle, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). *Zoomorphology*, 136, 523–537.
- Mahmound, L. Y., Hess, G. L., Klicka, J. (1973). Normal embryonic Stages of the western painted Turtle *Chrysemys picta belii*. *J. Morphol.* 141: 269-279.
- Miller, J. D. (1985). Embryology of marine turtles. In *Biology of the Reptilia* 14: 269-328. Cans, C., Billett, F. & Maderson, P. A. (Eds). Chichester: John Wiley & Sons.
- Molina, F. B., & Gomes, N. (1998). Incubação artificial dos ovos e processo de eclosão em *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron) (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 15, 135–143.
- Okada, Y., Yabe, T., & Oda, S.-I. (2011). Embryonic Development of the Japanese Pond Turtle, *Mauremys japonica* (Testudines: Geoemydidae). *Current Herpetology*, 30, 89–102.
- Pantoja-Lima, J., Pezzuti, J. C. B., Teixeira, A. S., Félix-Silva, D., Rebêlo, G. H., Monjeló, L. A. S., Kemenes, A. (2009). Nest site selection and survival of *Podocnemis* freshwater turtles in low Purus River, Amazon, Brazil. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 1, 37–59.
- Packard, G. C., Packard, M. J. (2000). Developmental plasticity in Painted Turtles, *Chrysemys picta*. *Functional Ecology*, 14, 474–483.
- Parker, W. K. (1880). On the structure and development of the skull in the Lacertilia. *Philos. Trans. Roy. Soc.*, 170: 595-640.
- Rathke, H. (1848). *Ueber die Entwicklung der Schildkröten*. Braunschweig: Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn.
- Richardson, M. K., Gobes, S. M. H., van Leeuwen, A. C., Polman, J. A. E., Pieau, C., Sánchez-villagra, M. R. (2009). Heterochrony in limb evolution: Developmental mechanisms and natural selection. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312, 639–664.
- Sheil, C. A., Portik, D. (2008). Formation and ossification of limb elements in *Trachemys scripta* and a discussion of autopodial elements in turtles. *Zoological Science*, 25, 622–641.
- Tokita, M., Kuratani, S. (2001). Normal Embryonic Stages of the Chinese Softshelled Turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological Science*, 18, 705–715.
- Vieira, L. G., Lima, F. C., Santos, A. L. Q., Mendonça, S. H. S. T., Moura, L. R., Iasbeck, J. R., & Sebben, A. (2011). Description of embryonic stages in *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (Crocodylia: Alligatoridae). *Journal of Morphological Sciences*, 28, 11–22.
- Werneburg, I. (2009). A standard system to study vertebrate embryos. *PLoS ONE*, 4.

doi:10.1371/journal.pone.0005887

Yntema, C. L. (1968). A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*, 125, 219–251.

Yntema, C. L. (1979). Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*, 159, 17–27.

Quadro 1 – Características morfológicas e estágio de desenvolvimento embriológico do *Kinosternon scorpioides*.

Estágio	Características craniais	Membros	Complexo Carapaça-plastrão	Outras características
10	Quatro arcos faríngeos estão presentes, as dobras neurais estão fundidas anteriormente, e o rudimento ótico é perceptível. Além disso, a vesícula óptica está fechada.	Pode-se observar o broto do membro anterior como uma dilatação na lateral do corpo.		Processo caudal já pode ser visto, porém, seu tamanho é limitado.
11	O quarto arco está completamente delimitado. Processo maxilar se estende em direção do olho. Primeira fenda branquial permanece aberta. Região da pupila pode ser observada.	Presença do broto do membro anterior e posterior, como abaulamentos na região lateral do corpo.		
12	Primeiro, segundo e terceiro sulcos branquiais estão presentes. São vistos 4 arcos brânquias. O primeiro arco branquial está compreendido entre processo maxilar e o mandibular. O processo maxilar ainda possui tamanho igual ao processo mandibular. Primórdio da pigmentação ocular pode ser notado.	Os brotos dos membros são visíveis. O broto do membro anterior com comprimento semelhante a sua largura.		A hérnia está presente e o processo caudal está alongado.
13	A pigmentação ocular está aparente e uma área despigmentada liga a pupila (que também está despigmentada) com a região inferior do olho. O primeiro arco branquial não é mais visível. Processo nasal é aparente (ainda aberto). A vesícula ótica está presente. Primórdio do coração está proeminente.	O broto do membro anterior comprimento maior do que a sua largura (em forma de remo), orientado posteroventralmente. O broto do membro posterior presente.		O processo caudal é bastante evidente.
14	O processo naso-lateral está conectado com processo maxilar. O processo occipital é maior que o processo frontal. A íris está altamente pigmentada e pode ser vista a borda pigmentada da pupila. Nenhum sulco é visível. A maxila e mandíbula ainda estão abertas. O primórdio do coração começa a se retrair para dentro do corpo do embrião.	Os membros anteriores possuem placas digitais (com forma de pá), nos membros anteriores a mesma possui formato de remo, porém ela não apresenta dígitos. Membros orientados caudalmente.	Borda lateral da carapaça está presente, marcada como um sulco na parte lateral do corpo.	A alça intestinal está herniada (em forma de tubo). E o primórdio da papila urogenital é visível.

Continuação

15		As placas digitais dos membros apresentam linhas sutis que originaram os dígitos.	Borda lateral, anterior e posterior da carapaça está presente, as costelas podem ser vistas sutilmente.	
16	O processo maxilar ultrapassa o olho e mandibular encontra-se além da borda do olho. Ocorre o aparecimento da pálpebra superior. A maxila ainda não está formada e a mandíbula está fechada. O processo nasal está formado. Começa a formação da pigmentação na parte posterior da cabeça.	As placas digitais apresentam dígitos nos membros anteriores e posteriores não apresentam dígitos. Pigmentação começa na parte axial dos membros.	As costelas, a borda da carapaça, o plastrão e a ponte são vistos.	O primórdio da papila urogenital aumenta de tamanho.
17	O processo occipital ainda está elevado. A pálpebra inferior é formada. A mandíbula encontra-se além do nível das lentes mais não alcançou o processo frontal. Mandíbula e Maxilares estão formados. A carúncula pode ser observada. Ocorre o aumento da pigmentação na parte posterior da cabeça.	A periferia das placas digitais é serrilhada (nos membros anteriores) e são ligeiramente serrilhadas nos membros posteriores, com dígitos. Ocorre o aumento da pigmentação na parte axial dos membros.	O primórdio das placas epidérmicas vertebrais da superfície carapacial é notado, como linhas sutis. A quilha carapacial vertebral é evidente.	A protuberância urogenital está circundada pela membrana cloacal.
18	O processo occipital se retrai, seu tamanho equivale ao processo frontal. Podem ser notadas protuberâncias marcadas como papilas cutâneas na região ventral do pescoço e também dobras de pele podem ser vistas nessa região do pescoço.	Nos membros anteriores os dígitos estão além da rede (o primeiro a uma distância menor e os outros quatro a uma distância maior) e com uma ligeira demarcação diferenciando o que virar a ser a garra do resto do mesmo.	A borda da carapaça é suave e apresenta escudos com pouca pigmentação, a carapaça possui três quilhas dorsais, e no plastrão são vistas linhas que marcam o primórdio das placas epidérmicas.	
19	A pigmentação da cabeça aumenta: a mesma se apresenta clara no dorso do pescoço, na região do ouvido e no entorno das narinas que ainda estão fechadas.	Surgem nos membros anteriores poucas escamas. A demarcação que diferencia a garra do resto do mesmo é clara.	Pigmentação clara é vista em toda a carapaça, e pontos de pigmentação escura podem ser vistos na parte inferior dos escudos vertebrais. Dobra de pele na parte anterior do plastrão demonstra o que virá a ser o princípio do escudo peitoral.	A hérnia está se retraindo. Pigmentação é vista na cauda, e na protuberância urogenital (onde a membrana continua a crescer ao redor da cloaca).
20	Dobras de pele são vistas em maior número do pescoço e as papilas cutâneas estão cercadas por uma mancha arredondada sem cor.	As garras (sem pigmentação) que possuem pontas grossas e são opacas, estão formadas no membro anterior. No membro posterior as garras se projetam nos quatro primeiros	Pigmentação clara é vista em toda a carapaça, além disso, podem ser visualizados pontos de pigmentação escura na borda dos escudos vertebrais, além disso,	Hérnia continua seu processo de retração. A protuberância urogenital

Continuação

		membros porém é muito menor no último (está internalizada).	está presente na margem dos escudos carapaciais vertebrais e até a metade dos escudos pleurais e nos escudos marginais da carapaça.	está se guardando dentro da abertura cloacal.
21	A região das narinas é evidente, porém não está aberta. Aparece pigmentação na parte anterior da cabeça e também na parte central da região ventral do pescoço.	As garras são delimitadas do resto dos dígitos no nível da rede, e são levemente pigmentadas e curvadas.	A pigmentação está escurecendo na carapaça, no plastrão está clara, a ponte também está pigmentada e como os escudos marginais. Leves ranhuras na carapaça marcam o princípio das rugosidades.	A protuberância urogenital está totalmente circundada pela cloaca, ainda não totalmente fechada. No corpo ocorre o escurecimento da pigmentação corporal.
22	Pigmentação na cabeça adquire manchas escuras e a região ventral do pescoço com coloração mais intensa.	As garras estão fora da membrana interdigital e são rombas com pigmentação uniforme, mas clara. Os membros ainda apresentam poucas escamas.	Carapaça com aspecto rugoso e quilhas com pigmentação clara. Além disso, no plastrão surge uma sutura que dará origem a placa epidérmica peitoral.	Hérnia umbilical ainda presente
23	As pálpebras superiores encontram-se na metade do cristalino. Manchas de pigmentação listradas são vistas na cabeça e no pescoço. Parte inferior da mandíbula encontra-se despigmentada.	Os membros anteriores possuem membranas interdigitais, pigmentação pesada, escamas e garras longas com estrutura homogênea. Dobras cutâneas estão presentes no dorso do membro anterior. Os membros posteriores apresentam quatro dígitos com garras, porém e o último dígito encontra-se na membrana interdigital.	Pigmentação e escudos com aparência rugosa são bastante evidentes na carapaça. Quilhas dorsais laterais não pigmentadas. O plastrão encontra-se pigmentado. Algumas áreas do plastrão e dos escudos marginais encontram-se despigmentadas.	A papila urogenital não é mais vista. A cauda possui escamas. Pigmentação escura dispersa em praticamente todo o corpo do embrião, exceto em algumas áreas das cabeça e plastrão.
24	As pálpebras inferiores ultrapassam o cristalino. As narinas estão abertas. As protuberâncias abaixo da mandíbula aumentam. A carúncula é nítida e pontuda. Mandíbula apresenta-se pigmentada.	O último dígito do membro posterior continua internalizado. Bases das garras pigmentadas, dígitos com membrana, dobra cutânea proeminente, garra contundente e se estende no comprimento de seu rudimento, e está dentro de um involucre levemente opaco.	Placas marginais da carapaça começam a apresentar um aspecto rugoso, semelhantes ao das demais placas epidérmicas da carapaça. Dobra de pele que dará origem a placa peitoral aumenta de tamanho.	Cloaca totalmente fechada. Hérnia ainda presente.

 Continuação

25	Ocorre a dispersão da pigmentação da cabeça.	A pigmentação nas garras aumenta e a mesma está diferenciada dentro da bainha translúcida que a cobre.	A carapaça e o plastrão encontram-se calcificados. Pigmentação escurece e se dispersa nos escudos do plastrão e a mesma aumenta nos escudos marginais.	A hérnia umbilical ainda está aberta no plastrão. O corpo do embrião apresenta uma cor verde escuro, exceto nas regiões que apresentam manchas como a cabeça e plastrão.
26	Toda região cranial apresenta pigmentação esverdeada, que juntamente com manchas pequenas amarelas, formam listradas disformes.	O involucro (bainha) sobre as garras estão gastos.	A carapaça apresenta cor marrom escura e aspecto rugoso. O plastrão apresenta aspecto liso, com manchas amarelas e negras.	A hérnia é uma região macia no plastrão que está fechada, sem ou com pouco resto de saco vitelínico.

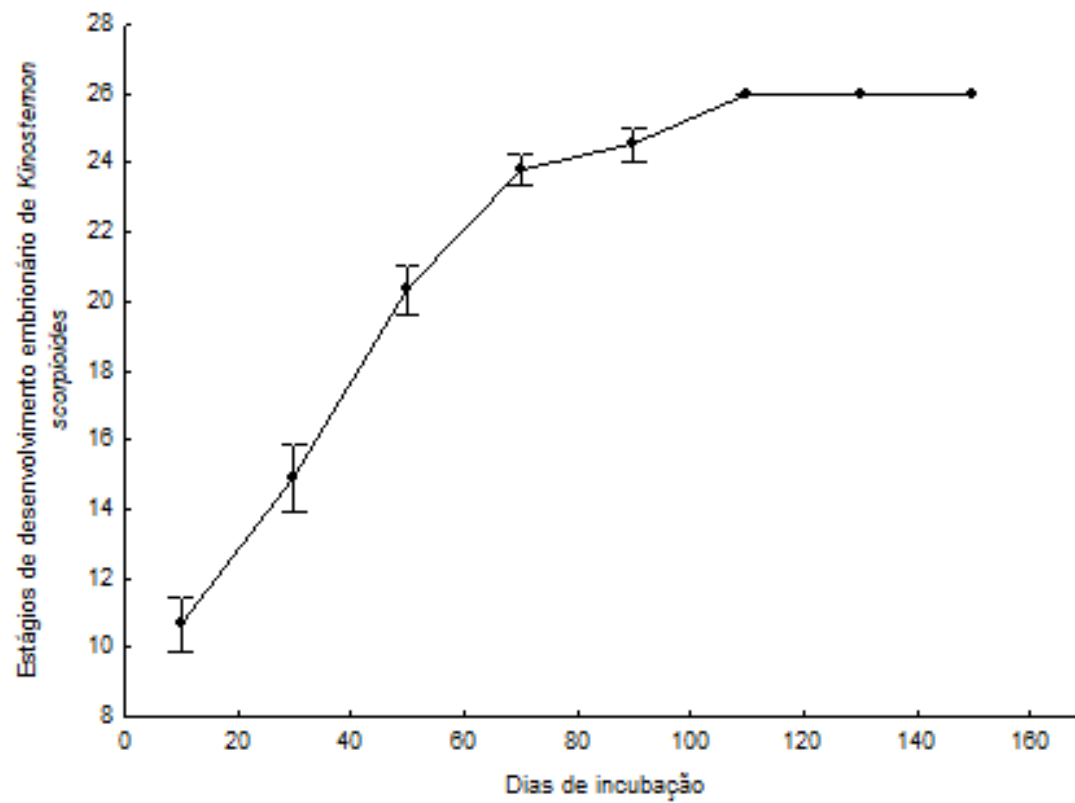


Figura 1: Estágios de desenvolvimento embrionário em função dos dias de incubação de *K. scopioides*.

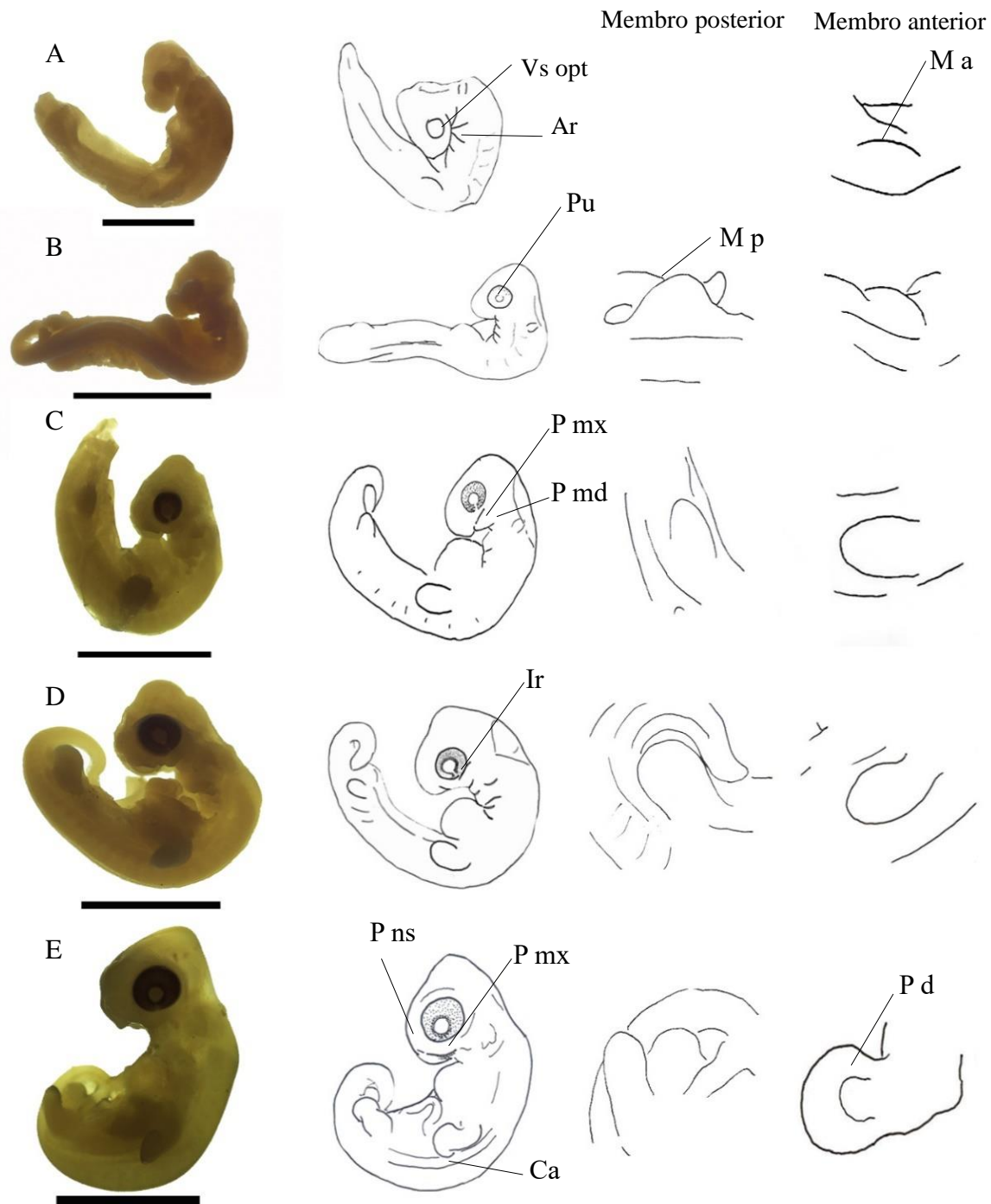


Figura 2: Estágios de 10 a 14 de *K. scorpioides* (escala igual a 2mm), destaque para a morfologia do membro posterior e anterior à direita. A) Estágio 10: Presença de quatro arcos faríngeos (Ar), da vesícula óptica (Vs op) e do membro anterior (M a). B) Estágio 11: região da pupila (Pu) pode ser vista, além do membro posterior (M p). C) Estágio 12: pode ser notada a presença do processo maxilar (P mx) e mandibular (P md). D) Estágio 13: região da íris (Ir) presente e pigmentada, exceto na lista branca na região inferior do olho. E) Estágio 14: Conexão do processo nasal (P ns) com o processo maxilar (P mx), presença da borda lateral da carapaça (Ca), presença da placa digital (P d) nos membros.

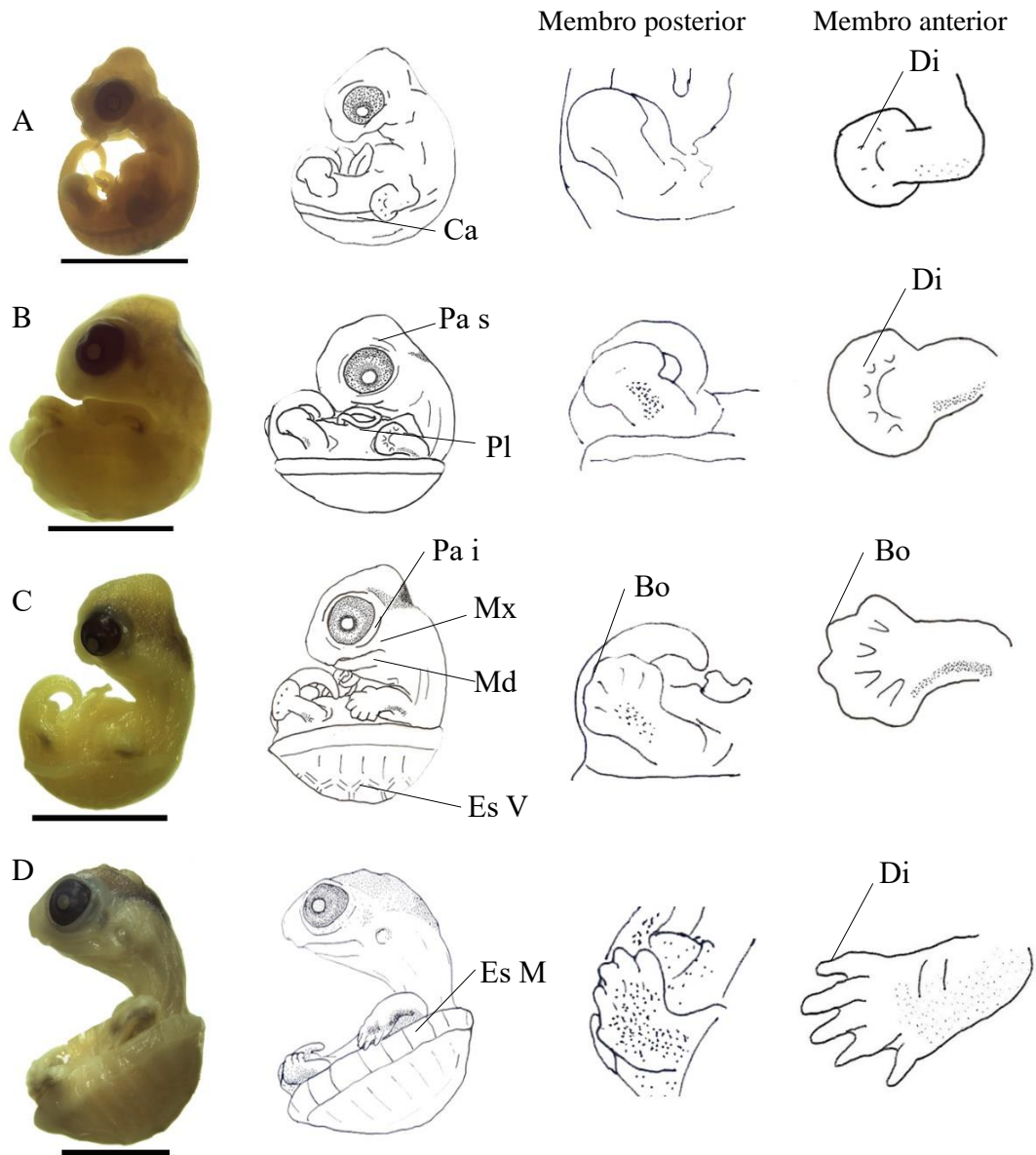


Figura 3: Estágios de 15 a 18 de *K. scorpioides* (escala igual a 2mm), destaque para a morfologia dos membros posterior e anterior. A) Estágio 15: carapaça (Ca) formada, começo dos dígitos (Di) é percebido na placa digital. B) Estágio 16: Pálpebra superior (Pa s) foi visualizada, além do plastrão (Pl) e dígitos (Di) (de forma evidente) na placa digital. C) Estágio 17: visualização da pálpebra inferior (Pa i), maxila (Mx) e mandíbulas (Md) formados, escudos vertebrais (Es v) presentes na carapaça, borda (Bo) da placa digital serrilhada. D) Estágio 18: Escudos marginais (Es M) da carapaça, dígitos (Di) além da placa digital.

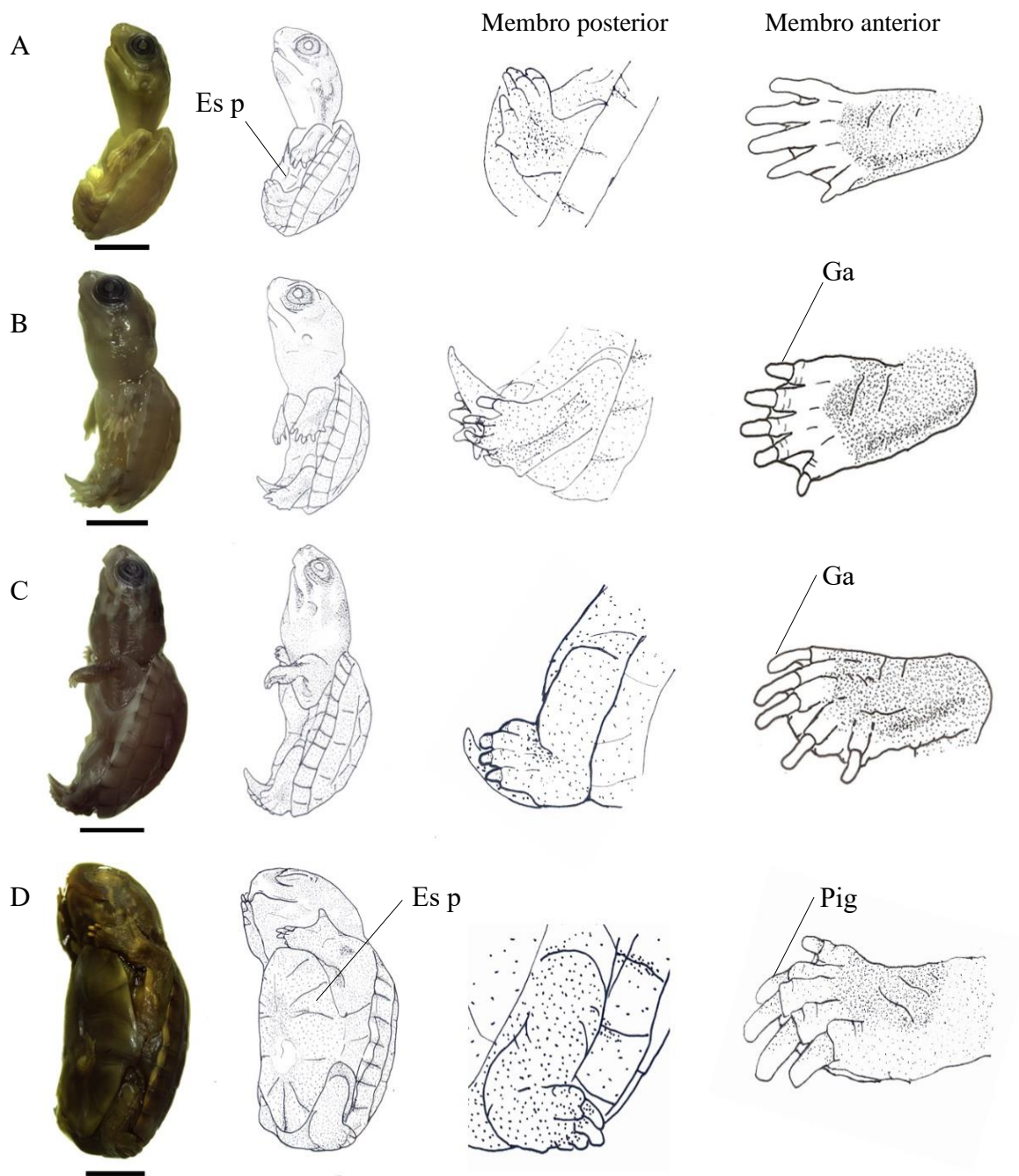


Figura 4: Estágios de 19 a 22 de *K. scorpioides* (escala igual a 4mm), destaque para a morfologia dos membros posterior e anterior. A) Estágio 19: princípio do escudo peitoral (Es p) do plastrão. B) Estágio 20: garras (Ga) despigmentadas com pontas grossas. C) Estágio 21: garras (Ga) pigmentadas e curvas. D) Estágio 22: escudo peitoral (Es p) formado, garras com pigmentação (Pig) na parte proximal.

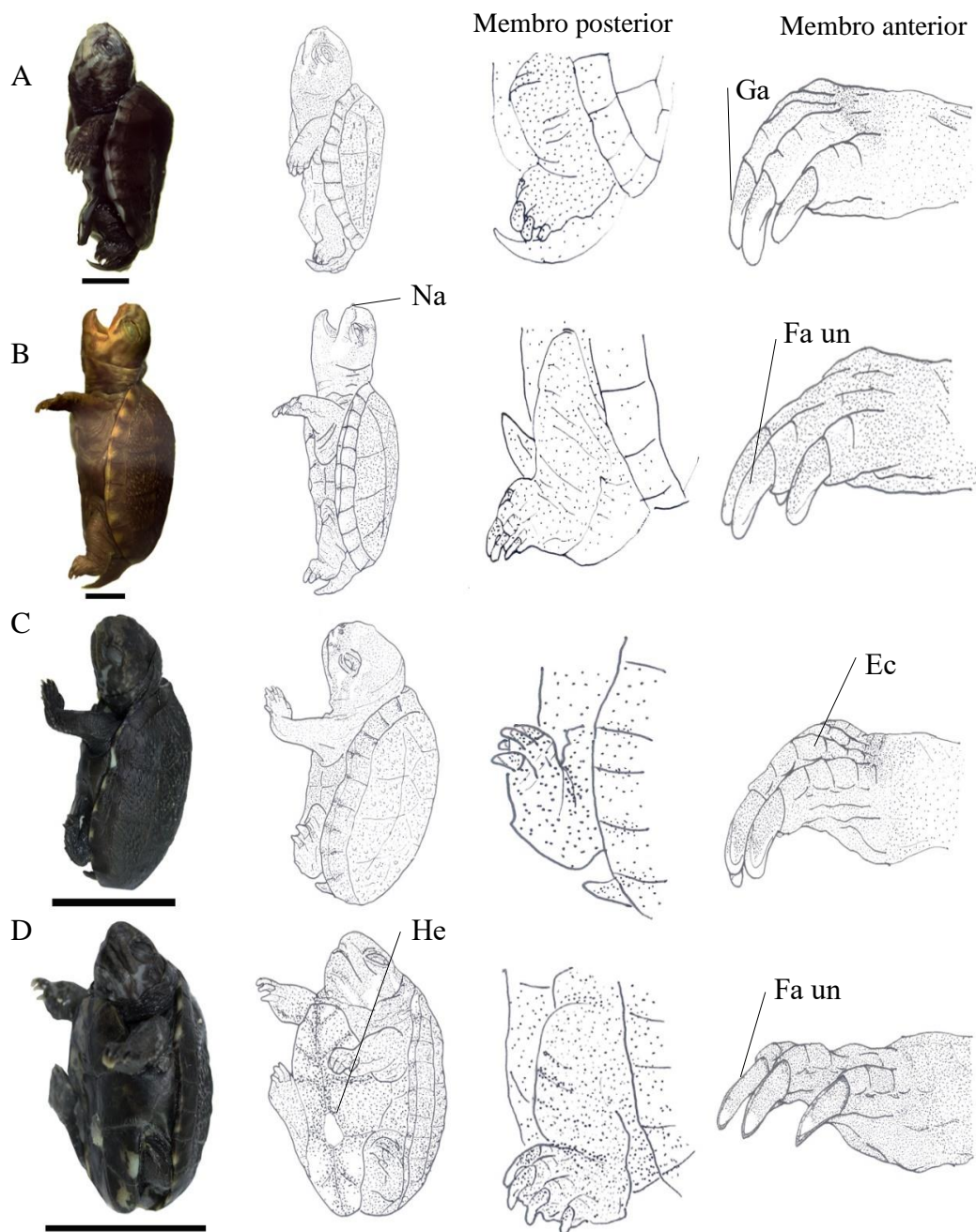


Figura 5: Estágios de 23 a 26 de *K. scorpioides* (escala igual a 6mm), destaque para a morfologia dos membros posterior e anterior. A) Estágio 23: garras (Ga) longas e curvas. B) Estágio 24: narinas (Na) abertas, formação da falange ungueal (Fa un). C) Estágio 25: escamas (Ec) nos membros são evidentes, falange ungueal vista coberta por um involucro translucido. D) Estágio 26: hérnia (He) umbilical fechada, involucro que recobria falange ungueal (Fa un) estão gastos.

Tabela 1: Morfometria de embriões de *K. scorpioides* (ES: estágio; L. OL.: Largura do olho; L. CAB.: Largura da Cabeça; C. CAR.: Comprimento da carapaça; C. PL.: Comprimento do plastrão; L. CAR.: Largura da carapaça; L. PL.: Largura do plastrão; A.C.P.: Altura carapaça-plastrão; C.C.N.: Comprimento cabeça-nádega).

ES	L. OL	L. CAB	C. CAR	C. PL	L. CAR	L. PL	A.C.P.	C.C.N.
10	0,03±0,01	0,09±0,02	-	-	-	-	-	0,40±0,60
11	0,04±0	0,15±0,01	-	-	-	-	-	0,48±0,07
12	0,07±0,01	0,16±0,02	-	-	-	-	-	0,53±0,08
13	0,06±0,02	0,16±0,04	-	-	-	-	-	0,54±0,02
14	0,12±0,01	0,26±0,03	-	-	-	-	-	0,65±0,04
15	0,11±0,03	0,20±0,06	0,47±0,02	-	0,23±0	-	-	-
16	0,16±0,01	0,26±0,03	0,58±0,01	0,25±0,03	0,48±0,05	0,19±0,02	0,23±0,04	-
17	0,20±0,03	0,36±0,06	0,66±0,15	0,45±0,19	0,46±0,08	0,38±0,13	0,29±0,08	-
18	0,22±0,02	0,41±0,07	0,90±0,13	0,55±0,06	0,65±0,06	0,46±0,05	0,47±0,05	-
19	0,23±0,01	0,52±0,01	1,20±0,03	0,76±0,08	0,87±0,08	0,63±0,07	0,57±0,04	-
20	0,23±0,07	0,58±0,05	1,33±0,11	0,96±0,08	0,80±0,26	0,71±0,05	0,57±0,05	-
21	0,28±0,03	0,65±0,05	1,61±0,16	1,22±0,17	1,22±0,14	0,95±0,13	0,76±0,03	-
22	0,28±0,03	0,69±0,04	1,65±0,15	1,36±0,18	1,26±0,09	1,03±0,06	0,82±0,08	-
23	0,32±0,02	0,74±0,06	2,09±0,28	1,76±0,17	1,44±0,14	1,20±0,20	1,00±0,16	-
24	0,33±0,07	0,76±0,10	2,45±0,22	2,04±0,23	1,73±0,16	1,45±0,14	1,36±0,21	-
25	0,39±0,05	0,84±0,06	2,83±0,18	2,43±0,20	1,88±0,09	1,64±0,07	1,37±0,15	-
26	0,39±0,03	0,84±0,06	2,82±0,25	2,55±0,39	2,06±0,21	1,72±0,10	1,50±0,13	-

Tabela 2: Volume (ml) de embriões de *K. scorpioides*, apresentando médias e desvios-padrões (ES.: Estágios de desenvolvimento; CO.: Coração; FI.: Fígado; TG.: Tubo gastroentérico; CP.: Corpo).

ES	CO	FI	TG	CP
18	0,01±0	0,01±0	0,02±0	0,31±0,15
19	0,01±0	0,02±0,01	0,02±0	0,55±0,15
20	0,01±0	0,02±0,01	0,02±0,01	0,85±0,6
21	0,03±0,03	0,05±0,03	0,07±0,06	0,90±0,97
22	0,02±0	0,05±0,02	0,07±0,05	0,70±0,24
23	0,03±0,01	0,12±0,05	0,10±0,02	2,00±0,67
24	0,01±0,01	0,14±0,03	0,15±0,05	2,48±1,03
25	0,02±0,01	0,16±0,04	0,15±0,03	4,88±1,00
26	0,06±0,03	0,20±0,07	0,18±0,07	5,35±0,81

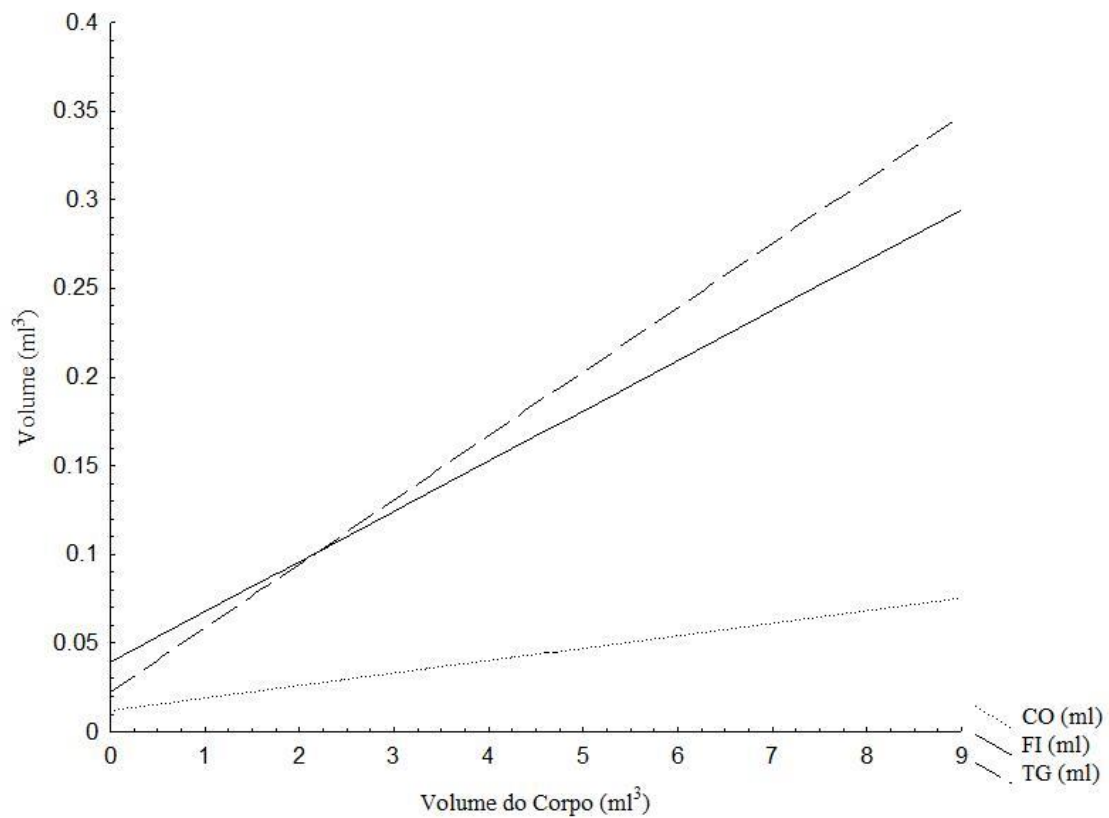


Figura 6: Volume do tubo gastroentérico (TG), coração (CO) e fígado (FI), em função do volume do corpo de embriões de *K. scorpioides*.

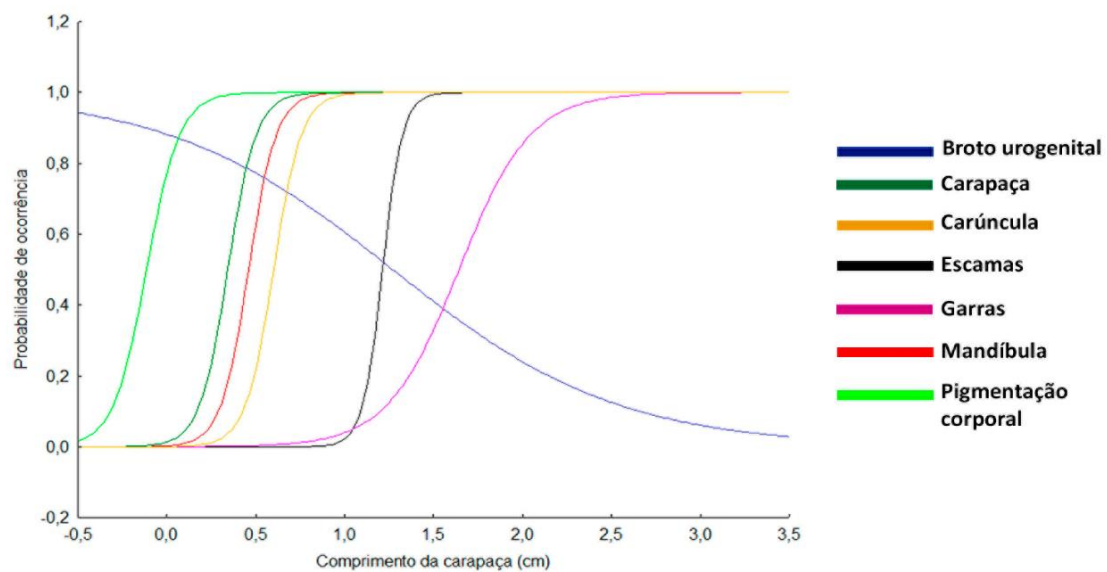


Figura 7: Probabilidade de ocorrência de caracteres externos macroscópicos, em embriões de *K. scorpioides*, em função do comprimento da carapaça.

Material Suplementar

Tabela 1: Matriz de correlação de Spearman das análises morfométricas, dias de incubação e estágios de desenvolvimento, obtidas de embriões de *K. scorpioides*, atestando a relação existente entre todas as variáveis testadas (ES: estágio; L. OL.: Largura do olho; L. CAB.: Largura da Cabeça; C. CAR.: Comprimento da carapaça; C. PL.: Comprimento do plastrão; L. CAR.: Largura da carapaça; L. PL.: Largura do plastrão; A.C.P.: Altura carapaça-plastrão; C.C.N.: Comprimento cabeça-nádega).

	ES.	L. OL.	L. CAB.	C. PL.	L. CAR.	C. CAR.	L. CAR.	A. C. P.
ES.	1,00	0,89	0,92	0,95	0,96	0,96	0,95	0,96
L. OL.	0,89	1,00	0,87	0,89	0,88	0,89	0,87	0,88
L. CAB.	0,92	0,87	1,00	0,93	0,93	0,94	0,93	0,94
C. PL.	0,95	0,89	0,93	1,00	0,97	0,97	0,95	0,96
L. CAR.	0,96	0,88	0,93	0,97	1,00	0,97	0,97	0,97
C. CAR.	0,96	0,89	0,94	0,97	0,97	1,00	0,96	0,97
L. CAR.	0,95	0,87	0,93	0,95	0,97	0,96	1,00	0,95
A.C. P.	0,96	0,88	0,94	0,96	0,97	0,97	0,95	1,00

Tabela 2: Matriz de correlação de Spearman das análises de volume e estágios de desenvolvimento, obtidas de embriões de *K. scorpioides*, atestando a relação entre as variáveis testadas. (ES.: Estágios de desenvolvimento; CO.: Coração; FI.: Fígado; TG.: Tubo gastroentérico; CP.: Corpo).

	ES	CO	FI	TG	CP
ES	1,00	0,84	0,91	0,89	0,94
CO	0,84	1,00	0,83	0,84	0,82
FI	0,91	0,83	1,00	0,92	0,91
TG	0,89	0,84	0,92	1,00	0,90
CP	0,94	0,82	0,91	0,90	1,00

CAPÍTULO II

Desenvolvimento esquelético dos membros de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Chelonia: Kinosternidae)

Autor: Braga, B. S. S.

Instituição: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Reprodução Animal.

RESUMO

K. scorpioides é um quelônio encontrado na América Central e Sul, ainda pouco conhecido, e cujos estoques naturais são sobre-explorados. O estudo da morfologia dos membros é uma ferramenta utilizada para o entendimento da evolução de tetrápodes, sendo útil no estudo da sua taxonomia e biologia. Deste modo, o objetivo principal deste trabalho foi descrever a esqueletogênese dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpioides*. As amostras foram diafanizadas, em seguida a clarificação foi realizada com hidróxido de potássio, as cartilagens foram coradas com Alcian blue, e os ossos com Alizarina sódica. Os membros foram vistos formados pelo estilopódio (úmero nas mãos e fêmur nos pés), zeugopódio (rádio e ulna nas mãos e tíbia e fíbula nos pés), e autopódio (região carpal e falanges nas mãos e região tarsal e falanges nos pés). Os membros surgiram a partir do estágio embrionário 10, sendo compostos por células mesenquimais. Estas foram vistas condensadas no estágio 14, onde foi notado o primeiro centro de condrificação do úmero e do fêmur. Os centros de condrificação do rádio e da ulna, além da tíbia e da fíbula, surgiram no estágio 15; os centros na região carpal e nos metacarpais e também na região tarsal e metatarsais no estágio 16; as cartilagens das falanges proximais em ambos os membros a partir do estágio 17; e no estágio 18 os moldes de cartilagens de todos os ossos, dos membros anteriores e posteriores, estavam presentes. A ossificação foi vista no estágio 20, no úmero e no fêmur, e prosseguiu para os ossos do rádio, ulna, tíbia e fíbula. Durante o estágio 22, os metacarpais e metatarsais começaram a apresentar ossificação, e no 23 ela já estava bem direcionada para as epífises dos ossos em ambos os membros. Nas epífises permaneceram somente as cartilagens articulares no estágio 26 e na eclosão. A região carpal não apresentou centro de ossificação após eclosão, na maioria dos espécimes analisados. Existem diferenças relacionadas ao hábito e a função entre os elementos esqueléticos que compõem os membros de quelônios. Os resultados mostram que a formação óssea dos membros de *K. scorpioides* são semelhantes aos observados em quelônios semiaquáticos, apresentando diferenças entre a estruturas da região carpal e tarsal, e número de falanges. Desta forma, são fornecidos dados inéditos para melhor entendimento taxonômico deste grupo, assim como podem servir de base para comparação de possíveis anomalias do esqueleto, advindas de questões fisiológicas ou mutagêneses, provocadas por agentes externos.

Palavras-chave: membros, quelônios, Kinosternidae, ontogenia, esqueletogênese, diafanização.

INTRODUÇÃO

Os quelônios evoluíram há cerca de 200 milhões de anos atrás, no período Jurássico. Estão entre os vertebrados mais especializados morfologicamente, devido ao surgimento de sua principal característica, o complexo carapaça-plastrão. Esta estrutura garantiu o sucesso evolutivo deste táxon, e a sua preservação em tempos atuais (Pough et al. 2003; Hildebrand & Goslow 2006; Chiari et al. 2012). Os seus membros são altamente variáveis, refletindo o ambiente e os modos de locomoção das suas espécies (Richardson et al. 2009; Vieira et al. 2011). As tartarugas marinhas possuem os membros anteriores em forma de remo e maiores que os posteriores; os cagados de água doce têm ambos espalmados, com dedos distintos possuindo quatro ou cinco garras; enquanto que as espécies terrestres apresentam membros em forma de coluna, com dedos indistintos (Burke & Alberch 1985; Romer & Parsons 1995; Pough et al. 2003; Hildebrand & Goslow 2006). O sistema locomotor apresenta grande relevância taxonômica, por ser um dos responsáveis pela sustentação do corpo e o deslocamento animal, estando associado a certas patologias (Cubas & Baptistotte 2007).

O Brasil possui uma das maiores áreas de ocorrência de quelônios do mundo, apresentando cerca de 35 espécies catalogadas (Martins & Molina 2008). Dentre as quais são encontradas na Amazônia cerca de 18 espécies. Abrangendo táxons das duas subordens existentes. Pleurodira constituída pelas famílias Podocnemididae e Chelidae; e Criptodira formada pelas famílias Geoemydidae, Testudinidae e Kinosternidae (Ferrara et al. 2017), a qual pertence *Kinosternon scorpioides*.

K. scorpioides, é um cágado da Família Kinosternidae, conhecida vulgarmente como muçã. Sua distribuição geográfica se estende por grande parte do continente Americano, ocorrendo no México, América Central, Bolívia, Peru, Venezuela, Equador, Brasil, Guianas, Guiana Francesa, Suriname, Paraguai e Argentina (Berry & Iverson, 2011). No arquipélago do Marajó-Brasil esta espécie é intensamente caçada e comercializada (Cristo et al. 2017), e não se conhece o tamanho e as taxas de renovação dos estoques naturais nesta região. A espécie é de fácil identificação por apresentar três quilhas longitudinais na carapaça lisa e estreita, a cabeça larga, com o queixo forte e arqueado. O plastrão largo é ligado à carapaça através de pontes, onde existem lobos articulados por uma área central como uma mola (chamada dobradiça), podendo mover-se, servindo para proteção (Berry & Iverson, 2011). Esses animais apresentam membros pentadáctilos, com garras nas suas extremidades, interligados por membranas interdigitais.

Sánchez-Villagra (2008) afirma que sequências de condrificação e ossificação são importantes fontes de dados para análises sistemáticas, visto que pesquisas em diferentes espécies têm auxiliado no entendimento da evolução de grupos tetrápodes. Apesar de haver diversos trabalhos sobre a osteogênese de quelônios e répteis (Rhodin, 1985; Sánchez-Villagra et al., 2008; Werneburg et al., 2009; Vieira et al., 2011; Danielson & Sheil, 2017; Gregorovičová et al., 2018), nos Kinosternidae foi pouco estudada. Rieppel (1994) verificou o desenvolvimento do esqueleto de quelônios, com base na *Chelydra serpentina*, e observou os padrões de ossificação em juvenis de *Kinosternon integrum*, porém não forneceu informações detalhas sobre a ossificação e anatomia destes.

Neste contexto, torna-se necessária a compreensão do desenvolvimento morfológico normal dos animais, o qual poderá servir como parâmetro comparativo quando em condições fisiológicas ou ambientais desfavoráveis. Sendo uma ferramenta útil para os estudos de conservação de populações silvestres, ou no manejo *ex situ*. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi a descrição da osteogênese do *K. scorpioides*, por meio da observação do processo de condrificação e ossificação dos seus membros.

MATERIAL E MÉTODO

As amostras foram obtidas no criatório de pesquisa de *K. scorpioides*, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental), 48° 30' e 54" de longitude W e 00° 45' e 21" de latitude S, localizado na cidade de Salvaterra-Pará-Brasil, onde ocorreu a coleta dos ovos. Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética Animal da Embrapa Amazônia Oriental (n° 001/2016).

Os ovos foram incubados artificialmente (Incubadora Ecological Premium®, modelo IP-R), com controle de temperatura a 28,5°C e 80 % de umidade, e mantidos em recipientes contendo vermiculita umidificada. Foram coletados no mínimo, três ovos a cada cinco dias. Posteriormente, as amostras foram fixadas em solução de *Boiun* e conservadas em álcool 70%.

Realizou-se a diafanização de três animais, por fase de desenvolvimento embrionário, em amostras a partir do estágio 14, no qual ocorre o aparecimento da placa digital nos membros. O protocolo estabelecido foi adaptado de Taylor & Van Dyke (1985). Para nomear as estruturas do esqueleto dos membros de *K. scorpioides*, foi utilizado a Nômina Anatômica Veterinária (Bryden & Halnan, 2008).

Primeiramente, as amostras foram imersas em água por 24 horas, para se retirar o excesso de álcool. Após esse processo, foi iniciada a coloração das cartilagens, na qual o material foi

imerso em uma solução alcoólica de *Alcian Blue* 8GX 0,2 mg/mL, por 24 h. Posteriormente, as amostras foram submersas em solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) na concentração de 6%, onde ficaram até a visualização das estruturas internas dos animais. O tempo desta etapa foi específico para cada estágio de desenvolvimento embrionário. Quando a clarificação estava totalmente finalizada, adicionou-se KOH 6% à solução Vermelho de Alizarina Sódica, para a coloração de estruturas mineralizadas. Em seguida, todas as amostras foram transferidas para solução de Glicerina com KOH 6%, em série crescente de 30%, 50%, 90%, e finalmente em Glicerina P.A.

As amostras foram fotografadas com câmera digital CANON® EOS REBEL T5, acoplada a lente macro de 60mm. Os indivíduos com tamanho de carapaça menor que 2,5 cm foram fotografados em estereomicroscópio Leica® EZ4 HD.

Para a análise histológica, foram utilizados embriões a partir do estágio 12 de desenvolvimento embrionário. As amostras foram encaminhadas para o processo histológico, onde foram desidratadas em solução etanólica crescente (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina.

RESULTADOS

Os membros anteriores (Figura 1A) do *K. scorpioides* são formados pelos seguintes ossos:

1- **Estilopódio:** é composto pelo úmero, que se articula em sua epífise proximal (cabeça) com a escápula. Esse osso também apresenta duas superfícies não articulares, o tubérculo maior (dorsal) e o menor (ventral). E na epífise distal se articula através de dois côndilos, o capítulo que se une a ulna e a tróclea com o rádio.

2- **Zeugopódio:** é constituído pela ulna e rádio. A ulna apresenta superfície articular ovóide, articula-se distalmente com os ossos do carpo proximal (ulnar e intermédio), e lateralmente com o rádio. O rádio, osso longo que está situado na parte ventral do antebraço, apresenta superfície articular umeral em formato semilunar, e superfície articular ulnar plana. Esse osso se articula em sua epífise distal com os carpais proximais (intermédio, e central III e II).

3- **Autopódio:** é formado pelos ossos do carpo, de formatos irregulares. Possuem na sua fileira proximal os ossos intermédio, ulnar, central III e II, e o pisiforme; na fileira distal estão os carpais distais I, II, III, IV e V.

3.1- Carpais proximais: o intermédio situa-se a entre a ulna e o rádio, e a sua porção distal se encontra com o ulnar, central III e II. O ulnar se articula na porção distal com os carpais distais IV e V. O central III, distalmente, se articula com os carpais III e II; o central II, articula-se na porção distal com o carpal distal II e I; o pisiforme é um osso sesamóide, envolvido na sustentação de tendões, se articula com o ulnar e com o V carpal distal.

3.2- Carpais distais: articulam-se distalmente com metacarpais, e são constituídos pelos ossos, enumerados no sentido médio-lateral, carpais distais I, II, III, IV e V.

3.3- Metacarpais: são ossos longos com cabeça distal e base expandida proximal, que se articulam distalmente com as falanges proximais, são dispostos médio lateralmente, e denominados de metacarpais I, II, III, IV e V.

3.4- Falanges: são em número 14, e estão dispostas entre as fileiras proximais (dígito I, II, III, IV e V), fileira medial (dígito II, III, IV e V) e a fileira distal (dígito I, II, III, IV e V). Sendo a fórmula falângica 2:3:3:3:3. As falanges proximais I, II, III, IV e V se articulam distalmente com as distais no dígito marginal I. No restante dos dígitos II, III, IV e V se articulam com as falanges centrais, em sua porção distal. Falanges centrais II, III, IV e V, na sua porção distal, se articulam com as falanges distais. As Falanges distais apresentam formato cônico, e são ungueadas.

Os membros pelvins (Figura 1B) do *K. scorpioides* são constituídos pelos seguintes ossos:

1- **Estilopódio**: é formado pelo fêmur, que se articula com a cintura pélvica. Esse osso possui a cabeça ovalada, para articular com o acetábulo e dois trocânteres, o menor (dorsalmente) e o maior (ventral). Articula-se distalmente com os ossos da tíbia e a fíbula, através dos côndilos tibial e fibular.

2- **Zeugopódio**: é composto pela tíbia e fíbula, que apresentam comprimento semelhante, sendo o primeiro mais robusto. As suas extremidades são expandidas latero-medialmente, onde ficam as articulações. A tíbia e a fíbula se articulam, em sua porção distal, com o carpal proximal astrágalo-calcâneo.

3- **Autopódio**:

3.1- Tarsal proximal: é formado por um único osso, astrágalo-calcâneo, que se articula distalmente com os tarsais distais I, II, III e IV.

3.2- Tarsais distais I, II, III e IV: apresentam formato irregular, sendo o IV maior que os demais, e se articulam distalmente com os metatarsais I, II, III, IV e V.

3.3- Metatarsais I, II, III, IV e V: se articulam distalmente com as falanges proximais I, II, III, IV e V.

3.4- Falanges: são em número 14, e são dispostas entre as fileiras proximais (dígitos I, II, III, IV e V), fileira medial (dígitos centrais II, III, IV e V) e a fileira distal (dígitos I, II, III, IV e V). Sendo a fórmula falângica 2:3:3:3:3. Falanges proximais I, II, III, IV e V se articulam distalmente com as centrais II, III, IV e V. Falanges centrais II, III, IV e V se articulam distalmente com as distais I, II, III, IV e V. Falanges distais I, II, III, IV e V são menores, com formato cônico, e estão envoltas por tecido cornificado, diferenciado em garra. O dígito V permanece encoberto na membrana interdigital, e é quase não aparente, externamente.

No quadro 1 estão descritos os eventos morfológicos que surgem durante a osteogênese dos membros (anteriores e posteriores) em *K. scorpioides*. Em relação as observações histológicas, as células que formam o broto do membro anterior em estágio 10, também foram observadas nos estágios 12 e 13, sendo formadas por uma massa mesenquimal. Na região periférica foi observada uma fileira de células germinativas, indicando a presença do cume ectodérmico apical. No estágio 14 (Figura 2A e 5A), foi visualizada, por microscopia óptica, a presença de células mesenquimais formando o broto do membro anterior, apresentando uma região com células condensadas com características mesenquimais na região central, que virá ser o úmero. Histologicamente, no estágio 15 (Figura 2B e 5B) observou-se a presença de condrócitos indicando os primeiros centros de ossificação do rádio e da ulna. Já no estágio 16 (Figura 2C e 6A/B), na histologia observar-se a condrogênese do úmero, da ulna, do rádio, além do primeiro centro de condrogênese dos ossos ulnar, acessório, intermédio, que compõem a fileira proximal do carpo, e também os primeiros centros dos distais carpais I, II, III, IV e V (onde o IV carpal apresenta maior tamanho e afinidade ao corante) e dos metacarpais, marcada pela presença de condrócitos. No estágio 17 (Figura 2D e 7A/B), foi observada o primeiro centro condrogênico das falanges proximais e também das falanges centrais, acreditamos que este esteja em tamanho reduzido não apresentando afinidade acentuada pelo corante Alcian blue.

Macroscopicamente, com auxílio do processo de diafanização, foi observado no estágio 18 (Figura 2 E), as cartilagens de todos os ossos que compõem o membro anterior de *K. scorpioides*, inclusive o pisiforme. A diáfase do úmero, ulna, radio se encontra despigmentada de Alcian ou apresentando uma coloração fraca, podendo indicar o começo de uma ossificação endocondral. No estágio 19 (Figura 3A), os moldes de cartilagens dos ossos metacarpais e

falanges proximais II, III e IV, apresentam a diáfase clara. No estágio 20 (Figura 3B), pode ser observado o primeiro centro de ossificação do úmero, localizado na diáfase deste osso, esta estrutura foi caracterizada pela presença de pigmentando do corante Alizarina Red-S. Além do fato da diáfase das falanges centrais encontradas nos dígitos II, III e IV, estarem com ausência de afinidade com o Alcian blue, ou com pouca afinidade. O estágio 21 (Figura 3C), apresentou-se semelhante ao estágio 20. No estágio 22 (Figura 3D), foi visto que os ossos longos apresentaram a diáfase corada com alizarina e as epífises coradas com Alcian, são eles: úmero, ulna, radio, metacarpais, e falanges distais, centrais e proximais. No estágio 23 (Figura 3E), 24 e 25 (Figura 4A e B), neste estágio os ossos longos já apresentam cartilagem articular. No estágio 26 (Figura 4C) a região carpal, em grande parte das amostras não apresentou afinidade pelo corante Alcian, e em apenas três amostras foram observados os carpais distais corados com Alizarina.

O membro posterior surgiu no estágio 11 como uma dilatação lateral no embrião, pressupõem-se que histologicamente este é composto pelas mesmas células presente dos embriões do estágio 12. No estágio 12 e 13, histologicamente, o membro foi visto sendo composto por uma massa mesenquimal, na sua periferia foi observado fileiras de células germinativas indicando a presença do cume ectodérmico apical. No estágio 15 (Figura 2B e 8A), foi visualizado um aglomerado de células mesenquimais na região central do membro e pode-se observar a presença do primeiro centro condrogênico do fêmur, da tíbia e da fíbula carpais proximais. No estágio 16 (Figura 2C e 8B), foi visto o primeiro centro condrogênico do calcâneo, além do primeiro centro dos tarsais distais II, III e IV, e os metatarsais II, III e IV. No estágio 17 (Figura 2D e 9A/B), foi visto o primeiro centro condrogênico do astrágalo, e são vistos todos os tarsais distais I, II, III e IV, além dos metatarsais I, II, III, IV e V, e dos primeiros centros das falanges proximais e centrais II, III, IV.

Através da análise macroscópica realizada com a ajuda do processo de diafanização, no estágio 18 (Figura 2E), a formação de todos os moldes de cartilagens que compõem o membro posterior já está presente, porém as diáfases dos ossos longos: fêmur, tíbia e fíbula; encontram-se despigmentadas de Alcian ou apresentando uma coloração bem fraca, podendo indicar o começo de ossificação endocondral, onde ocorre a substituição do molde de cartilagem por tecido ósseo mineralizado. No estágio 19 (Figura 3A), astrágalo é visto fundido com o calcâneo. No estágio 20 (Figura 3B), foi visualizado o primeiro centro de ossificação do fêmur. No estágio 21 (Figura 3C) foi observado estruturas semelhantes ao estágio 20. No estágio 22 (Figura 3D),

foi observado as epífises de ossos longos coradas com Alcian, e as diáfases coradas com alizarina. No estágio 23 (Figura 3C), 24 e 25 (Figura 4 A e B), foi notado o aumento do processo de ossificação que se direcionou para epífises, observando a presença do Alcian blue somente nas cartilagens articulares dos ossos longos e nos ossos tarsais. No estágio 26 (Figura 4C), os tarsais distais apresentaram ossos corados como Alizarina, o restante dos elementos tarsais, ou não apresentaram afinidade com o corante, ou as substâncias glicosaminoglicanos coradas com *Alcian blue*.

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou a formação estrutural e embriológica dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpioides*, dentro dos padrões fisiológicos da espécie. Os elementos esqueléticos foram semelhantes aos visualizados nos quelônios. Porém, demonstrou-se que existem diferenças relacionadas ao hábito e a função destas estruturas, observados na sua perda ou redução, seja no número de falanges, ou fusão de elementos carpais ou tarsais.

Os membros anteriores de *K. scorpioides* possuem padrão geral semelhante ao observado em tetrápodos (Griffin, 2018), ou seja, apresentam estilopódio (úmero ou fêmur), zeugopódio (ulna e rádio, ou tibia e fíbula), e autopódio (carpais, tarsais e falanges). As diferenças foram observadas nos dígitos e na região carpal e tarsal, variando na quantidade de falanges e de elementos carpais e tarsais. Comprovando que estas estruturas representam a adaptação desta espécie ao seu habitat e comportamento (postura e locomoção) (Pough al., 2003; Ludwig et al., 2007; Fabrezi et al., 2009).

Este formato é semelhante a morfologia da mão de *Chelonia mydas* da família Cheloniidae, na qual os ossos das falanges são alongados, mantendo um padrão plesiomórfico (Ludwig et al., 2007) sem a perda de falanges, devido ao formato e a utilidade desses membros adaptados ao meio aquático (Sánchez-Villagra et al., 2007). Em *Chelydra serpentina* e *Macrochelys temmincki* a fórmula falângica para as mãos (2:3:3:3:3) (Rieppel, 1994; Sheil, 2005; Sheil & Greenbaum, 2005), é semelhante do observado neste trabalho (2:3:3:3:3). Já em relação aos ossos carpais, em *C. serpentina* há variação entre quatro a cinco ossos distais carpais (Rieppel, 1994; Sheil & Greenbaum, 2005), porém no *K. scorpioides* foram encontrados cinco distais carpais. Sendo que ao término do desenvolvimento embrionário, na fileira proximal dos carpais, o central III está fundido com o central II, e em animais adultos esses ossos são vistos separados.

Nas famílias citadas acima, juntamente com Kinosternidae, compõem o clado Americhelydia (Joyce et al., 2013a), nelas foram observados no pé dos animais, apenas um elemento tarsal proximal, astrágalo-calcâneo (Rieppel, 1994; Sheil, 2005; Sheil & Greenbaum, 2005). Este também foi observado em outra família deste clado, a Dermatemydidae (Knauss, 2014) e no presente trabalho. Quanto aos tarsais distais, existe uma forte discussão sobre a presença de um osso adunco (Joyce et al., 2013b; Crawford et al., 2015), ao qual alguns autores afirmam ser o tarsal distal V e outros um metatarsal V. Entre os Chelydrideos aqui discutidos, a quantidade de distais tarsais variou entre cinco e quatro. No *K. scorpioides* o osso adunco foi considerado como um metatarsal V, pois em animais adultos o mesmo apresenta formato alongado, semelhante aos demais metatarsais.

As tartarugas marinhas apresentam anatomia similar ao observado neste trabalho, possuem dois elementos centrais, carpo, osso intermédio, ulnar, pisiforme, e falanges (Romer, 1956; Rieppel, 1994; Sánchez-Villagra et al., 2007). O pé também apresenta semelhanças, contendo somente um elemento proximal no tarso, porém *Caretta caretta* apresenta dois, astrágalo e fibular (Romer, 1956), e quatro tarsais distais. A fórmula falângica nas mãos é de 2:3:3:3:2 e pé é 2:3:3:3:3, similar ao identificado no presente trabalho (Figura 1). Todavia, a morfologia externa dos membros desses grupos é diferente de *K. scorpioides*, pois as tartarugas marinhas apresentam os mesmos em formato de nadadeiras, internalizados na placa interdigital, apresentando garras nos três primeiros dígitos (Crastz, 1982; Miller et al., 2017).

A família Emydidae possui a fórmula falângica diferente a *K. scorpioides*, enquanto que os carpais proximais são representados pelo intermédio, ulnar, pisiforme e dois ossos centrais. O pé variou entre um a dois elementos tarsais proximais, principalmente em *Trachemys dorbigni*, e também quanto a quantidade de tarsais distais, quatro (Souza et al., 2000) ou cinco (Sánchez-Villagra et al., 2008; Sheil & Portik, 2008). Sendo a fórmula falângica do pé diferente (2:3:3:3:2).

Geoemydidae possuem estrutura anatômica semelhante ao *K. scorpioides*, na região carpal e tarsal proximal (Fritz et al., 2006). Mas, o número de falanges difere 2:3:3:3:3/2 na mão (Ludwig et al., 2007), com variação intraespecífica no dígito IV (Fritz et al., 2006). No pé pode variar no quarto (Fritz et al., 2006) ou quinto dígito (2:3:3:3:3/2/1/0). Assim, tais estruturas refletem a vida destas espécies (Ludwig et al., 2007), pois os geoemydideos terrestres apresentam tendências a perder falanges e até dígitos inteiros (Fritz et al., 2006). Enquanto que os aquáticos tendem a ter todas as falanges e algumas adicionais no quinto dígito, características estas apontadas como essenciais para uma boa natação. Este autor afirmou que animais que

apresentam formula falângica 2:3:3:3:2, não são estritamente adaptados ao ambiente aquático e são considerados intermediários.

Malacochersus tornieri (Mautner et al., 2017), *Aldabrachelys* e *Dipsochelys* (Gerlach, 2012), pertencentes a família Testudinidae, são espécies extremamente adaptadas ao ambiente terrestre, apresentam a mão contendo úmero, ulna, radio, ulnar, intermédio, pisiforme, dois centrais, cinco distais carpais, cinco metacarpais e duas falanges em cada dígito. Já os pés apresentam duas estruturas proximais, quatro distais carpais, cinco metatarsais e duas falanges por dígito. Diferente ao observado para *K. scorpioides*, que apresentam duas falanges no primeiro dígito e três falanges nos demais dígitos.

Trionychoidea apresentam na mão e no pé, na região carpal e tarsal, anatomia semelhante à espécie aqui estudada, variando na quantidade de falanges, onde a formula é 2:3:3:4:3/4 na mão, e 2:3:3:4:3/4 no pé, variando na última falange e com uma tendência a hiperfalângia (Delfino et al., 2010).

Pleurodiras tem mão com dois elementos centrais, ulna, intermédio, 5 carpais distais, 5 metatarsais, pisiforme, formula falângica 2:3:3:3:3 (Bona & Alcalde, 2009; Vieira et al., 2011; Werneburg et al., 2009). No pé apresentam dois elementos tarsais proximais e 4 distais tarsais, apenas para *Podocnemis expansa* foi assumido a presença de 5 distais tarsais (Vieira et al., 2011). Semelhante aos membros de *K. scorpioides*, com exceção da região tarsal, e a presença de uma região tarsal com maior quantidade de elementos em Pleurodiras, está relacionado a habitat aquático desses animais, que pouco dependem do ambiente terrestre.

Neste trabalho foi observado que os dígitos anteriores crescem mais rápido que os posteriores, como o descrito para *C. mydas* (Sánchez-Villagra et al., 2007) e *Emydura subglobosa* (Werneburg et al., 2009). Porém, para *C. serpentina* (Rieppel, 1994) e *Macrochelys temmincki* (Sheil, 2005) foi encontrado um padrão diferente onde os membros posteriores se desenvolveram mais rápido, quanto ao sistema esquelético.

Em relação a condrificação dos membros de *K. scorpioides* existe um padrão semelhante aos quelônios. Primeiramente, pela presença do estilopódio (no estágio 14), e posteriormente o surgimento do zeugopódio, seguido do ulnar e do carpal/tarsal distal IV (Sheil, 2003; Sheil & Greenbaum, 2005; Sánchez-Villagra et al., 2007; Sheil & Portik, 2008; Vieira et al., 2011; Werneburg et al., 2009; Gerlach, 2012).

Semelhante ao que ocorre em *Macrochelys temmincki* (Sheil, 2005), foi visualizado no final do estágio 15 ranhuras na placa digital, indicando os futuros dígitos. No final do estágio 18 a condrificação de todos os elementos dos membros é notada (Sheil, 2003; Sheil, 2005; Sheil

& Portik, 2008; Sánchez-Villagra et al., 2009). Já há neste estágio, conformação semelhante as estruturas que virão a ossificar, e ocorre a degeneração da matriz cartilaginosa, indicando o começo do processo de ossificação endocondral (Rieppel, 1994). Todavia, alguns autores afirmam que este processo acontece no estágio 20. No presente trabalho foi observada a afinidade com o corante (Alizarina red-S) apenas no estágio 20, semelhante ao descrito em *C. serpentina* e *Macrochelys temmincki* (Rieppel, 1994; Sheil, 2005; Sheil & Greenbaum, 2005). Esse processo se inicia nos ossos longos do estilopódio e zeugopódio. Seguindo aos metacarpais e tarsais, falanges, e região carpal e tarsal, no sentido proximo-distal (Sánchez-Villagra et al., 2007; Sheil, 2003; Sheil, 2005, Bona & Alcalde, 2009; Werneburg et al., 2009). Sendo diferente do observado em *C. serpentina* e *P. expansa* (Sheil & Greenbaum, 2005; Vieira et al., 2011). Porém, existem espécies que não apresentam carpais e tarsais ossificados em filhotes recém-eclodidos (Werneburg et al., 2009), como o que ocorre em *K. scorpioides*.

Rieppel (1994) afirmou que *C. serpentina* apresenta dominância do dígito III durante o desenvolvimento do sistema esquelético. Todavia, neste estudo não foi observada tal dominância, apenas notou-se que os dígitos centrais II, III, e IV sobressaem durante o desenvolvimento embrionário, em relação aos dígitos laterais I e V. Tal fato também foi visto para *Trachemys scripta* (Sheil & Portik, 2008), o que pode estar relacionado a postura das patas dos animais em relação ao solo, pois os dígitos centrais são os primeiros a tocar na superfície. Além disso, foi notado que o desenvolvimento do dígito V é mais lento (Sheil, 2005; Werneburg et al., 2009), sendo o último a se desenvolver, em ambos os processos de desenvolvimento. O que também foi observado em *K. scorpioides*, sendo que os dígitos V dos membros posteriores, permanecem internalizados na membrana interdigital.

Este trabalho é pioneiro em relatar a osteogênese de animais da família Kinosternidae e os resultados obtidos poderão ajudar na compreensão da evolução e taxonomia deste grupo, assim como podem servir de base para comparação de possíveis anomalias do esqueleto, advindas de questões fisiológicas ou patológicas, provocadas por agentes externos, também servindo como base para estudos que visem solucionar questões existentes sobre as relações entre as espécies de quelônios e o seu meio ambiente.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- Berry, J. F., Iverson, J. B. 2011. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1766) – Scorpion Mud Turtle. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises*, 5, 1–15.
- Bona, P., Alcalde, L., 2009. Chondrocranium and skeletal development of *Phrynops hilarii* (Pleurodira: Chelidae). *Acta Zool.* 90, 301–325. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2008.00356.x>
- Bryden, M., Halnan, C.R.E., 2008. Nomina Anatomica Veterinaria. *Aust. Vet. J.* 47, 433–433. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1971.tb02174.x>
- Burke, C., Alberch, P., 1985. The development and homology of the chelonian carpus and tarsus. *J. Morphol.* 186, 119–131. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051860111>
- Chiari, Y., Cahais, V., Galtier, N., Delsuc, F., 2012. Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-65>.
- Crastz, F., 1982. Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Rev. Biol. Trop.* 30, 113–120.
- Crawford, N.G., Parham, J.F., Sellas, A.B., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Papenfuss, T.J., Henderson, J.B., Hansen, M.H., Simison, W.B., 2015. A phylogenomic analysis of turtles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 83, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.10.021>
- Cristo, S.S., Baía Júnior, P.C., Silva, J.S., Marques, J.R.F., Guimarães, D.A. de A., 2017. The trade of *Kinosternon scorpioides* on Marajó island, Brazilian Amazon: From hunting to consumption. *Herpetol. J.* 27.
- Cubas, P. H., Baptistotte, C. Chelonia in: Cubas, Z. S; Silva, J. C. R., Catão- Dias, J. L. *Tratado de Animais Selvagens*. editora Roca. São Paulo. 2007. p 86 – 108.
- Danielson, S.C., Sheil, C.A., 2017. Patterns of chondrification and ossification in the skull of *Graptemys pseudogeographica*, the false map turtle (Emydidae). *J. Morphol.* 278, 1739–1753. <https://doi.org/10.1002/jmor.20747>
- Delfino, M., Fritz, U., Sánchez-Villagra, M.R., 2010. Evolutionary and developmental aspects of phalangeal formula variation in pig-nose and soft-shelled turtles (Carettochelyidae and Trionychidae). *Org. Divers. Evol.* 10, 69–79. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0019-x>
- Fabrezi, M., Manzano, A., Abdala, V., Zaher, H., 2009. Developmental basis of limb homology in Pleurodiran turtles, and the identity of the hooked element in the chelonian tarsus. *Zool. J. Linn. Soc.* 155, 845–866. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00474.x>
- Ferrara, C., Fagundes, C., Morcatty, Thais., Vogt, R. 2017. *Quelônios Amazônicos - Guia de identificação e distribuição*. Wildlife Conservation Society, Manaus, Brasil.
- Fritz, U., Petzold, A., Auer, M., 2006. Osteology in the Cuora galbinifrons complex suggests conspecificity of *C. bourreti* and *C. galbinifrons*, with notes on shell osteology and phalangeal formulae within the Geoemydidae. *Amphibia-Reptilia* 27, 195–205.
- Gerlach, J., 2012. Skeletal ontogeny of Seychelles giant tortoises (*Aldabrachelys/Dipsoschelys*). *Sci. Res. Essays* 7, 1083–1099. <https://doi.org/10.5897/SRE11.2019>
- Gregorovičová, M., Kvasilová, A., Sedmera, D., 2018. Ossification Pattern in Forelimbs of the Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*): Similarity in Ontogeny of Carpus Among Crocodylian Species. *Anat. Rec.* 00. <https://doi.org/10.1002/ar.23792>
- Griffin, C.T., 2018. Developmental patterns and variation among early theropods. *J. Anat.* 232, 604–640. <https://doi.org/10.1111/joa.12775>
- Hildebrand M., Goslow G.E. 2006. *Análise da estrutura dos vertebrados*. Atheneu, São Paulo.
- Iverson, J.B., 2010. Reproduction in the red-cheeked mud turtle (*Kinosternon scorpioides cruentatum*) in southeastern Mexico and Belize, with comparisons across the species range. *Chelonian Conserv. Biol.* 9, 250–261. <https://doi.org/10.2744/CCB-0827.1>
- Joyce, W.G., Parham, J.F., Lyson, T.R., Warnock, R.C.M., Donoghue, P.C.J., 2013a. A
- Artigo editado conforme Instruções para Autores da Revista Zoologischer Anzeiger, acessado pelo seguinte link [https://www.journals.elsevier.com/zoologischer-anzeiger/\(ISSN\)0044-5231](https://www.journals.elsevier.com/zoologischer-anzeiger/(ISSN)0044-5231)

- divergence dating analysis of turtles using fossil calibrations: an example of best practices. *J. Paleontol.* 87, 612–634. <https://doi.org/10.1666/12-149>
- Joyce, W.G., Werneburg, I., Lyson, T.R., 2013b. The hooked element in the pes of turtles (Testudines): a global approach to exploring primary and secondary homology. *J. Anat.* 223, 421–441. <https://doi.org/10.1111/joa.12103>
- Knauss Georgia, E., 2014. A morphological description of *Baptemys wyomingensis* and an analysis of its phylogenetic relationship within Kinosternoidea (Testudines).
- Linnaeus, C., 1766. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* *Stockholm*, L. Salvius 12 ed. 1.
- Ludwig, M., Auer, M., Fritz, U., 2007. Phalangeal formulae of geoemydid terrapins (*Batagut*, *Callagur*, *Hardella*, *Heosemys*, *Kachuga*, *Orlitia*, *Pangshura*, *Rhinoclemmys*) reflect distinct modes of life. *Amp-Rep* 28(4) 28, 574–576.
- Martins, M., Molina, F. de B., 2008. Panorama Geral dos Répteis Ameaçados do Brasil, in: Livro Vermelho Da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. pp. 327–334.
- Mautner, A.K., Latimer, A.E., Fritz, U., Scheyer, T.M., 2017. An updated description of the osteology of the pancake tortoise *Malacochersus tornieri* (Testudines: Testudinidae) with special focus on intraspecific variation. *J. Morphol.* 278, 321–333. <https://doi.org/10.1002/jmor.20640>
- Miller, J.D., Mortimer, J.A., Limpus, C.J., 2017. A Field Key to the Developmental Stages of Marine Turtles (Cheloniidae) with Notes on the Development of *Dermochelys*. *Chelonian Conserv. Biol.* 16, 111–122. <https://doi.org/10.2744/CCB-1261.1>
- Pough, F. H.; Janis, C. M.; Heiser, J.B., 2003. *A Vida dos Vertebrados*, Atheneu. <https://doi.org/10.1109/HAPTIC.2012.6183753>
- Rhodin, A.G.J., 1985. Comparative Chondro-osseous Development and Growth of Marine Turtles. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol.* 1985, 752–771.
- Rieppel, O., 1994. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydva serpentina* (Reptilia, Testudines). *J. Zool. Londres* 231, 487–509.
- Romer, A.; Parsons, T. S. *Anatomia comparada dos vertebrados*. São Paulo: Atheneu, 1985. 481 p.
- Sánchez-Villagra, M.R., Mitgutsch, C., Nagashima, H., Kuratani, S., 2007. Autopodial Development in the Sea Turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *Zoolog. Sci.* 24, 257–263. <https://doi.org/10.2108/zsj.24.257>
- Sánchez-Villagra, M.R., Ziermann, J.M., Olsson, L., 2008. Limb chondrogenesis in *Graptemys nigrinoda* (Emydidae), with comments on the primary axis and the digital arch in turtles. *Amphib. Reptil.* 29, 85–92. <https://doi.org/10.1163/156853808783431505>
- Sánchez-Villagra, M.R., Müller, H., Sheil, C.A., Scheyer, T.M., Nagashima, H., Kuratani, S., 2009. Skeletal development in the chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Testudines: Trionychidae). *J. Morphol.* 270, 1381–1399. <https://doi.org/10.1002/jmor.10766>
- Sheil, C.A., 2003. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). *J. Morphol.* 256, 42–78. <https://doi.org/10.1002/jmor.10074>
- Sheil, C.A., 2005. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). *J. Morphol.* 263, 71–106. <https://doi.org/10.1002/jmor.10290>
- Sheil, C.A., Greenbaum, E., 2005. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): Evidence for intraspecific variation, *Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1017/S0952836904006296>
- Sheil, C.A., Portik, D., 2008. Formation and ossification of limb elements in *Trachemys scripta* and a discussion of autopodial elements in turtles. *Zoolog. Sci.* 25, 622–641. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.622>

- Taylor, W, Van Dyke, G. 1985. Revised procedure for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9:107–119.
- Vieira, L.G., Santos, A.L.Q., Lima, F.C., Moura, L.R., 2011. Chondrogenesis of the limbs and mesopodial ossification of *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines: Podocnemidae). *J. Morphol.* 272, 404–418. <https://doi.org/10.1002/jmor.10917>
- Werneburg, I., 2009. A standard system to study vertebrate embryos. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005887>
- Werneburg, I., Hugi, J., Müller, J., Sánchez-Villagra, M.R., 2009. Embryogenesis and ossification of *Emydura subglobosa* (testudines, pleurodira, chelidae) and patterns of turtle development. *Dev. Dyn.* 238, 2770–2786. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22104>

Quadro 1: Sequência de osteogênese de *K. scorpioides*.

Estágio	Membro anterior	Membro posterior	Figuras
10	Dilatação na lateral do corpo, formado por uma conjunto de células mesenquimais	-	
11	-	Dilatação na lateral do corpo, composto por células mesenquimais	
12	Macroscopicamente, mais curto que largo	Mais curto que largo	
13	Mais longo que largo	Morfologicamente, mais longo que largo	
14	Primeiro centro de condrogênese do úmero, histologicamente, é visto condensamento de células mesenquimais	A primeiro centro de condrogênese do fêmur, localizado na diáfase	Figura 2A e 5A
15	A condrogênese do úmero já está se formando, nas epífises e diáfase; e observa-se de centros de condrogênese do rádio e da ulna, partindo da diáfase desses ossos, e a ligeira demarcação de um elemento do IV dígito	Primeiro centro condrogênico do fêmur, da tíbia e da fíbula	Figura 2B, 5B e 8A
16	Pode ser vista a cartilagem do úmero, da ulna, do rádio, além do primeiro centro de condrogênese do ulnar, central III, intermédio, e também os primeiros centros dos distais carpais I, II, III, IV e V (com o IV carpal de maior tamanho e maior afinidade ao corante) e dos metacarpais (I, II, III, IV e V).	Condrogênese do calcâneo, além do primeiro centro dos tarsais distais II, III e IV, e os metatarsais II, III e IV.	Figura 2C, 6A/B e 8B
17	Pode-se observar a presença das falanges proximais II, III, IV, e ligeiras demarcações das falanges proximais I e V	Foi visto o primeiro centro condrogênico do astrágalo, e são vistos todos os tarsais distais I, II, III e IV, além dos metatarsais I, II, III, IV e V, e dos primeiros centros das falanges proximais centrais II, III, IV	Figura 2D, 7A/B e 9A/B
18	Condrogênese do pisiforme. Já se encontram formadas as	A formação dos moldes de cartilagens que compõem o	Figura 2E

Continuação

	cartilagens dos ossos do úmero, ulna, radio, porém a diáfase destes ossos longos se encontra despigmentada de Alcian, podendo indicar o começo de uma ossificação endocondral. Além da formação do central II, das falanges centrais nos dígitos II, III e IV; e falanges distais I-V.	membro posterior já está presente. Porém, as diáfases dos ossos longos: fêmur, tíbia e fíbula; encontram-se despigmentadas de Alcian ou apresentando uma coloração bem fraca. Além da formação das falanges centrais nos dígitos II-IV; e falanges distais I-V.	
19	A diáfase das cartilagens dos ossos metacarpais e falanges proximais II, III e IV , apresentam-se despigmentadas	O astrágalo é visto fundido com o calcâneo	Figura 3A
20	Pode ser observado o primeiro centro de ossificação do úmero, localizado na diáfase deste osso, esta estrutura foi caracterizada pela presença de pigmento Alizarina Red-S	Primeiro centro de ossificação do fêmur. Os restantes permanecem com a diáfase dos ossos longos sem afinidade pelo Alcian blue, sendo elas a dos ossos tíbia, fíbula, metatarsais I, II, III, IV, V, falanges proximais I, II, III, IV, V e falanges centrais II, III, IV, V	Figura 3B
21	-	-	Figura 3C
22	Os ossos longos apresentaram a diáfase corada com alizarina e as epífises coradas com Alcian, são eles: úmero, ulna, radio, metacarpais, e falanges distais, centrais e proximais	As epífises de ossos longos coradas com Alcian, e as diáfases coradas com alizarina	Figura 3D
23	Os ossos longos já apresentam cartilagem articular	Foi notada o aumento do processo de ossificação que se direcionou para epífises, presença de Alcian blue somente nas cartilagens articulares dos ossos longos e nos ossos tarsais	Figura 3E
24	-	-	Figura 4A
25	-	-	Figura 4B
26	A região carpal não corou com Alcian blue, porém também não coraram com Alizarina Sódica. Em alguns espécimes os carpais distais coraram com Alizarina.	Os tarsais distais apresentaram ossos corados como Alizarina. O restante dos elementos tarsais, não apresentaram afinidade com os corantes.	Figura 4C

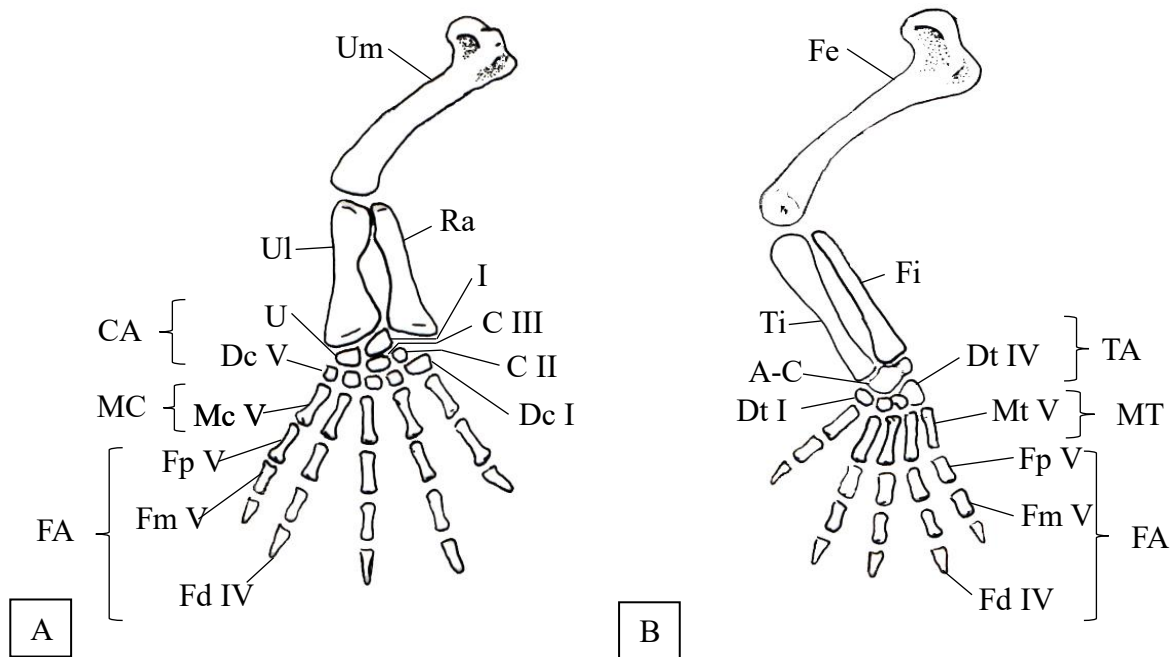


Figura 1: Anatomia dos membros de *K. scorpioides*. A) Visão latero-dorsal do membro anterior direito, demonstrando os ossos úmero (Um), ulna (Ul), rádio (Ra), intermédio (I), ulnar (U); região carpal (CA): central III (C III), central II (C II), carpal distal I (Dc I), carpal distal V (Dc V); Metacarpais (MC): metacarpal V (Mc V); Falanges (FA): falange proximal V (Fp V), falange medial V (Fc V) e falange distal V (Fd IV). B) Visão latero-dorsal do membro posterior esquerdo, nota-se os ossos fêmur (Fe), tíbia (Ti), fíbula (Fi); região tarsal (TA): astrágalo-calcâneo (A-C), tarsal distal I (Dt I), tarsal distal IV (Dt IV); Metatarsais (MT): metatarsal V (Mt V); Falanges (FA): falange proximal V (Fp V), falange medial V (Fc V) e falange distal V (Fd IV).

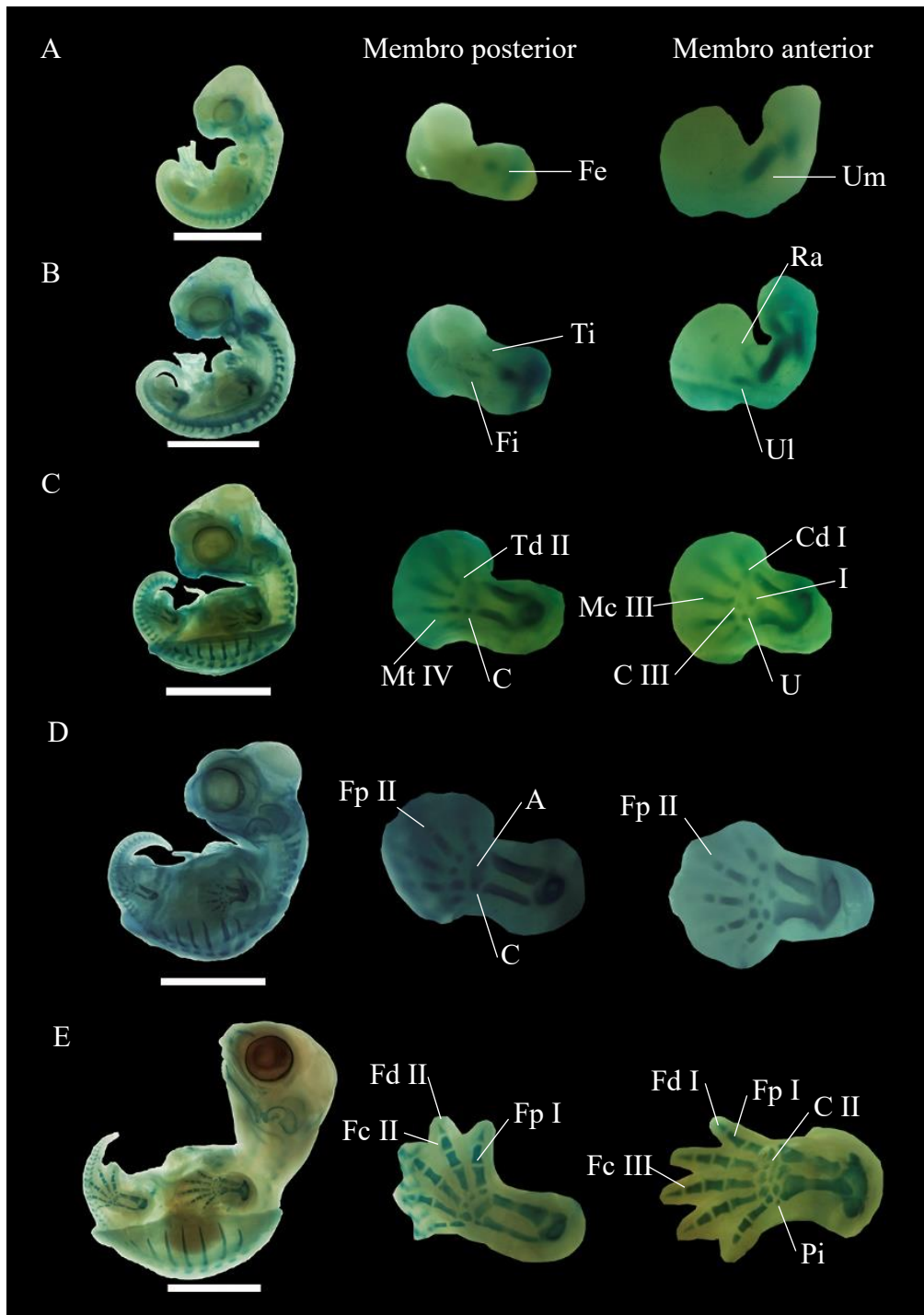


Figura 2: Osteogênese dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpiodes*. A) Estágio 14, aparecimento do úmero (Um) e do fêmur (Fe) (escala 5 mm). B) Estágio 15 centros de condrogênese, no rádio (Ra) e ulna (Ul), na tibia (Ti) e fibula (Fi) (escala 4 mm). C) Estágio 16, surgimento do intermedio (I), ulnar (U) e central III (C III), carpais tarsais (Cd) e metacarpais (Mc), além do astrágalo (A), calcâneo (C), tarsais distais (Td) e metatarsais (Mt) (escala 5 mm). D) Estágio 17, falanges proximais (Fp) e o astrágalo (A) (escala 5 mm). E) Estágio 18, aparecimento dos moldes de cartilagem do central II (C ii), das falanges centrais (Fc) e distais (Fd), e do pisiforme (Pi), (escala 5 mm).

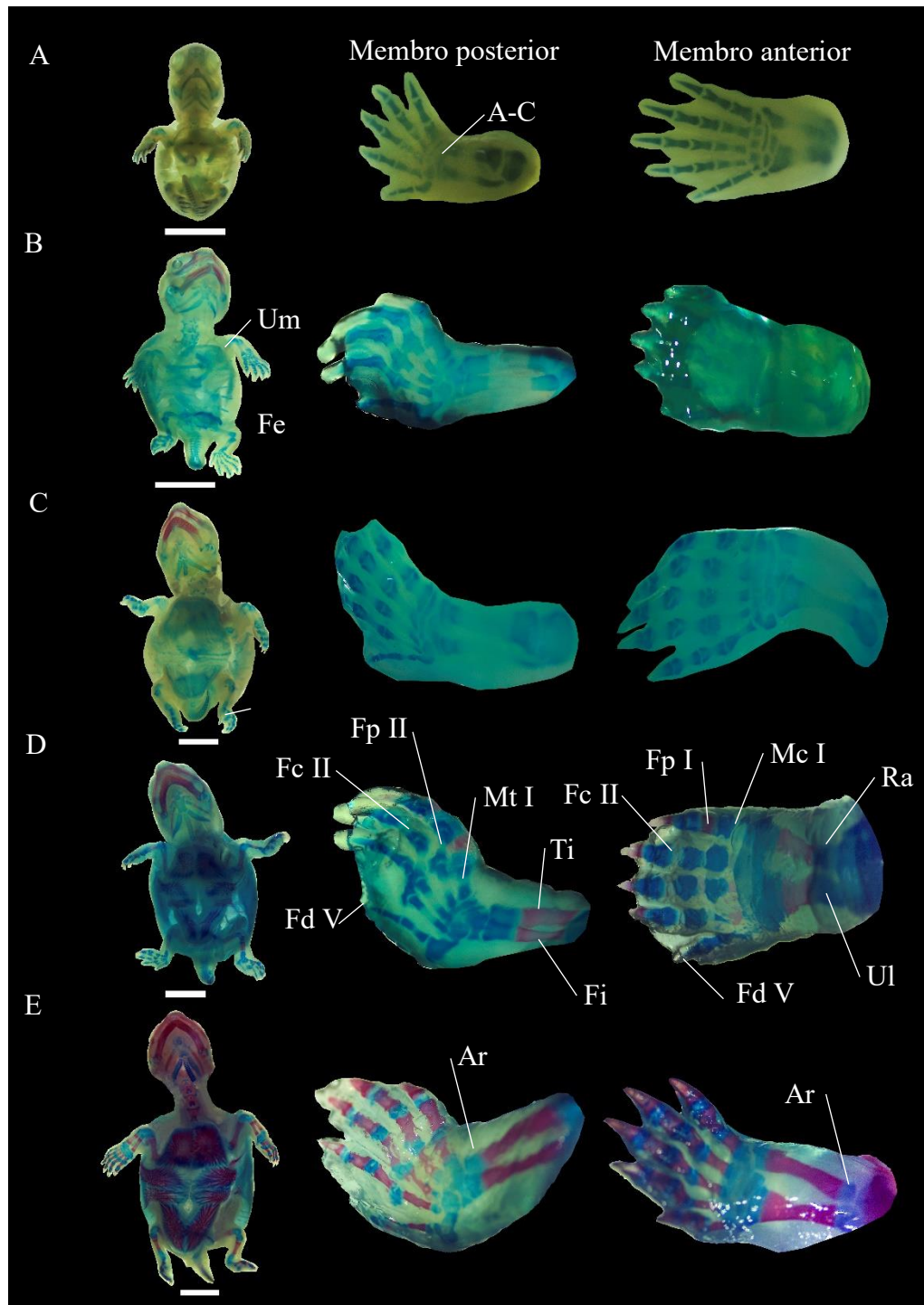


Figura 3: Desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpiodes*, (escala 5 mm). A) Estágio 19, junção do astrágalo-calcâneo (A-C). B) Estágio 20 começo de pigmentação com alizarina no úmero (Um) e fêmur (Fe). C) Estágio 21, semelhante ao estágio anterior. D) Estágio 22. Os ossos longos apresentaram a diáfase corada com Alizarina, são eles: úmero, ulna (Ul), radio (Ra), metacarpais (Mc), falanges distais (Fd), centrais (Fc) e proximais (Fp), tibia (Ti), fibula (Fi), metatarsais (Mt) e falanges distais (Fd), centrais (Fc) e proximais (Fp). E) Estágio 23 membros com cartilagem articulares (Ar).

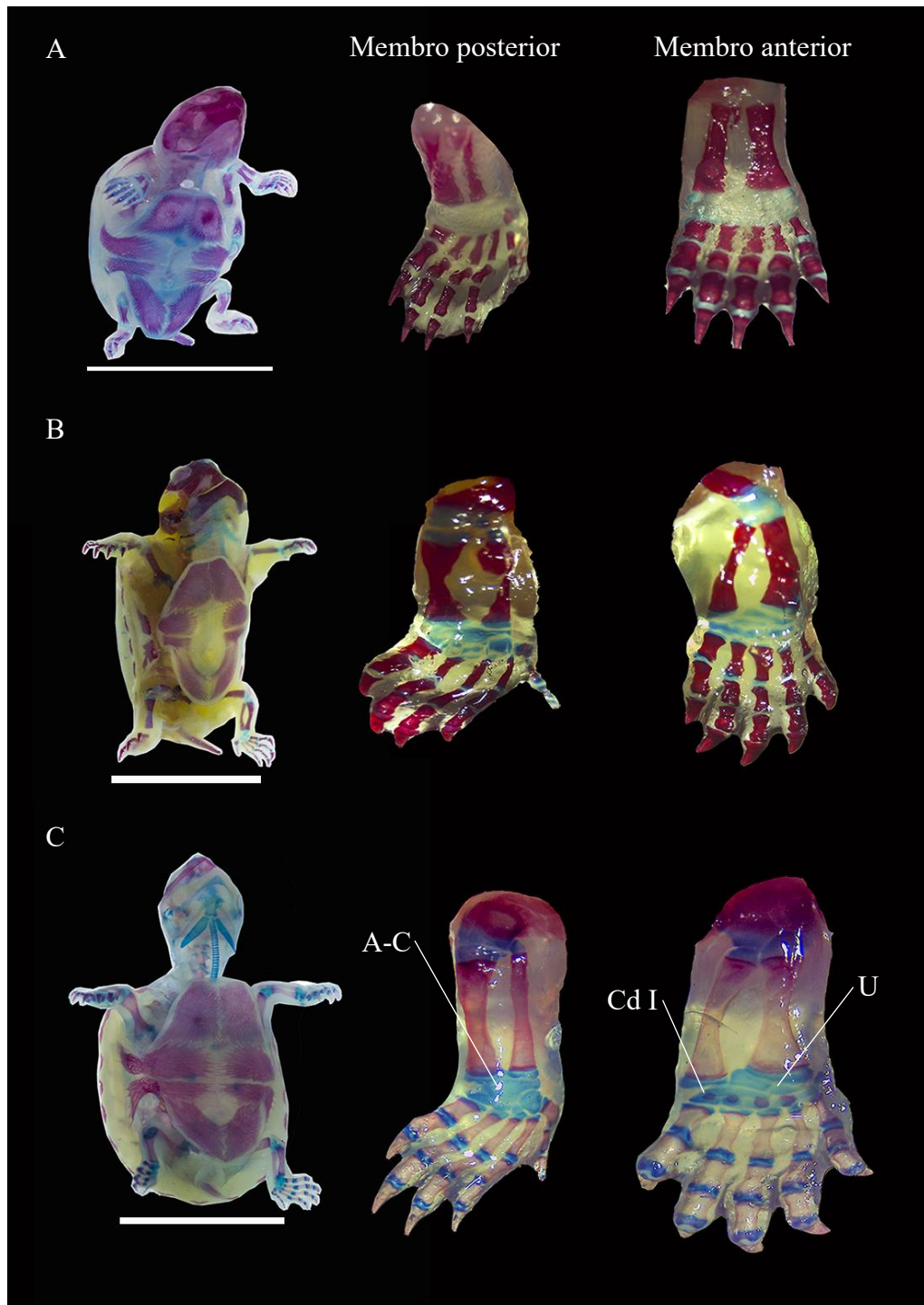


Figura 4: Desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores de *K. scorpiodes*, (escala 2 cm). A/B) Estágio 24 e 25, semelhante ao estágio anterior. C) Estágio 26, embrião em pré-eclosão apresentando cartilagens na região carpal e tarsal (U) (A-C), exceto em carpais/tarsais distais (Mc).

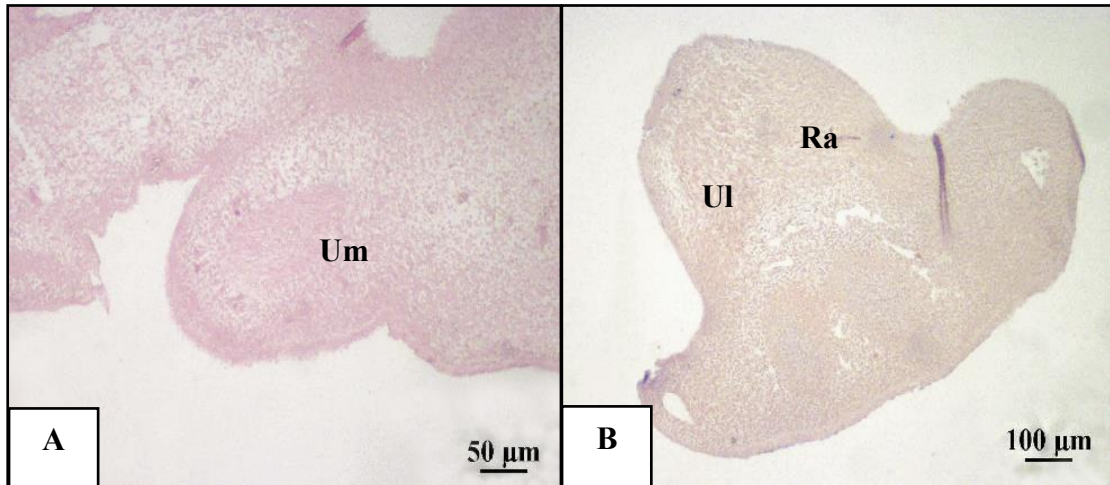


Figura 5: Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido esquelético dos membros anteriores de embriões de *K. scorpioides*. A) estágio 14, células mesenquimais formando o membro, e aglomerado de células onde virá a ser o úmero (Um). B) estágio 15, mostrando o condensamento de células onde vira a ser a ulna (UI) e o rádio (Ra).

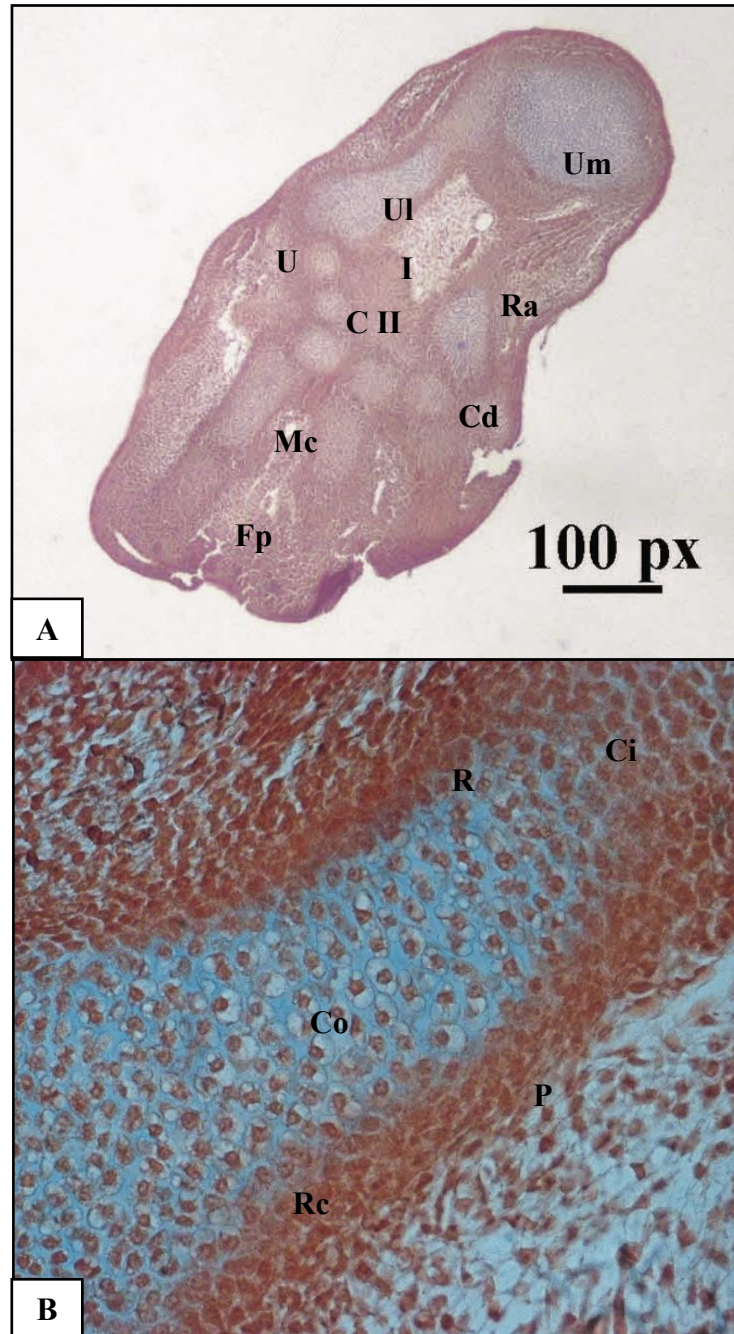


Figura 6: Cortes histológicos dos membros anteriores de *K. scorpioides*. A) estágio 16, condrogênese dos ossos úmero, ulna (Ul), rádio (Ra), ulnar (U), intermédio (I), centrais (Ce), carpais distais (Cd) e metacarpais (Mc). B) estágio 16, condrogênese do rádio, mostrando o pericôndrio (P), a região crescimento (RC), condrócitos (Ci) imaturos, e condrócitos (Co) em desenvolvimento.

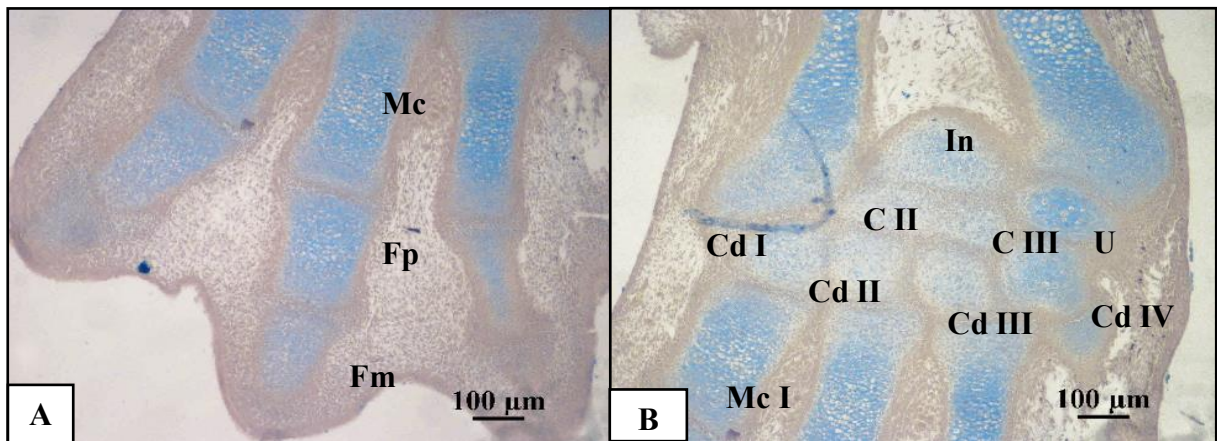


Figura 7: Cortes histológicos dos membros anteriores de *K. scorpioides*. A) Estágio 17, região autopodial da mão, mostrando os metacarpais (Mc), falanges proximais (Fp) e mediais (Fm). B) Estágio 17, região carpal mostrando os carpais distais (Cd), intermédio (I), centrais (C) ulnar (U).

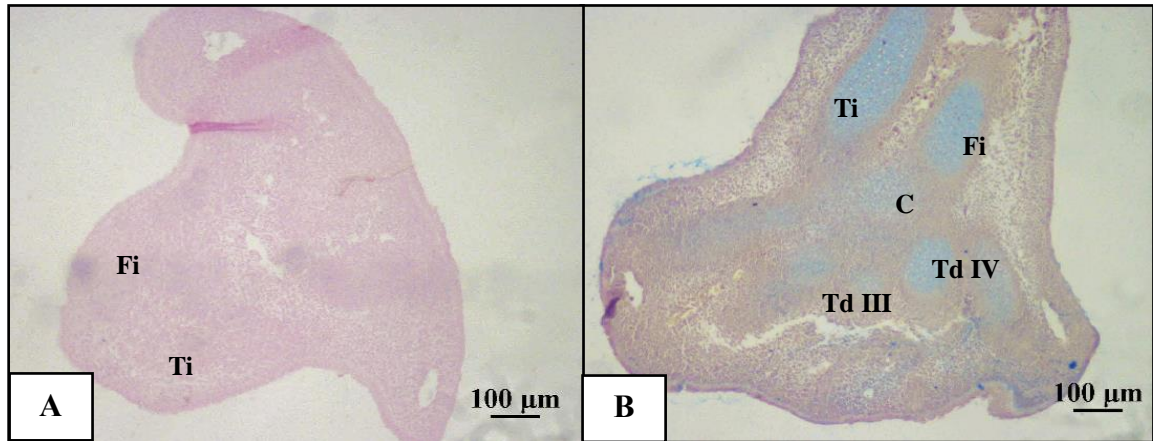


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido esquelético dos membros posteriores embriões de *K. scorpioides*. A) estágio 15, mostrando o condensamento de células onde vira a ser a tíbia (Ti) e a fíbula (Fi). B) estagio 16, condrogênese dos ossos tíbia, fíbula, calcâneo (C), distais tarsais (Td) e metatarsais (Mt).

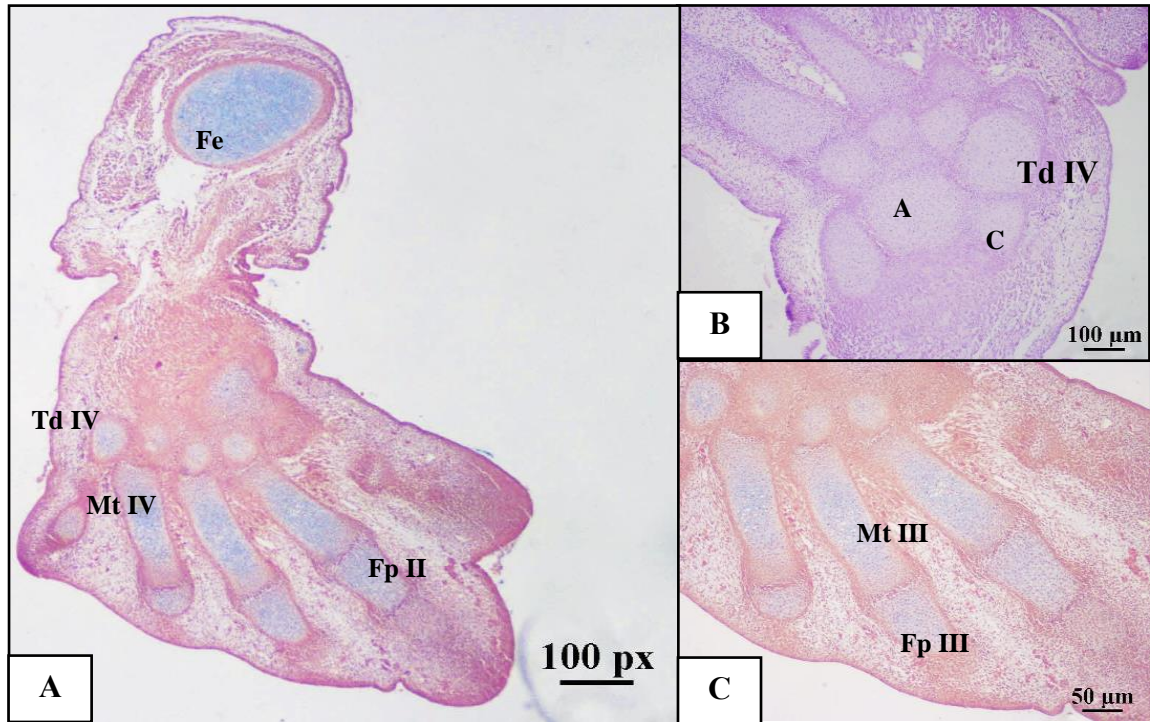


Figura 9: Cortes histológicos dos membros posteriores de *K. scorpioides*. A) Estágio 17, mostrando o fêmur (Fe), tarsais distais, metatarsais e falanges proximais (FP). B) Estágio 17, região tarsal mostrando astrágalo (A) e calcâneo (C) e carpais distais (Cd). C) Estágio 17, região autopodial do pé, mostrando os metatarsais (Mt), falanges proximais (Fp) e centrais (Fc).

6- CONCLUSÃO GERAL

Através deste estudo observou-se o desenvolvimento embrionário de *K. scorpioides*, apresentando-se com características únicas importantes para determinação de estágios de desenvolvimento, este além de somar para o conhecimento desta espécie amazônica importante para populações humanas tradicionais, auxilia as boas práticas de manejo reprodutivo da espécie, como higienização e manipulação adequada de ovos, contribuindo para produtividade de plantéis, também auxiliando na definição do período termossensível, determinação sexual de embriões e razão sexual de filhotes, fundamentais para o manejo *ex situ* e *in situ*.

Ademais, a análise do desenvolvimento dos membros, demonstrou que a osteogênese seguiu o padrão comum em quelônios, porém observou-se que *K. scorpioides* apresenta diferenças relacionadas ao habitat e função, marcada por fusão ou perda de elementos esqueléticos. Ressalta-se a importância desses dados como base comparativa para análises filogenéticas, que visem compreender questões evolutivas deste grupo, além de contribuir para estudos relacionados a interferência de fatores externos causadores de anomalias do esqueleto destes animais.