



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUCAS INÁCIO DOS SANTOS MELO

**MORFOLOGIA DA LÍNGUA DO PEIXE-BOI-MARINHO *Trichechus manatus*
manatus, LINNAEUS, 1758 E SUAS IMPLICAÇÕES ADAPTATIVAS NA DIETA
HERBÍVORA**

MOSSORÓ

2023

LUCAS INÁCIO DOS SANTOS MELO

MORFOLOGIA DA LÍNGUA DO PEIXE-BOI-MARINHO *Trichechus manatus manatus*, LINNAEUS, 1758 E SUAS IMPLICAÇÕES ADAPTATIVAS NA DIETA HERBÍVORA

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira

MOSSORÓ

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M528m Melo, Lucas Inácio dos Santos.
MORFOLOGIA DA LÍNGUA DO PEIXE-BOI-MARINHO
Trichechus manatus manatus, LINNAEUS, 1758 E SUAS
IMPLICAÇÕES ADAPTATIVAS NA DIETA HERBÍVORA / Lucas
Inácio dos Santos Melo. - 2023.
73 f. : il.

Orientadora: Moacir Franco Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2023.

1. Papilas. 2. Sirenia. 3. histologia. 4.
microscopia. I. Oliveira, Moacir Franco , orient.
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LUCAS INÁCIO DOS SANTOS MELO

**MORFOLOGIA DA LÍNGUA DO PEIXE-BOI-MARINHO *Trichechus manatus*
manatus, LINNAEUS, 1758 E SUAS IMPLICAÇÕES ADAPTATIVAS NA DIETA
HERBÍVORA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Defendida em: 28 / 04 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo (UFERSA)
Membro Examinador

Profa. Dra. Marcela dos Santos Magalhães (UFAM)
Membro Examinador

In Memoriam

Maria Docéo dos Santos

*Dedico este trabalho a minha avó Margarida
Maria dos Santos, minha mãe Maria de Lourdes
dos Santos e minha irmã Ana Margarida dos
Santos Melo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha tia Maria Docéo dos Santos, a pessoa que mais me inspirou em buscar todos os meus sonhos. Todos os dias lamento sua perda, mas você ainda vive em minhas lembranças. Espero um dia te encontrar novamente acompanhada por Laika. O abraço de vocês duas é o calor que nunca esqueço.

Agradeço também a minha família por serem a espinha dorsal de minhas conquistas. Ana Margarida, minha irmã, por ser a pessoa em que me espelho e minha mãe, Maria de Lourdes, por ser a pessoa que nunca desistiu e me estimulou por toda vida.

Um agradecimento especial a minha avó, Margarida Maria, por ser a pessoa mais amável e forte que já conheci. Te levo em meu coração para sempre. Minhas tias Maria Odete e Francisca Lúcia, por sempre acreditarem no meu potencial. Minha tia Terezinha e Ana Lúcia por sempre estarem comigo.

Um agradecimento especial para meu tio Gilberto Carlos da Costa, por sempre ser essa figura paternal que eu não tive e a pessoa idônea que admiro. Também a seus filhos, meus primos, Henrique Cesa Santos da Costa e Poliana Santos da Costa, por sempre me ajudarem em tudo que fosse preciso.

Fernanda Löffler Niemeyer Attademo, minha grande amiga e mentora. Não tenho palavras para te agradecer tudo que me ensinou e ainda me ensina. Como sempre te digo, um dia quero suprir todas as expectativas que você deposita em mim.

Flávio José de Lima Silva, jamais esquecerei as oportunidades que você me abriu e o apoio. Te admiro demais por sua perseverança e suas conquistas. Muito obrigado por toda confiança.

Radan Elvis Matias de Oliveira, serei eternamente grato pelo amigo que você é. Muito obrigado por ter sido o primeiro a abrir a porta para realizar todos os meus sonhos. Um amigo muito precioso que tenho muito apreço.

Professor Moacir Franco de Oliveira, o mestre que me ensinou tudo que podia, me arrependo por não ter aproveitado mais o que o senhor poderia me ensinar. Agradeço muito por todos os momentos e peço desculpas pelas dores de cabeça.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Mariana de Almeida Lima, Rysonely Maclay, Caroline Freitas, João Rodrigues, Igor Reno, João Vitor, Eduardo Vale e Ana Indira por todos os momentos de trabalho, ensinamentos, dúvidas sanadas e risadas regadas a bolos e refrigerantes.

Agradeço a todos os meus amigos do Projeto Peixe-Boi, Fábila Luna, Lauro Paiva, Carolina Fritzen, Cássia, Adriano, Paulo (Paulão), Luiz Fernando, Jailton José, Fabrícia, Gabriela, Jailton, Manoel, Ricardo, Bruno, Vicente, Henrique, José Neto, Jesiel, Daniel e Alexandra, que todos os dias compõem uma equipe sem igual. Agradeço também a Helena Gurjão por ser sermos os amigos que se entendem apenas com um olhar.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e a Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), por abrir as portas da instituição para realizar este trabalho

“Nada em biologia faz sentido exceto à luz da evolução”

Theodosius Dobzhansky, 1973

RESUMO

O estudo morfológico da língua é uma ferramenta interessante na compreensão dos processos evolutivos associados aos hábitos alimentares. Há escassez de informações morfológicas sobre a língua do peixe-boi-marinho das Antilhas (*Trichechus manatus manatus*). Assim, o objetivo deste estudo foi descrever a morfologia da língua de *T. m. manatus* para estabelecer um modelo padrão para a espécie, e entender a relação morfológica com a dieta herbívora. Foram realizadas análises de dissecação macroscópica, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura de sete línguas. A língua apresentou-se como um órgão musculoso e robusto, dividido em ápice, corpo e raiz. Firmemente aderida ao assoalho da cavidade oral. As papilas linguais estavam distribuídas sobre toda a superfície do órgão, identificadas como papilas filiformes, concentradas na região do ápice, papilas fungiformes encontradas nas regiões do ápice e lateral da língua, papilas foliáceas localizadas na porção dorsolateral da raiz da língua. A mucosa revestida por epitélio escamoso estratificado queratinizado, presença de glândulas do tipo tubuloacinares compostas, além de botões gustativos nas papilas foliáceas. Esta disposição das papilas gustativas está intimamente relacionada a adaptações para a dieta herbívora, pois irão apresentar as papilas mecânicas no ápice e papilas com percepção química pelos botões gustativos na porção de raiz, com presença de glândulas por toda a língua, possuindo pouca ou quase nenhuma percepção química. Em conclusão, a língua do peixe-boi-marinho das Antilhas foi semelhante às outras espécies da ordem Sirenia, os quais compartilham de uma dieta principalmente herbívora.

Palavras-chave: Papilas, Sirenia, histologia, microscopia.

ABSTRACT

The morphological study of the tongue is an interesting tool for understanding the evolutionary processes associated with eating habits. There is scarcity of morphological information about the tongue of the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*). Thus, the aim of this study was to describe the morphology of the tongue of *T. m. manatus* to establish a standard model for the species and understand the morphological relationship with the herbivore diet. Macroscopic dissection, light microscopy and scanning electron microscopy analyzes of seven languages were performed. The tongue was presented as a muscular and robust organ, divided into apex, body and root. Firmly adhered to the floor of the oral cavity. The lingual papillae were distributed over the entire surface of the organ, identified as filiform papillae, concentrated in the apex region, fungiform papillae found in the apex and lateral regions of the tongue, foliaceous papillae located in the dorsolateral portion of the tongue root. The mucosa is lined by keratinized stratified squamous epithelium, presence of compound tubuloacinar glands, in addition to taste buds in the foliaceous papillae. This disposition of the taste buds is closely related to adaptations for the herbivorous diet, as they will present the mechanical taste buds at the apex and taste buds taste buds in the root portion, with the presence of glands throughout the tongue, having little or no chemical perception. In conclusion, the tongue of the Antillean manatee was similar to other species of the order Sirenia, which share a mainly herbivorous diet.

Keywords: Papillae, Sirenia, histology, microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma exemplificando a ordem sirenia e as duas famílias que a representam. Em destaque as duas espécies de ocorrência em águas brasileiras. Fonte: Fernanda Attademo.20

Figura 2. Exemplos das espécies da Ordem Sirenia. Fonte: Adaptado de Pierter Arend Folkens por Lucas Inácio.....~~21~~²⁰

Figura 3. Desenho esquemático da cavidade oral do peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus manatus*). Fonte: Arquivo pessoal.23

Figura 4. Ilustração anatômica da língua de um peixe-boi-marinho demonstrando as divisões para realização da metodologia. Fonte: Romário adaptado por Lucas Inácio.....~~29~~³⁰

CAPÍTULO 1 – ANTILLEAN MANATEE (*Trichechus manatus manatus* LINNAEUS, 1758) TONGUE MORPHOLOGY AND ADAPTIVE HERBIVOROUS IMPLICATIONS

Figure 1. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) tongue morphology. (A) Lateral tongue view. (B) schematic of Figure A. (C) Dorsal tongue view. (D) schematic of Figure C. Legends: tongue (ton); tongue apex (apex); tongue body (body); language root (root); filiform papillae (fi); fungiform papillae (fu); foliaceous papillae (fo); genioglossus muscle (gen); styloglossus muscle (est); internal/medial pterygoid muscle (pti); external/lateral pterygoid muscle (pte); sublingual fat (fat). Bar: 1.0 cm.....~~49~~⁵⁰

Figure 2. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) lingual papillae light microscopy images. (A) Filiform papilla (arrows). (B) dorsal papilla (arrow). (C) fungal papilla (arrow). (D) foliate papilla (arrows). Caption: epithelium (epi); lamina propria (lap); lingual muscle (mu); compound tubuloacinar glands (gla). Staining: (A,B,C,D) hematoxylin and eosin.....~~50~~⁵¹

Figure 3. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) tongue papillae scanning electron microscopy images. (A) Elongated filiform papillae of the most rostral portion of the tongue apex. (B) Dorsal papillae (arrows) surrounded by short filiform papillae (arrowheads) in the tongue apex region. (C) Fungal papillae (*) surrounded by short filiform papillae (arrows) in the tongue apex region. (D) foliaceous papillae (arrows) in the tongue root.~~51~~⁵²

Figure 4. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) scanning electron tongue microscopy images. (A) Note the dorsal mucosa on the tongue body, presenting lingual salivary gland excretory duct openings (arrows). (B) Enlargement of Figure A, indicating an excretory duct opening. (C) Note the lateral mucosa of the transition region between the tongue apex and

body, with the presence of fungal papillae (*). **(D)** Enlargement of Figure C. Note the lingual salivary gland excretory duct openings (arrows) close to the fungal papillae (*). ~~5253~~

Figure 5. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) tongue foliaceous papilla taste buds light microscopy images. **(A)** Foliaceous papilla. **(B)** Enlargement of Figure A, indicating the basal epithelium of the foliaceous papilla sulcus containing taste buds (arrowheads) and the tubuloacinar lingual salivary gland duct opening (arrow). **(C)** Enlargement of Figure B, detailing the taste bud. Caption: epithelium (epi); lamina propria (lap); serous composite tubuloacinar lingual salivary glands (gla); excretory duct of the lingual salivary glands (duc); taste pore (asterisk); support cells (sup); sensory cells (sen); basal cell (bas). Staining: (A,B,C) Gomori trichrome. ~~5354~~

Figure 6. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) lingual salivary glands light microscopy images. **(A)** Tubuloacinar lingual salivary glands composed of veneered papilla. **(B and C)** enlargement of figure A, showing the mucous (mu) and serous (se) tubuloacinar lingual salivary glands. **(D)** shows the arrangement of connective tissue rich in collagen fibers between the compound tubuloacinar lingual salivary glands in the veneered papilla. (E and F) enlargement of figure D, showing the connective tissue fibers (arrows) entering the lingual salivary glands. Staining: (A,B,C) hematoxylin and eosin. (D,E,F) Gomori trichrome. ~~5455~~

Figure 7. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) lingual gland histochemistry. **(A)** Positive PAS staining for mucous (mu) and serous (se) foliaceous papilla tubuloacinar salivary glands. **(B)** Positive PAS staining for mucous tubuloacinar salivary glands present in the lateral tongue region. **(C)** Positive staining of the AB for mucous tubuloacinar salivary glands. **(D)** Positive AB staining for serous tubuloacinar salivary glands. Staining: (A,B) Periodic Acid Schiff. (C,D) Alcian blue (pH 2.5). ~~5556~~

ANEXO A – DIETA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS PARA ALIMENTAÇÃO DO PEIXE-BOI-MARINHO (*Trichechus manatus manatus*)

Figura 1. Grupos ecológicos de macrófitas aquáticas nos diferentes substratos em que o peixe-boi pode se alimentar. Adaptado de Esteves 2011. 59

Figura 2. Aspecto das vibrissas espessas, dispostas lateralmente aos lábios, a fim de permitir a apreensão de alimentos (em destaque). Foto: Fábiana Luna 60

Figura 3. Detalhe dos proeminentes lábios superiores de peixe-boi, que possibilitam a apreensão de alimentos. Foto: Fábiana Luna 61

Figura 4. Fileiras de dentes molares superiores e inferiores em peixe-boi-marinho contendo, em geral, 5 a 7 pares. Foto: Fernanda Attademo 62

Figura 5. Dentes molares de peixe-boi-marinho. A: Esquema de troca dos dentes (Ilustração: Lucas Inácio); B: Detalhe dos dentes molares (Foto: Fernanda Attademo). ~~6362~~

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Animais utilizados no estudo.....	28 ²⁹
--	-----------------------------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMA	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos
CEMAM	Centro de Estudos e Monitoramento Ambiental
UERN	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	International Union for Conservation of Nature
PCCB	Projeto Cetáceos da Costa Branca
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
LABMORFA	Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada
HE	Hematoxylin and Eosin
GT	Gomori's trichrome
PAS	Periodic Acid Schiff
AB	Alcian blue
SEM	Scanning Electron Microscopy
HCl	Ácido Clorídrico

LISTA DE SIMBOLOS

@	Arroba
®	Marca registrada
%	Porcentagem
+	Soma
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
μ	Micrômetro
°C	Graus Centígrados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Sirênios	19
2.2 Peixe-boi-marinho (<i>Trichechus manatus manatus</i>, Linneus 1758)	21
2.2.1 Características gerais	21
2.2.2 Dieta	22
2.3 Cavidade oral	23
2.4 Língua	24
3 JUSTIFICATIVA	25
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	26
5 OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo Geral	27
5.2 Objetivos Específicos	27
6 METODOLOGIA	28
6.1 Animais	28
6.2 Análise Macroscópica	29
6.3 Análise Macroscópica	30 Erro! Indicador não definido.
6.4 Microscopia de Luz	29 30
6.5 Histoquímicas	30
6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
REFERÊNCIAS	31 32
CAPÍTULO 1 – ANTILLEAN MANATEE (<i>Trichechus manatus manatus</i> LINNAEUS, 1758)	
TONGUE MORPHOLOGY AND ADAPTIVE HERBIVOROUS IMPLICATIONS	35 36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	56 57
APÊNDICE	57 58
APÊNDICE A – DIETA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS PARA ALIMENTAÇÃO DO PEIXE-BOI-MARINHO (<i>Trichechus manatus manatus</i>)	57 58
ANEXOS	67 68
ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA	68
ANEXO B – PRIMEIRA PÁGINA DO CAPÍTULO DE LIVRO	69
ANEXO C – COMPROVANTE DO SISBIO	70

1 INTRODUÇÃO

O peixe-boi-marinho *Trichechus manatus manatus* (Linneus, 1758), é um mamífero marinho, eurialino, de ocorrência na costa do nordeste e norte brasileiro, ou seja, habitando áreas da costa marinha tropicais e subtropicais. Possui hábitos alimentares herbívoros não ruminantes (HARTMAN, 1979; LUNA, 2011).

A distribuição do peixe-boi-marinho é limitada a uma porção da costa oeste do Oceano Atlântico, com registros de duas subespécies, o peixe-boi-marinho da Flórida (*Trichechus manatus latirostris*) na América do Norte e o peixe-boi-marinho das Antilhas (*Trichechus manatus manatus*) existente em todo o Centro e Sul América (DOMNING; HAYEK, 1986). O cenário atual de conservação, aliado às suas características biológicas, desperta preocupação com o futuro da subespécie *T. m. manatus* no Brasil (BALENSIEFER et al., 2017). Atualmente o *T. m. manatus* está classificado com “Em perigo” de extinção pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (LUNA et al., 2022) e “vulnerável” pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2018).

Nos vertebrados, a cavidade orofaríngea desempenha papel importante em uma variedade de funções, incluindo a alimentação (DRUZISKY; BRAINERD, 2001). A detecção de textura e sabor dos alimentos também são funções de elevada relevância na definição dos hábitos alimentares dos animais de diferentes grupos taxonômicos (SHARABY et al., 2014). Neste contexto, estudos sobre a morfofisiologia da língua tem se tornado uma ferramenta interessante para o entendimento da evolução dos hábitos alimentares (OLIVEIRA et al., 2022).

Os órgãos dos sentidos dos peixes-boi-marinho possuem adaptações para o ambiente aquático, proporcionando a sobrevivência da espécie (THEWISSEN, 2011). Estudos apontam o olfato não está intimamente relacionada com o paladar, mas está relacionada com a reprodução desses animais. Onde por meio do olfato, os machos conseguem detectar fêmeas em período fértil. O sentido do tato está intimamente relacionado com a alimentação e gustação, onde ajuda na identificação e apreensão de itens alimentares (BARBOZA; LARKIN; 2020a).

Se alimentam de uma ampla variedade de plantas aquáticas e semiaquáticas, sendo o de maior predileção o capim marinho (*Halodule wrightii*). Também foi constatado a ingestão de invertebrados associados a vegetação, e consumo eventual de peixes (POWELL, 1978; HARTMAN, 1979). Por ser um animal de hábitos alimentares herbívoros, peixe-boi-marinho contribui para a manutenção do ambiente costeiro, já que com as fezes ricas em nutrientes que

fertilizam e favorecem o crescimento da vegetação, deixando o ecossistema mais estável e produtivos (RODRIGES, 2018).

Assim, considerando a importância que a língua representa para a adaptação a dieta, além da escassez de dados sobre a morfologia da língua do *T. m. manatus*, e sabendo que esta espécie é um dos mamíferos marinhos mais ameaçados em termos de extinção no Brasil, objetivou-se descrever a morfologia da língua do *T. m. manatus* e definir o modelo padrão para a espécie.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Sirênios

Os mamíferos aquáticos são animais que vivem toda ou grande parte da vida dentro da água, porém por possuírem respiração pulmonar necessitam ir a superfície para respirar (MOORE, 2008). Além disso, por serem mamíferos, as mães têm um período de gestação que varia conforme a espécie e posteriormente apresentam cuidados parentais para a amamentação de seus filhotes (WERTH, 2000). Dentre os mamíferos aquáticos tem os que podem passar parte do tempo de vida fora da água, como os pinípedes e os mustelídeos e outros que dependem exclusivamente do ambiente aquático como os cetáceos e sirenios.

Por evoluírem de mamíferos terrestres há mais de 60 milhões de anos, os peixes-bois, pertencem a ordem sirenia e têm como espécies mais próximas a família Proboscidea, os elefantes, e Hyracoidea, os hyraxes (BOSSART, 2001). A ordem Sirenia é um grupo monofilético que taxonomicamente apresenta duas famílias, a Trichechidae representada pelos peixes-boi, e a Dugongidae, representada por uma única espécie, o dugongo. Anatomicamente semelhantes, as famílias se diferem pela nadadeira caudal bifurcada (HARTMAN, 1979, ROSAS; PIMENTEL, 2001) (Figura 1).

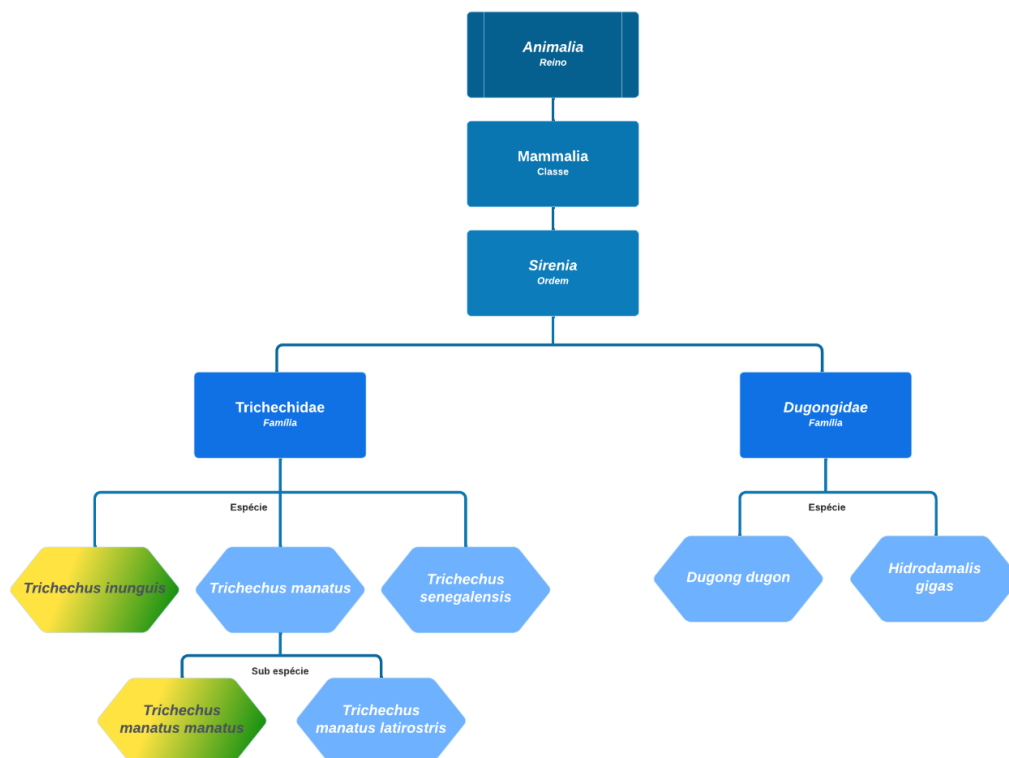


Figura 1. Fluxograma exemplificando a ordem sireníia e as duas famílias que a representam. Em destaque as duas espécies de ocorrência em águas brasileiras. Fonte: Fernanda Attademo (2022).

Os sireníios possuem duas famílias representadas por quatro espécies viventes e uma extinta (HARTAMAN, 1979). A família Dugongidae, possui duas espécies, o dugongo, *Dugongdugon* Muller, 1776, e a espécie já extinta *Hydrodamalis gigas* Zimmerman, 1780, conhecida como Vaca Marinha de Steller, está mais conhecida por viver em mares do círculo ártico. A família Trichechidae é representada por três espécies. O *Trichechussenegalensis*, também conhecido como peixe-boi africano, que dentre os demais representantes da família é a aquela com menor grau de informações. Já o *Trichechus inunguis*, conhecido como peixe-boi da Amazônia, ocorre na bacia amazônica, e se caracteriza por apresentar a pele escura com uma mancha branca no ventre, sem presença de unhas nas nadadeiras peitorais (MARSH et al., 1986, ROSAS, 1994). O *Trichechus manatus*, por sua vez, distribui-se da América do Sul a América do Norte. Ao longo da costa do nordeste e norte do Brasil, Guianas, América Central, Caribe e Cuba pode ser considerada a área de ocorrência da espécie *Trichechus manatus manatus*. Já a costa do estado da Florida, nos Estados Unidos, corresponde a área de ocorrência da espécie *Trichechus manatus latirostris* (COSTA, 2006) (Figura 2).

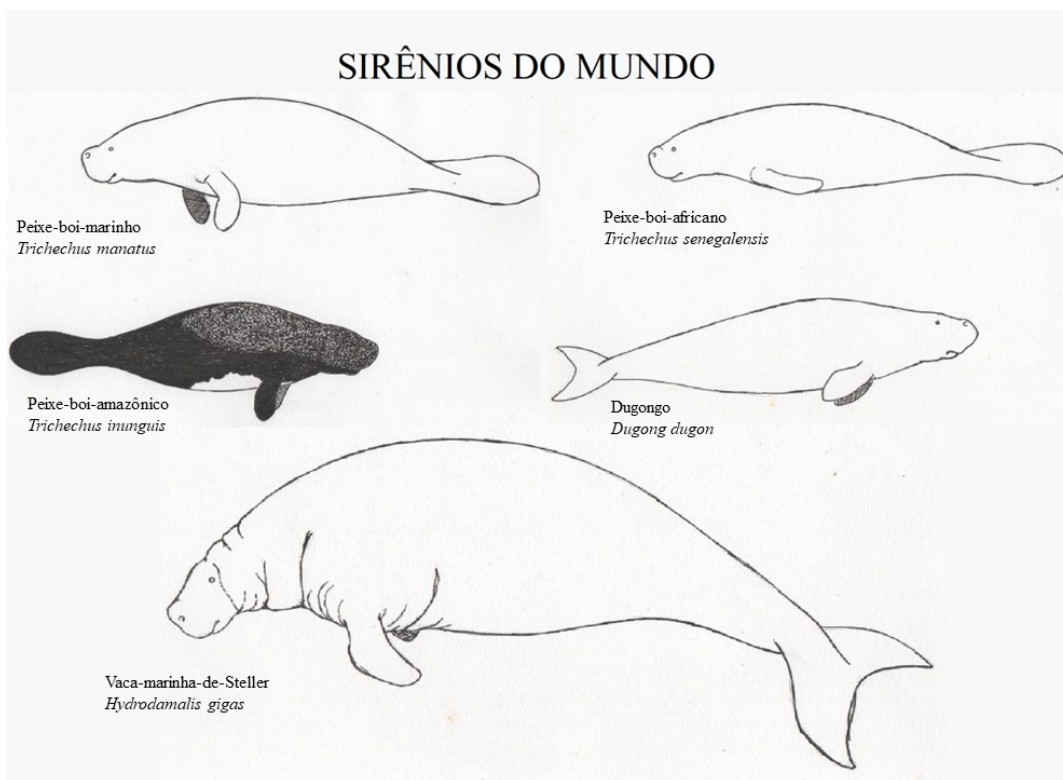


Figura 2. Exemplos das espécies da Ordem Sirenia. Fonte: Adaptado de Pierter Arend Folkens por Lucas Inácio (2022).

Por base de registro fósseis, sabe-se que as duas famílias da Ordem Sirenia têm suas origens no Atlântico, no qual seus espécimes mais antigos foram identificados no Caribe (VAN METER; WEIGERT, 1989). O primeiro exemplar da ordem Sirenia com morfologia capaz de suportar o peso de sua caixa torácica foi a espécie *Pezosirenportelli*, onde já apresentava paquiostose e osteosclerose, como também a pélvis estreita e alongada como a de mamíferos terrestres primitivos, mas já apresentava adaptações para vida aquática como aberturas nasais retráteis, tórax com costelas numerosas e pesadas (DOMNING, 2001).

Os sirênios são mamíferos aquáticos de hábitos alimentares preferencialmente herbívoros, habitam ambientes tanto oceânicos costeiros rasos, quanto rios e estuários, os que os tornam animais eurialinos. (HARMAN, 1979). A ordem ainda possui diversas adaptações que a distingue dos demais mamíferos marinhos, como a pouca pelagem, necessidade de consumir água doce, nadadeira caudal de formato arredondado, além disso, não compartilham da mesma origem filogenética das ordens cetácea, pinípede, mustelidae e ursidae (REYNOLDS; ODELL, 1991).

2.2 Peixe-boi-marinho *Trichechus manatus manatus*

2.2.1 Características gerais

Os peixes-bois-marinho são animais geralmente solitários, mas que no período reprodutivo podem estar em grupos de dois OU mais animais, além do que, durante o período de cuidados parentais, mãe e filhote permanecem juntos por cerca de dois anos e algumas ainda podem estar acompanhadas com filhotes de uma gestação anterior (HARTMAN, 1979; REYNOLDS; POWELL, 2002;).

Os indivíduos possuem um corpo de formato fusiforme, quase desprovido de pelos, com duas nadadeiras peitorais, com presença de unhas em suas extremidades, a nadadeira caudal apresenta o formato oval ou de remo, quando adulto pode chegar a medir 4,5m e pesar 500kg, tendo filhotes com média de 32kg e 124cm de comprimento (HARTMAN, 1979; REYNOLDS; ODELL, 1991). Esses animais possuem uma pele da coloração que varia do cinza escuro ao marrom, com a textura áspera, espessa e com presença de pelos esparsamente

distribuídos, esses possuem a função sensorial, sendo sensíveis a mudanças de correntes e vibrações e pressão da água (HARTMAN, 1979)

As nadadeiras dos peixes-bois-marinhos possuem o formato de remo, possuem unhas nas extremidades, assim como também permaneceram com as articulações falangianas, carpianas, radioulnares e umerais moveis, o que possibilita uma maior mobilidade dos membros, o que facilita a locomoção, apreensão e direcionamento do alimento para a boca (HARTMAN, 1979).

O peixe-boi-marinho possui uma cabeça pequena, sem o pescoço com delimitações, que possui seis vertebra, o que difere de outros mamíferos, que possuem sete vertebra nessa região. Os olhos são pequenos, profundos, ausentes de pálpebras e localizados lateralmente, possuindo uma membrana nictetante, que recobre o globo ocular da região anterior para posterior (HARTMAN, 1979). O ouvido externo é ausente, observando-se apenas um pequeno orifício de forma circular, adaptado para detectar infrassom. O rosto dos *T. m. manatus* se projeta anteriormente e possui uma dobra para baixo, onde forma lábios carnudos, no ápice dessa região encontram-se as narinas com forma de meia lua, encontram-se na região superior do focinho, que tem a capacidade de projetar-se anteriormente e são providas de válvulas musculares, que permitem que se abram e se fechem (MARSHALL et al., 2003).

O rosto dos peixes-boi foi descrito por Marshall et al. (2003), onde podemos dividi-lo em cinco regiões faciais, sendo elas denominadas a disco oral, supradisco, queixo, áreas de cerda periorais superior e inferior. O lábio superior dos *T. m. manatus* tem função preênsil, podem ser divididos em dois lobos, onde podem movimentar-se de maneira independente, atuando na apreensão de alimento (MARSHALL et al., 2003).

2.2.2 Dieta

O aparelho digestório dos peixes-boi é comprido e especializado para a dieta herbívora, tendo a maior parte da digestão dos alimentos na porção final do seu trato gastrointestinal, onde ocorre a quebra de celulose por partes de microrganismos concentrados em sua maior parte na região de ceco. Sabe-se que esses animais conseguem assimilar de 45 a 80% da sua digesta, devido a seu trânsito intestinal ser lento, e consomem cerca de 8 a 13% do seu peso vivo diariamente (BEST, 1981; BURN, 1986; REYNOLDS; ODELL, 1991).

Alimentação desses animais varia e acordo com a disponibilidade dos itens no ambiente, sendo o de predileção as angiospermas marinhas, como o capim agulha (*Halodule Wright*, Ascherson, 1868) (LIMA, 1997), sabendo que essas plantas possuem taxas elevadas

de proteínas e níveis médios de nitrogênio maiores que plantas terrestres (THAYER et al., 1984). Também foi observado o consumo incidental de invertebrados associados a vegetação e sedimento, assim como também por apetite depravado de itens como peixes (POWELL, 1978; HARTMAN, 1979).

2.3 Cavidade oral

A cavidade oral dos peixes-boi-marinho possui duas estruturas ovaladas, semelhante ao pulvino dentário dos mamíferos terrestres, sem a presença de dentes incisivos, apenas pré-molares e molares localizados na porção posterior da boca, e são continuamente repostos por novos da porção posterior para anterior à medida que são desgastados (Figura 3) (ROSAS; PIMENTEL, 2001; MARSHALL, 2003).

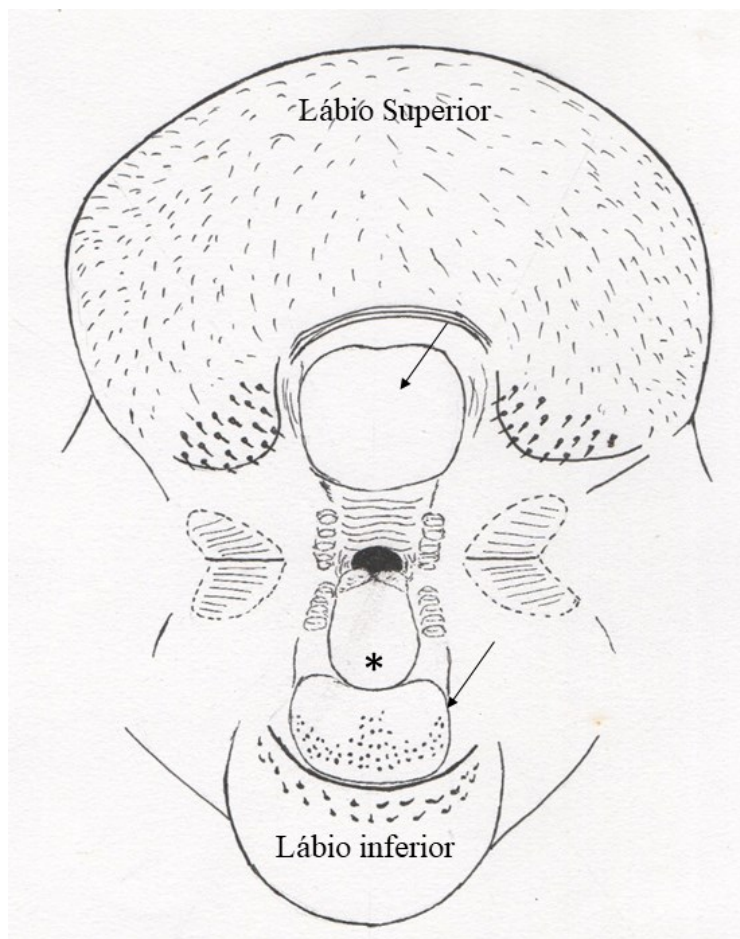


Figura 3. Desenho esquemático da cavidade oral do peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus manatus*) as setas indicam estruturas semelhantes ao pulvino dentário e (*) indica a língua no fundo da cavidade oral. Fonte: Lucas Inácio (2022).

2.4 Língua

A língua é uma estrutura muscular e móvel, que evolutivamente teve sua origem em algumas espécies de peixes mandibulados e anfíbios. Já é presente em todos os tetrápodes, se adaptando para diversos ambientes e dietas (IWASAKI, 2002). Mamíferos em geral possuem a língua retangular, fixa no osso hioide, sendo uma estrutura que para diversas ordens, exceto os odontocetos, a capacidade de percepção química dos sabores. Se desenvolvendo como uma estrutura de epitélio queratinizado com a presença de um ou mais tipos de papilas, sendo divididas em mecânicas e gustativas (DORAN, 1975)

A língua dos peixes-bois da Florida (*Trichechus manatus latirostris*) localiza-se no assoalho da boca, na região caudal da cabeça, e apresenta apenas o ápice livre e móvel, o que impossibilita o animal a realizar protusão da mesma. Nela podem ser observadas papilas gustativas distribuídas sobre a sua superfície dorsal, classificadas como papilas filiformes, fungiformes e foliáceas (YAMASAKI, 1981; LEVIN, 2002).

A superfície dorsal da língua dos peixes-boi da Florida é composta por tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado. As papilas fungiformes concentram-se principalmente na superfície dorsal do corpo da língua. Já as filiformes são espaçadas e dispõem-se em direção a ponta da língua. As papilas foliares por sua vez, concentram-se lateral e dorsalmente à raiz do órgão (BARBOZA; LARKIN, 2020b; LEVIN; PFEIFFER, 2002).

As papilas gustativas mais abundantes são as papilas foliares, localizada na região lateral e posterior da língua, assim como também pode-se encontrar na região do palato mole e na região da epiglote, na junção da nasofaringe e orofaringe, acima da língua, embora seja mais raro de acontecer (LEVIN; PFEIFFER, 2002; BARBOZA; LARKIN, 2020). O que difere das outras espécies de mamíferos aquáticos, que são em sua maioria carnívoros, e tem as papilas filiformes e foliares mais, algumas espécies ainda podem apresentar a língua com ausência de papilas (PFEIFFER, 2001; KOWALEWSKY et al., 2005)

Estudos apontam que as amígdalas são ausentes nesses animais e as glândulas salivares presentes são: parótida, submandibular e sublingual. Esses animais ainda possuem glândulas serosas associadas a poços laterais, que funcionam como depósito de enzimas capazes de converter os polissacarídeos dos alimentos em moléculas menores. Essas glândulas salivares auxiliam a mastigação (LEVIN, 2002; RODRIGUES, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

Estudos morfológicos da língua dos mamíferos marinhos fornecem informações básicas e muito importantes para a biologia das espécies, principalmente àquelas ameaçadas de extinção, tais estudos podem elucidar os mecanismos de digestão iniciais ainda na cavidade oral e entender o comportamento alimentar desses animais em vida livre. Nesse sentido, existe uma grande lacuna sobre a morfologia da língua do peixe-boi-marinho das Antilhas, pois os estudos realizados nos sirênios são voltados principalmente a subespécie *Trichechus manatus latirostris*. No entanto, ainda faltam informações sobre a morfologia da língua da subespécie *Trichechus manatus manatus*, o que é importante do ponto de vista da conservação, podendo esclarecer características morfofuncionais desse órgão que estejam diretamente relacionadas à sua dieta.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

As características morfológicas macro e microscópica da língua do peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus manatus*) está diretamente relacionado ao hábito alimentar;

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Descrever a morfologia da língua do peixe-boi-marinho *Trichechus manatus manatus* como órgão sensitivo relacionado a dieta herbívora.

5.2 Objetivos Específicos

- a) Descrever macroscopicamente as estruturas da língua do peixe-boi marinho;
- b) Caracterizar com base na microscopia eletrônica de varredura as estruturas da língua do peixe-boi-marinho; e
- c) Caracterizar com base na microscopia de luz as estruturas da língua do peixe-boi-marinho para a compreensão da fisiologia da gustação desta espécie.

6 METODOLOGIA

6.1 Animais

Foram analisadas sete línguas de peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus manatus*) diferentes faixas etárias, obtidas pelo Projeto Cetáceos da Costa Branca (Autorização IBAMA nº 02022.000050/2013 e SISBIO nº 13694-8) vinculado a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – PCCB/UERN e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos – ICMBio/CMA em Pernambuco, tanto de animais que vieram à óbito durante o período de estudo quanto do acervo de amostra das referidas instituições. Foram utilizadas apenas as amostras de animais com código de decomposição até 3. Foram realizadas análises morfológicas da língua dos animais e iniciadas as análises macroscópicas.

Tabela 1. Animais utilizados no estudo.

Animais	Registro	Sexo	Faixa etária	Local de Origem	Local de óbito	Instituição
Aratí	01S0111/299	Macho	Adulto	Ceará	Cativeiro	CMA
Guará	01S0111/328	Macho	Filhote	Maranhão	Cativeiro	CMA
Natal*	01S0111/327	Macho	Adulto	Rio Grande do Norte	Ambient e natural	CMA
Assis	01-OUT 2019 – ABPM	Macho	Filhote	Rio Grande do Norte	Cativeiro	PCCB/UERN
Tabatinga	01-FEV2019 – PCCB	Macho	Filhote	Rio Grande do Norte	Cativeiro	PCCB/UERN
Maya	01S0111/200	Fêmea	Adulto	Rio Grande do Norte	Cativeiro	CMA
Flori	01S112/352	Fêmea	Neonato	Alagoas	Ambient e natural	CMA

*O peixe-boi Natal, apesar de ter ido à óbito durante o período que estava na instituição, foi considerado como de vida livre, pois o animal encalhou já adulto e debilitado, vindo à óbito logo após o **resgate**, sem ter recebido alimentos fornecidos aos animais que ficam em cativeiro.

6.2 Análise Macroscópica

A descrição macroscópica das estruturas da língua do peixe-boi-marinho foi realizada no Laboratório de Monitoramento de Biota Marinha da UERN durante exames necroscópicos de rotina em animais que vieram a óbito como consequência de encalhes, entre outros, durante o período de estudo.

Na análise das peças macroscópicas a língua foi dividida em porções para serem analisadas, foram essas: ápice, corpo e raiz da língua (Figura 4). Dentro dessa divisão foram fotografadas e estudadas quais estruturas apareciam em cada porção delimitada.

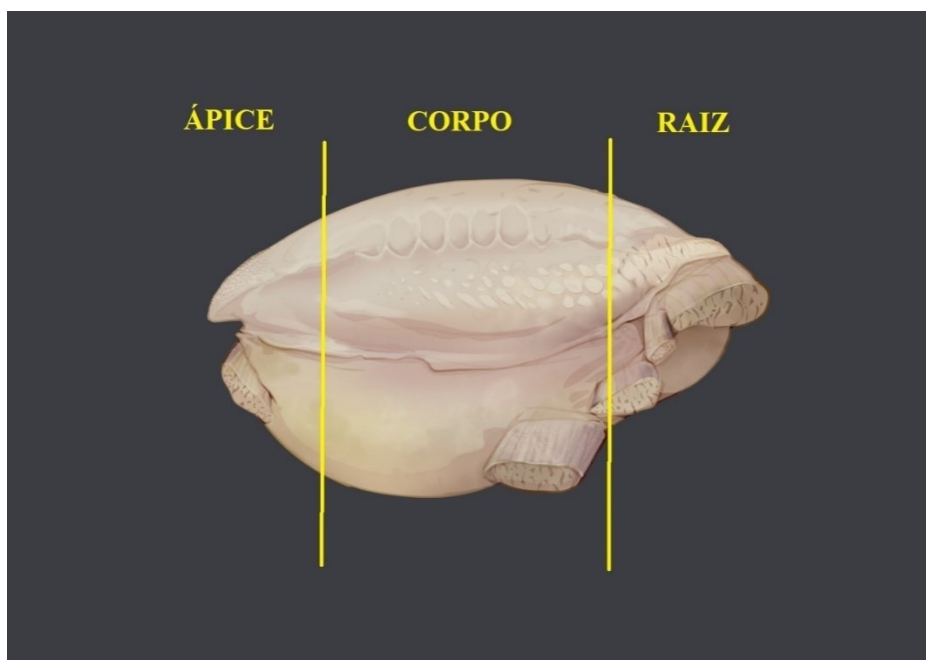


Figura 4. Ilustração anatômica da língua de um peixe-boi-marinho demonstrando as divisões para realização da metodologia. Fonte: Lucas Inácio (2022).

As estruturas foram analisadas e descritas “in situ” e “ex situ” obtendo dados biométricos, forma anatômica e coloração dos órgãos. A documentação fotográfica foi realizada por meio de câmera digital Nikon modelo DSLR D3200 24,2 Megapixels e os resultados serão descritos com base na nomenclatura preconizada pelo Internacional CommiteeonVeterinary Gross Anatomical Nomenclature (2021) e comparados com a literatura referente a estudos com sirênios e outros mamíferos aquáticos.]

6.3 Microscopia de Luz

Para análises com microscopia de luz foram usadas técnicas histológicas preconizadas por Tolosa et al (2003). As amostras foram fixadas primariamente em solução aquosa de formaldeído a 10%. Para preparação das lâminas histológicas, as amostras foram desidratadas em série de álcoois 70%, 90% e 100% (Uma hora cada), diafanizadas em três banhos com xilol (Uma hora cada) e impregnadas com parafina histológica em dois banhos. Para a confecção das lâminas, cortes de 5µm de espessura da língua foram obtidos em micrótomo (LEICA RM 2125 RT®), aderidos às lâminas de vidro e deixados em estufa a 60°C “overnight”, para posterior procedimentos de coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Gomori (TG) e para técnica de histoquímica. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz (LEICA DM 500 HD) com câmera acoplada (LEICA ICC50W) e obtidas imagens por meio do programa LAS EZ Ink.

6.4 Histoquímicas

Os cortes de 5µm da língua foram submetidos às reações histoquímicas utilizando a combinação dos corantes Ácido Periódico de Schiff (PAS) associado com azul de Alcian (pH 2,5) para marcar mucinas neutras e ácidas, respectivamente (Behmer et al., 1976). As caracterizações histoquímicas do padrão mucinal foram baseadas nos componentes orgânicos das secreções das unidades secretoras, com reações histoquímicas classificadas como negativas ou positivas.

6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise foram coletadas amostras da língua e fixadas em glutaraldeído a 2,5% tamponado com fosfato de sódio 0,1 molar em pH 7,4 a 4°C. Em seguida, foram lavadas três vezes em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 durante 10 minutos, pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio 2% tamponado com Fosfato de Sódio 0,1M e pH 7,4, por 1h e 20 min. Posteriormente, as amostras foram tratadas com HCl 20% em estufa a 60 °C por 20 min e em seguida foram realizadas três lavagens em tampão e duas com água destilada para remover o muco da superfície, e na sequência foi desidratado em séries crescentes de álcool 15%, 25%, 30%, 50%, 70%, 90% (uma vez de 5 min em cada concentração) e 100% (três vezes de 10 min cada). O material foi seco em aparelho de ponto crítico (Quorum K 850) utilizando gás carbônico (CO₂), montado em suporte do ponto de amostra “Stub” (PELCO Tabs™, Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA) para metalização com ouro por “sputtering” (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., Laughton, East Sussex, UK). As imagens foram capturadas com um detector de elétrons secundário em MEV (TESCAN VEJA 3 LMU, Tescan, Czech Republic), operando com um feixe de elétrons de 10kV.

REFERÊNCIAS

1. BALENSIEFER, D.C.; ATTADAMO, F.L.N.; SOUZA, G.P.; FREIRE, A.C.B.; CUNHA, F.A.G.C.; ALENCAR, A.E.B.; SILVA, F.J.L.; LUNA, F.O.; Three decades of Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) stranding along the Brazilian coast. **Trop ConservSci**. Vol. 10. p.1-9. 2017
2. BARBOZA, M. L. B.; LARKIN, I.V.; Gross and Microscopic Anatomy of the Nasal Cavity, Including Olfactory Epithelium, of the Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*). **Aquatic Mammals**. Vol. 46. Issue 3. p.274 – 284. 2020a
3. BARBOZA, M. L. B.; LARKIN, I.V.; Functional morphology of the taste buds of Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. **Marine Mammal Science**. Vol. 36. Issue 3. p.939 – 952. 2020b
4. BOSSART, G. D.; Manatees. **CRC Handbook of Marine Mammal medicine**. Ed. 2^a. p.989-1010. 2001
5. COSTA, A. F.; Distribuição espacial e status do peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus*, (Sirenia: Trichechidae) no litoral leste do Estado do Ceará. **UFC**. Brasil. 2006
6. DOMNING, D.P.; Sirenians, seagrasses, and Cenozoic ecological change in the Caribbean. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. Vol.166. Issue 1. p.27-50. 2001
7. DOMNING, D.P.; HAYEK, L.A.C.; Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: Trichechus). **Marine Mammal Science**. Vol.2. p.87-144. 1986.
8. DORAN, G. A.; Review of the Evolution and phylogeny of the mammalian tongue. **Cells Tissues Organs**. Vol.91. Issue 1. p.118 – 129. 1975
9. DRUZISKY, K.A.; BRAINERD, E.L.; Buccal oscillation and lung ventilation in a semi-aquatic turtle, *Platysternon megacephalum*. **Zoology**. Vol.104. p.143-15. 2001
10. HARTMAN, D.S.; Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida American. Society of Mammalogists. p.142-150. 1979
11. INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE NOMINA ANATOMICA VETERINARIA. **Knoxville, TX: World Association of Veterinary Anatomists**. 2021
12. IWASAKI, S.; Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. **Journal of Anatomy**. Vol.201. Issue 1. p.1-13. 2002

13. KOWALEWSKY, S., DAMBACH, M., MAUCK, B., & DEHNHARDT, G.; High olfactory sensitivity for dimethylsulphide in harbourseals. **Biology letters**. Vol. 2. Issue 1. p.106-109. 2005
14. LEVIN, M. J.; Gross and Microscopic Observations on the Lingual Structure of the Florida Manatee *Trichechus manatus latirostris*. **Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University**. USA. 2002
15. LEVIN, M. J.; PFEIFFER, C. J.; Gross and Microscopic Observations on the Lingual Structure of the Florida Manatee *Trichechus manatus latirostris*. **Anatomy, Histology, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series**. Vol.31. Issue 5. p.278 – 285. 2002
16. LIMA. R.P.; Peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*): distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais ao longo do litoral nordeste do Brasil. UFPE. Brasil. 1997
17. LUNA, F.O.; BALENSIEFER, D.C.; FRAGOSO, A.B., STEPHANO; A., ATTADEMO, F.L.N.; *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. p.103-109. 2018
18. MARSH, H., O'SHEA, T.J. AND BEST, R.C. Research on sirenians. **Ambio**. p.177-180. 1986
19. MARSHALL, C.D.; MAEDA, H.; IWATA, M.; FURUTA, M.; ASANO, S.; ROSAS, F.; REEP, R.L.; Orofacial morphology and feeding behaviour of the dugong, Amazonian, West African and Antillean manatees (Mammalia: Sirenia): functional morphology of the muscular-vibrissal complex. **Journal of Zoology**. Vol.259. Issue 3. p.245-260. 2003
20. MOORE, S. E.; Marine mammals as ecosystem sentinels. **Journal of Mammalogy**. Vol.89. Issue 1. p.534-540. 2008
21. OLIVEIRA, R.E.M; ATTADEMO, F.L.N.; SOUSA, A.C.F.C.; MAGALHÃES, M.S.; OLIVEIRA, R.M.; MOURA, C.E.B.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F.; FRAGOSO, A.B.L.; SILVA, F.J.L.; OLIVEIRA, M.F.; Oropharyngeal cavity floor morphology in *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae) hatchlings and evolutionary implications. **Anat Rec**. Vol.306. p.343-353. 2022
22. POWELL, J. A.; WALDRON, J. C.; The manatee population in Crystal River, Citrus County, Florida. **Proceedings of a workshop held in Orlando**. USA. p.27-29. 1978

23. REYNOLDS III, J.E.; ROMMEL, S.A. Structure and function of the gastrointestinal tract of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. **The Anatomical Record**. Vol. 245. Issue 3.p.539-558. 1996
24. Reynolds, J. E.; & Odell, D. K.; Manatees and dugongs. **Factson File**. USA. 1991
25. RODRIGUES, F.M. Ecologia alimentar e composição bromatologica de alimentos do peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus*) na paraíba. **UFG**. Brasil. 2018
26. RODRIGUES, N. F. B. A ocorrência de peixes-bois (*Trichechus spp.*) na Baía do Marajó, Pará e o estudo bromatológico de macrófitas aquáticas em potencial na dieta. **UFPA**. Brasil. 2017
27. ROMMEL S.; REYNOLDS J.E. Diaphragm structure and function in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). **The Anatomical Record**. Vol. 259. Issue 1. p.41-51. 2000
28. ROSAS, F.C.; PIMENTEL, T.L.; Order Sirenia (manatees, dugongs, sea cows). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Vol.1. p.352-362. 2001
29. ROSAS, F. C. W.; Biology, conservation and status of the Amazonian Manatee *Trichechus inunguis*. **Mammal Review**. Vol. 24. Issue 1. p.49-59. 1994
30. SHARABY, A.A., GENDY, S.A., ALSAFY, M.A., NOMIR, A.G. & WAKISAKA, S. Morphological variations of the vallate papillae in some mammalian species. **Anatomical ScienceInternational**. Vol.89 p.161-170 2014
31. THAYER, G.W. FONSECA, M.S. KENWORTHY, W.J. CHEAP, K.M. A low-cost planting technique for shoalgrass (*Halodule wrightii*) and manatee grass (*Syringodium filiforme*). 1984
32. TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G.; **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. Brasil. Ed. 2ª. p.331. 2003
33. VAN METER, V. B.; WEIGERT, L. S; The Florida manatee. **Florida Power & Light Company**. Ed.1ª. 1989
34. WERTH, A.J.; Feeding in marine mammals. **Feeding: form, function and evolution in tetrapod vertebrates**. Issue 1. p.475-514. 2000
35. WHITEHEAD, P. J. P. Registros antigos da presença do peixe-boi do Caribe (*Trichechus manatus*) no Brasil. **Acta Amazônica. Brasil**. Vol. 8. Issue 3. p.497-506. 1978

36. YAMASAKI, F.; KOMATSU, S.; KAMIYA, T.; A comparative morphological study on the tongues of manatee and dugong (Sirenia). **Sci Rep Whales Res Inst.** Vol.32. p.127-144. 1980

CAPÍTULO 1 – ANTILLEAN MANATEE (*Trichechus manatus manatus* LINNAEUS, 1758) TONGUE MORPHOLOGY AND ADAPTIVE HERBIVOROUS IMPLICATIONS

(Artigo experimental)

SUBMETIDO NA MICROSCOPY AND MICROANALYSIS

QUALIS: Quadriênio 2017-2020: A2

FATOR DE IMPACTO (2020): 4.099

Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) tongue morphology and adaptive herbivorous implications

Running title: Antillean manatee tongue morphology

Lucas Inácio dos Santos Melo^{1,2}, Radan Elvis Matias de Oliveira^{1,3,4}, Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa¹, Rysónely Maclay de Oliveira^{1,4}, Mariana Almeida Lima^{1,3,4}, Ana Bernadete Lima Fragoso^{3,4}, Flávio José de Lima Silva^{3,4,5}, Fernanda Löffler Niemeyer Attademo^{2,6}, Fábila de Oliveira Luna², Alessandra Fernandes Pereira¹, Moacir Franco de Oliveira¹

¹ Postgraduate Program in Animal Science, Federal University of the Semi-Arid Region (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, 59625-900, Brazil.

² National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals by Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (CMA/ICMBio), Santos, 11050-031, Brazil.

³ Center for Environmental Studies and Monitoring (CEMAM), Areia Branca, Rio Grande do Norte, 59655-000, Brazil.

⁴ Cetáceos da Costa Branca Project, University of the State of Rio Grande do Norte (PCCB-UERN), Mossoró, Rio Grande do Norte, 59610-210, Brazil.

⁵ Doctoral Program in Development and Environment (PRODEMA), Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, 59064-741, Brazil.

⁶ Federal University of Pernambuco (UFPE), Department of Zoology, Postgraduate Program in Animal Biology, Laboratory of Ecology, Behavior and Conservation, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil.

Corresponding author: Radan Elvis Matias de Oliveira; Address: Department of Biosciences, Biological and Health Sciences Center, Federal University of the Semi-Arid Region. Postal Address: Avenida Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, postal code 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. Phone: +55 (84) 991708460. Email address: radan_elvis@hotmail.com

Abstract

Morphological study of the tongue is an interesting tool for understanding evolutionary processes associated with feeding habits. Therefore, the aim of the present study was to

describe the tongue morphology of the Antillean manatee to establish a standard model for the species and understand potential morphological relationships with its herbivorous diet. Macroscopic dissections, light and scanning electron microscopy analyses of seven manatee tongues were performed. The tongue in Antillean manatees is a muscular and robust organ, divided into apex, body and root. It is firmly adhered to the floor of the oral cavity. Lingual papillae are distributed over the entire tongue surface. They were identified as filiform papillae concentrated in the apex. Fungiform papillae were present on the apex and lateral regions. Foliate papillae were located on the dorsolateral portion of the root. Lentiform papillae were located across the dorsal tongue surface. The mucosa is lined by a keratinized stratified squamous epithelium presenting compound tubuloacinar glands and taste buds in the foliate papillae. The tongue of the Antillean manatee is similar to other Sirenia species, both of which share a completely herbivorous diet.

Keywords: histochemistry, histology, morphophysiology, papillae, Sirenia, scanning electron microscopy.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Introduction

Sirenians are the only extant herbivorous aquatic mammals, which makes them evolutionarily different from other mammals. This taxonomic group is represented by only four living species, the West Indian manatee (*Trichechus manatus*), Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*), African manatee (*Trichechus senegalensis*) and dugong (*Dugong dugon*) (Hartman, 1979). A fifth representative of the group, the Steller's Sea cow (*Hydrodamalis gigas*) became extinct in the mid-18th century (Anderson, 1995; Forsten & Youngman, 1982).

The current West Indian manatee distribution is limited to a portion of the West coast of the Atlantic Ocean, with records of two subspecies, the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) in North America and the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) found throughout Central and South America (Domning & Hayek, 1986). *T. m. manatus* subspecies in Brazil is currently classified as "Endangered" by the Red Book of Brazilian Fauna Threatened with Extinction (Luna et al., 2018) and as "Vulnerable" by the International Union for Conservation of Nature (Deutsch et al., 2008). The current

conservation scenario combined with the species biological characteristics, raises concern about the future of the *T. m. manatus* subspecies in Brazil (Balensiefer et al., 2017; Nascimento et al., 2022).

In vertebrates, the oropharyngeal cavity plays an important role in a variety of functions, including feeding processes (Druzisky & Brainerd, 2001). Food texture and flavor detection are also highly relevant in defining the feeding habits of animals from different taxonomic groups (Sharaby et al., 2014). In this context, morphophysiological tongue studies have become an interesting tool in understanding the evolution of different feeding habits (Oliveira et al., 2022).

The morphological structure of the tongue, especially the dorsal surface, has been studied in many land mammals (Cienca et al., 2013; Santos et al., 2015; Barbosa et al., 2020; Tomiate et al., 2022). However, few morphology studies have been published on the tongue of marine mammals, with pioneering work observed for cetaceans (Werth, 2004; Guimarães et al., 2011), pinnipeds (Yoshimura et al., 2002; Erdoğan et al., 2015) and sirenians (Yamasaki et al., 1980; Levin & Pfeiffer, 2002; Barboza & Larkin, 2020). Studies on sirenians, however have mainly focused on the *T. m. latirostris* subspecies, and data is still lacking on the tongue morphology of the *T. m. manatus* subspecies, which is important from the conservation and morphological aspect.

Thus, considering the importance of the tongue in dietary adaptations, the scarcity of tongue morphology data for *T. m. manatus*, and the fact that this species is one of the most endangered marine mammals in Brazil, the aim of the present study was to describe the tongue morphology of *T. m. manatus* and obtain some basic morphological data on this species which will be relevant in further understanding of food habits and in pathological conditions of the oral cavity.

Material and Methods

Animals

Seven manatee tongues (*T. m. manatus*) obtained by the Costa Branca Cetaceans Project (IBAMA Authorization nº 02022.000050/2013 and SISBIO nº 13694-8) associated to the Rio Grande do Norte State University (PCCB/UERN) and by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation/National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals (ICMBio/CMA) in the state of Pernambuco, Brazil, were analyzed. The tongues belonged to animals that died during the study period and from the sample collections of the

aforementioned institutions. The analyses were carried out at the Applied Animal Morphophysiology Laboratory (LABMORFA/UFERSA), where they were processed for scanning electron microscopy and light microscopy assessments.

Macroscopic Analyses

Macroscopic manatee tongue structure descriptions were performed during routine necroscopic examinations of animals that died as a result of strandings, among others, during the study period. The structures were analyzed and described both “in situ” and “ex situ”, obtaining data on tongue shape and topographic relationships. Photographic documentation was obtained, and tongue fragments were collected for microscopic processing. The results were described based on the International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2017) and compared with literature assessments on sirenians and other aquatic mammals.

Light Microscopy Analyses

The histological techniques recommended by Tolosa et al. (2003) were used for light microscopy sample preparation. Five μm -thick tongue slices were obtained using a LEICA RM 2125 RT® microtome, adhered to glass slides and maintained overnight in an oven at 60°C, for subsequent Hematoxylin and Eosin and Gomori Trichrome staining procedures and histochemical assessments. The slides were then analyzed under a LEICA DM 500 HD light microscope with a coupled LEICA ICC50W camera and images were obtained using the LAS EZ Ink software.

Histochemistry Analyses

The 5 μm tongue slices were submitted to histochemical reactions using a combination of the Periodic Acid Schiff (PAS) and Alcian blue (pH 2.5) to identify neutral and acidic mucins, respectively (Behmer et al., 1976).

Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses

Tongue samples were collected and fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered in 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate pH 7.4 at 4°C, followed by washes of about three times in 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.4 for 10 minutes and post-fixing in 2% Osmium Tetroxide buffered with 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.4, for 1:20 h min. The samples were subsequently treated with 20% HCl in an oven at 60 °C for 20 min, followed by three buffer

washes and two distilled water washes to remove surface mucus and, finally, dehydration in an increasing alcohol series at 15%, 25%, 30%, 50%, 70% and 90%, once for 5 min at each concentration, and 100%, three times for 10 min each. The samples were then dried by critical point Quorum K 850 apparatus using carbon dioxide mounted on a “stub” sample point support (PELCO Tabs™, Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA) for gold metallization by sputtering (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., Laughton, East Sussex, UK). Images were captured with a secondary electron detector (TESCAN VEJA 3 LMU, Tescan, Czech Republic) operating with a 10kV electron beam.

Results

Macroscopic Description

T. m. manatus tongues was muscular and robust, it is divided into apex, body and root. The tongue in this species was relatively small compared to the body size. It was firmly adhered to the floor of the oral cavity, with no lateral mobility, as it is limited by the mandibular bones. The apex was free, short, rounded, lacking the lingual frenulum and possessed numerous hair-like filiform papillae. In addition, the middle part of the tongue body dorsum was significantly convex both longitudinally and transversely in the dorsal direction, lacking the median sulcus. Fungiform papillae are located on the lateral tongue surfaces. Multifossulated openings were present on each dorsolateral margin at the and was represented by foliate papillae. The base of the tongue was firmly attached to the hyoid bone (Fig. 1).

A fat deposit (sublingual fat) was located in the lower tongue, more evident in manatee calves, and was more was interposed amongst lingual muscles (Fig. 1).

Microscopic Description

The tongue surface mucosa was made up of stratified and keratinized squamous epithelia. The mucosal epithelium presented four layers (basal, deep intermediate, shallow intermediate and keratinized). Cells were almost spherical in the basal and deep intermediate layers, with spherical and large nuclei. The shallow intermediate layer was composed of only a few layers of cells, which were flatter, and their rapid transition formed the most superficial keratinized layer (Fig. 2A).

The lamina propria of the tongue was formed by dense and irregular connective tissue containing blood vessels and nerve fibers interspersed with muscle tissue. The muscle layer

was composed of striated muscle tissue, with transverse, longitudinal and oblique bundles, and adipocytes were interspersed among the muscle bundles.

The lingual papillae were widely distributed over the entire tongue surface, with filiform papillae concentrated in the apex region. Fungiform papillae were located both on the apex and lateral tongue regions, while foliate papillae located on the dorsolateral portion of the tongue root. Lentiform papillae were located along the dorsal surface of the middle and posterior third of the tongue (Figs. 2, 3).

The tongue apex contained abundant filiform papillae, of about 1-3 mm high, formed by keratin, with a wider base and pointed apex. The number of papillae was higher at the free end, gradually disappearing caudally. These papillae lack taste buds (Figs. 2A, 3A, 3B).

Tongue fungiform papillae presented a thin keratin layer in the which was absent in other papillae, ranging from 1 to 3 mm in diameter and less than 1 mm in height. Thirty to 34 papillae, on average, were observed on each side of the tongue, with a thicker epithelium presenting ridges and projections without taste buds (Figs. 2C, 3C, 4C).

Foliate papillae presented a relatively thick epithelium covered by a layer of thin keratin, with the pits opened towards the interior of the papilla, similar to grooves, where the taste buds are located. These opened to the lumen through small openings, called taste pores. Taste buds are oval and internally formed by support, sensorial and basal cells (Figs. 2D, 3D, 5).

Lentiform papillae are highly keratinized projections shaped like lenses or flattened spheres. These papillae do not have taste buds (Figs. 2B, 3B).

Multiple lingual salivary glands of the compound tubuloacinar type presented a mucous nature are predominantly distributed throughout the tongue and body and root lamina propria, while glands of a serous nature were limited in the foliate papillae region (Fig. 6). Lingual salivary gland ducts opened into foliate papillae crypts (Fig. 5B). Both mucous and serous glands secretions showed positive PAS and AB mucin reactions (Fig. 7).

The SEM images indicated numerous keratinocytes in the form of a pentagon or hexagonal disc covering the entire tongue surface. In addition, evident keratin protrusions were detected on the filiform and lentiform papillae. Small pores were distributed dorsolaterally in the tongue body and root regions, while a series of linear concavities were noted on the dorsolateral surface of the lingual root, represented by foliate papillae (Figs. 3, 4).

Discussion

The tongue morphology of marine mammals is closely associated with the dietary adaptations of these animals (Levin & Pfeiffer, 2002; Erdoğan et al., 2015; Kienle et al., 2015; Barboza & Larkin, 2020). For example, tongue taste buds allow the animals to detect different flavors and taste prey (Yoshimura et al., 2002; Barboza & Larkin, 2020). In addition, the tongues of some whales and seals present ridges and grooves that aid in holding and filtering food items, such as krill or small fish (Yoshimura et al., 2007; Kienle et al., 2015). The tongues of sea lions and sea lions present filiform papillae, which are useful to hold slippery prey, such as fish and squid more easily (Yoshimura et al., 2002; Erdoğan et al., 2015). Thus, tongue morphology is an important adaptation factor to the specific diet of each marine mammal species.

The oral cavities of animals have evolved to better adapt to different types of food, as well as different food capturing methods. For example, the case of terrestrial megaherbivores, such as giraffes, white rhinoceroses, and elephants who, although plant feeders, exhibit extreme mouth morphologies and sizes, as a result of natural selection to adapt to the spatial mass and quality distribution patterns of their plant food items (Pretorius et al., 2015). Similar to manatees, elephant tongues are attached to the oral cavity floor and cannot protrude it, although they can bend in the center, which aids in moving food to the back of the throat (Greene et al., 2019). Other terrestrial herbivore species such as giraffes and bovines, also use their tongues to seize food (Davies et al., 1979; Pretorius et al., 2015). Manatees, on the other hand, use their lips to obtain food and insert it into the oral cavity (Melo et al., 2022).

Yamasaki et al. (1980), reported a muscular tongue in dugongs (*D. dugon*), African manatees (*T. senegalensis*) and Florida marine manatees (*T. m. latirostris*), with a free, short apex, and no lingual frenulum. The tongue was described as being firmly attached to the oral cavity floor, potentially indicating limited mobility. Furthermore, the middle part of the tongue body dorsum was reported as considerably convex, both longitudinally and transversely in the dorsal direction, with no median sulcus (Yamasaki et al., 1980), similar to the findings reported herein. In contrast, the middle part of the tongue dorsum in dugongs presents a wide longitudinal elevation of about one third of the lingual width, forming lateral bands on both tongue sides (Yamasaki et al., 1980).

The lingual papillae disposition in manatees noted herein is similar to that in hippopotamuses (*Hippopotamus amphibius*), where filiform papillae are distributed at the tongue apex, while fungiform papillae are located at the tongue apex, body and root, and foliate papillae are noted in the tongue root, with no vallate papillae (Yoshimura et al., 2009). Although hippopotamuses and manatees are completely herbivorous, they

belong to different taxonomical groups, i.e., the Artiodactyla order, which includes giraffes, camels, and pigs, and the Sirenia order, respectively. Similar tongue morphologies between completely different species with similar eating habits reinforces the idea that lingual morphological characteristics comprise strong evidence of evolutionary dietary adaptations.

Previous studies indicate four types of lingual papillae in Sirenia, namely filiform, lentiform, fungal and foliate (Yamasaki et al., 1980; Levin & Pfeiffer, 2002; Barboza & Larkin, 2020), similar to the findings reported herein for the *T. m. manatus* subspecies. The lentiform papilla has been referred to as the dorsal papilla by some researchers who described the tongue morphology of other sirenian species (Yamasaki et al., 1980; Levin & Pfeiffer, 2002). However, we chose to follow what is described in the International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2017) for herbivorous animals (ruminants). Most cetaceans present concave marginal papillae located along the anterolateral margin of the tongue, associated to age as, after a certain period, these structures disappear, remaining only in lingual grooves (Kastelein&Dubbeldam, 1990). This type of papilla was not detected in the present study not in any Sirenia species to date. According to Kastelein&Dubbeldam (1990), these papillae play an important role in breastfeeding, as they direct milk to the esophagus.

The keratinization observed on manatee tongue mucosa has been reported in all marine mammal taxa, namely cetaceans (Guimarães et al., 2011), pinnipeds (Yoshimura et al., 2002; Erdoğan et al., 2015) and sirenians (Levin & Pfeiffer, 2002; Barboza & Larkin, 2020). Keratinization is associated with the masticatory oral mucosa, which surrounds the dorsal part of the tongue, providing resistance against tissue damage during mastication (Oliveira et al., 2022). This may, in turn, be associated to manatee diets, as they feed on 57 plant species (Magalhães et al., 2022) and display a visibly thickened keratinized lingual mucosa layer when compared to other carnivorous marine mammals, such as pinnipeds (Yoshimura et al., 2002; Erdoğan et al., 2015) and cetaceans (Guimarães et al., 2011). This allows for the hypothesis that these animals present greater lingual mucosa protection, as plants are fibrous structures that may cause abrasive lingual mucosa lesions.

The taste buds of foliate papillae present similar characteristics to those reported previously for other sirenians (Yamasaki et al., 1980; Levin & Pfeiffer, 2002; Barboza & Larkin, 2020). According to Northcutt (2004), taste buds are pear-shaped multicellular sensory organs. The longitudinal axis of a taste bud is oriented vertically to the epithelium surface, and the apical surface is characterized by a receptor area comprising the apical endings of sensory cells consisting of receptor villi. In most amniotes, the receptor area is

usually located below the surface of the epithelium and is called the taste pore, similar to that observed herein in manatees, while the receptor area projects above the epithelium surface in anamniotes. The taste pore encounters substances for flavor perception, coupled to a heterotrimeric guanine nucleotide binding protein (G protein), called gustducin, which depolarizes the cell and sends neurotransmitters that stimulate afferent nerve fibers (Zhang et al., 2008).

The neutral and acidic mucins secreted by the mucous and serous tubuloacinar lingual salivary glands, which are abundant in the manatee lingual mucosa lamina propria, consist of glycoproteins that act as food lubricants, protecting the oral mucosa against mechanical abrasion, and act in the defense of the gastrointestinal tract, associates with protective proteins secreted by the epithelium, either by direct molecular interactions or by offering these proteins an aqueous and viscous-elastic medium to perform their defensive functions (Som & Brandwein, 2011; Croix et al., 2011).

Conclusion

The tongue of the Antillean manatee is similar to that of other Sirenia species and the hippopotamus, both sharing an entirely herbivorous diet. In addition, manatees present a more specialized tongue when compared to other carnivorous marine mammals, such as cetaceans and pinnipeds. Thus, the diversity of food items in Antillean manatee diets seems to imply a more morphologically specialized tongue enabling the identification of different plant flavors and textures that make up this species diet, leading to food preferences, as reported in previous dietary assessments.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Financial Code 001), the Postgraduate Program in Animal Science (PPGCA-UFERSA), the Instituto Chico Mendes de Pesquisa and Biodiversity Conservation National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals of the (CMA/ICMBio), the Costa Branca Cetaceans Project at the Rio Grande do Norte State University (PCCB/UERN), the Center for Environmental Studies and Monitoring (CEMAM) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 25/2021) for funding the Junior Post-Doctorate research grant.

References

Anderson, P. K. (1995). Competition, predation, and the evolution and extinction of Steller's sea cow, *Hydrodamalis Gigas*. *Mar Mamm Sci* 11, 391–394.

Balensiefer, D.C., Attademo, F.L.N., Souza, G.P., Freire, A.C.B., Cunha, F.A.G.C., Alencar, A.E.B., Silva, F.J.L. & Luna, F.O. (2017). Three decades of Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) stranding along the Brazilian coast. *Trop Conserv Sci* 10, 1–9.

Barbosa, G.K., Jacob, C.S., Pimentel Neto, J., Oliveira, M.F., Rici, R.E.G., Watanabe, I. & Ciena, A.P. (2020). Structural and ultrastructural characteristics of the tongue of the Collared Peccary (*Pecari tajacu*, Linnaeus, 1758). *Anat HistolEmbryol* 49, 532-540.

Barboza, M.L. & Larkin, I.V. (2020). Functional morphology of the taste buds of Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *Mar Mam Sci* 36, 939–952.

Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C. & Freitas Neto, A.G. (1976). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, SP: Editora da Universidade de São Paulo.

Ciena, A.P., Bolina, C.S., Almeida, S.R.Y., Rici, R.E.G., Oliveira, M.F., Silva, M.C.P., Miglino, M.A. & Watanabe, I. (2013). Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766). *J Anat* 223, 152-158.

Croix, J.A., Carbonero, F., Nava, G.M., Russell, M., Greenberg, E. & Gaskins, H.R. (2011). On the relationship between sialomucin and sulfomucin expression and hydrogenotrophic microbes in the human colonic mucosa. *PLoS One* 6, e24447.

Davies, R.O., Kare, M.R. & Cagan, R.H. (1979). Distribution of taste buds on fungiform and circumvallate papillae of bovine tongue. *Anat Rec* 195, 443-446.

Deutsch, C.J., Self-Sullivan, C. & Mignucci-Giannoni, A. (2008). *Trichechus manatus*, American Manatee. The IUCN Red List of Threatened Species.

Domning, D.P. & Hayek, L.A.C. (1986). Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: *Trichechus*). *Mar Mamm Sci* 2, 87–144.

Druzisky, K.A. & Brainerd, E.L. (2001). Buccal oscillation and lung ventilation in a semi-aquatic turtle, *Platysternon megacephalum*. *Zool* 104, 143–152.

Erdoğan, S., Villar Arias, S. & Pérez, W. (2015). Morphology of the Lingual Surface of South American Fur Seal (*Arctocephalus australis*) and Sea Lion (*Otaria flavescens*). *Microsc Res Tech* 78, 140–147.

Forsten, A. & Youngman, P. M. (1982). Mammalian species: *Hydrodamalis gigas*. *Americ Soc Mammal* 165, 1–3.

Greene, W., Dierenfeld, E.S. & Mikota, S. (2019). A review of Asian and African elephant gastrointestinal anatomy, physiology and pharmacology. *J Zoo Aquar Res* 7, 1-14.

Guimarães, J.P., Mari, R.B., Marigo, J., Rosas, F.C.W. & Watanabe, I. (2011). Light and Scanning Electron Microscopic Study of the Tongue in the Estuarine Dolphin (*Sotalia guianensis* van Bénédén, 1864). *Zool Sci* 28, 617–622.

Hartman, D.S. (1979). Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida. New York, USA: American Society of Mammalogists.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (2017). *Nomina Anatomica Veterinaria*. Knoxville, TX: World Association of Veterinary Anatomists.

Kastelein, R.A. & Dubbeldam, J.L. (1990). Marginal papillae on the tongue of the Harbour porpoise (*Phocoenaphocoena*), Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and Commerson's dolphin (*Cephalorhynchus commersonii*). *Aquat Mamm* 15, 158–170.

Kienle, S.S., Ekdale, E.G., Reidenberg, J.S. & Deméré, T.A. (2015). Tongue and Hyoid Musculature and Functional Morphology of a Neonate Gray Whale (Cetacea, Mysticeti, *Eschrichtius robustus*). *Anat Rec* 298, 660–674.

Levin, M.J. & Pfeiffer, C.J. (2002). Gross and microscopic observations on the lingual structure of the Florida manatee *Trichechus manatus latirostris*. *Anat Histol Embryol* 31, 278–285.

Luna, F.O., Balensiefer, D.C., Fragoso, A.B., Stephano, A. & Attademo, F.L.N. (2018). *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758. In Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Ed.), pp. 103–109. Brasília, Brazil: ICMBio/MMA.

Magalhães, K.M., Amaral, C.B., Vasconcelos, J.B., Vasconcelos, E.R.T.P.P., Silva Júnior, J. F., Oliveira Luna, F.O., Attademo, F.L.N. & Athiê-Souza, S.M. (2022). Sinopse da classificação dos itens alimentares do peixe-boi-marinho. In Guia de Itens Alimentares de Peixe-Boi-Marinho, Attademo, F.L.N., Luna, F.O., Athiê-Souza, S.M., Silva-Junior, J.F., Vasconcelos, E.R.T.P.P., Vasconcelos, J.B., Amaral, A.B. & Magalhães, K.M (Eds.), pp. 15-17. Brasília, Brazil: ICMBio/MMA.

Melo, L.I.S., Oliveira, R.E.M., Oliveira, M.F., Silva Júnior, J.F., Amaral, C.B., Luna, F.O., Attademo, F.L.N. & Magalhães, K.M. (2022). Dieta e adaptações morfológicas para alimentação do peixe-boi-marinho (*Trichechus Manatus Manatus*). In Guia de Itens Alimentares de Peixe-Boi-Marinho, Attademo, F.L.N., Luna, F.O., Athiê-Souza, S.M., Silva-Junior, J.F., Vasconcelos, E.R.T.P.P., Vasconcelos, J.B., Amaral, A.B. & Magalhães, K.M (Eds.), pp. 10-14. Brasília, Brazil: ICMBio/MMA.

Nascimento, M.B., Moura, Y.B.F., Oliveira, R.E.M., Borges, A.A., Oliveira, M.F., Luna, F.O., Attademo, F.L.N. & Pereira, A.F. (2022). Influence of intracellular cryoprotectants on the conservation of dermal somatic tissues derived from Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758). Biopreserv Biobank Online, 1-10.

Northcutt, R.G. (2004). Taste Buds: Development and Evolution. *Brain Behav Evolut* 64, 198–206.

Oliveira, R.E.M, Attademo, F.L.N., Sousa, A.C.F.C., Magalhães, M.S., Oliveira, R.M., Moura, C.E.B., Silva, A.R., Pereira, A.F., Fragoso, A.B.L., Silva, F.J.L. & Oliveira, M.F. (2022). Oropharyngeal cavity floor morphology in *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae) hatchlings and evolutionary implications. *Anat Rec* 306, 343-353.

Pretorius, Y., Boer, W.F., Kortekaas, K., Wijngaarden, M.V., Grant, R.C., Kohi, E.M., Mwakiwa, E., Slotow, R. & Prins, H.H.T. (2015). Why elephant have trunks and giraffe long tongues: how plants shape large herbivore mouth morphology. *Acta Zool* 97, 246–254.

Santos, A.C., Aro, M.M., Bertassoli, B.M., Viana, D.C., Vasconcelos, B.G., Rici, R.E.G., Oliveira, M.F., Miglino, M.A., Assis Neto, A.C. (2015). Morphological characteristics of the tongue of the rock cavy - *Kerodonrupestris* Wied, 1820 (Rodentia, Caviidae). *Biosci J* 31, 1174-1182.

Sharaby, A.A., Gendy, S.A., Alsafy, M.A., Nomir, A.G. & Wakisaka, S. (2014). Morphological variations of the vallate papillae in some mammalian species. *Anat Sci Int* 89, 161-170.

Som, P. & Brandwein-Gensler, M. (2011). Anatomy and pathology of the salivary glands. In *Head and Neck Imaging*, Som, P. & Curtin, H. St. Louis, USA: Elsevier.

Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A. & Freitas Neto, A.G. (2003). *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. Barueri, SP: Manole.

Tomiate, A.N., Barbosa, G.K., Reginato, G.S., Camargo, P.O., Oliveira, M.F., Watanabe, I. & Ciena, A.P. (2022). Structural and Ultrastructural Characteristics of the Spix's Yellow-Toothed Cavy (*Galea spixii*, Wagler, 1831) Tongue. *MicroscMicroanal* 28, 1819-1826

Werth, A.J. (2004). Functional Morphology of the Sperm Whale (*Physeter macrocephalus*) Tongue, with Reference to Suction Feeding. *Aquat Mamm* 30, 405–418.

Yamasaki, F., Komatsu, S. & Kamiya, T. (1980). A comparative morphological study on the tongues of manatee and dugong (Sirenia). *Sci Rep Whales Res Inst* 32, 127-144

Yoshimura, K., Shindo, J., Miyawaki, Y., Kobayashi, K. & Kageyama, I. (2007). Scanning electron microscopic study on the tongue and lingual papillae of the adult Spotted seal, *Phoca largha*. *Okajimas Folia Anat Jpn* 84, 83– 97.

Yoshimura, K., Hama, N., Shindo, J., Kobayashi, K. & Kageyama, I. (2009). Light and Scanning Electron Microscopic Study on the Tongue and Lingual Papillae of the Common Hippopotamus, *Hippopotamus amphibius amphibius*. *Anat Rec* 292, 921–934.

Yoshimura, K., Shindoh, J. & Kobayashi, K. (2002). Scanning electron microscopy study of the tongue and lingual papillae of the california sea lion (*Zalophus californianus californianus*). *Anat Rec* 267, 146–153.

Zhang, G., Zhang, H., Deng, S. & Qin, Y. (2008). Regional differences in taste bud distribution and alpha-gustducin expression patterns in the mouse fungiform papilla. *Chem Senses* 33, 357–362.

Figures

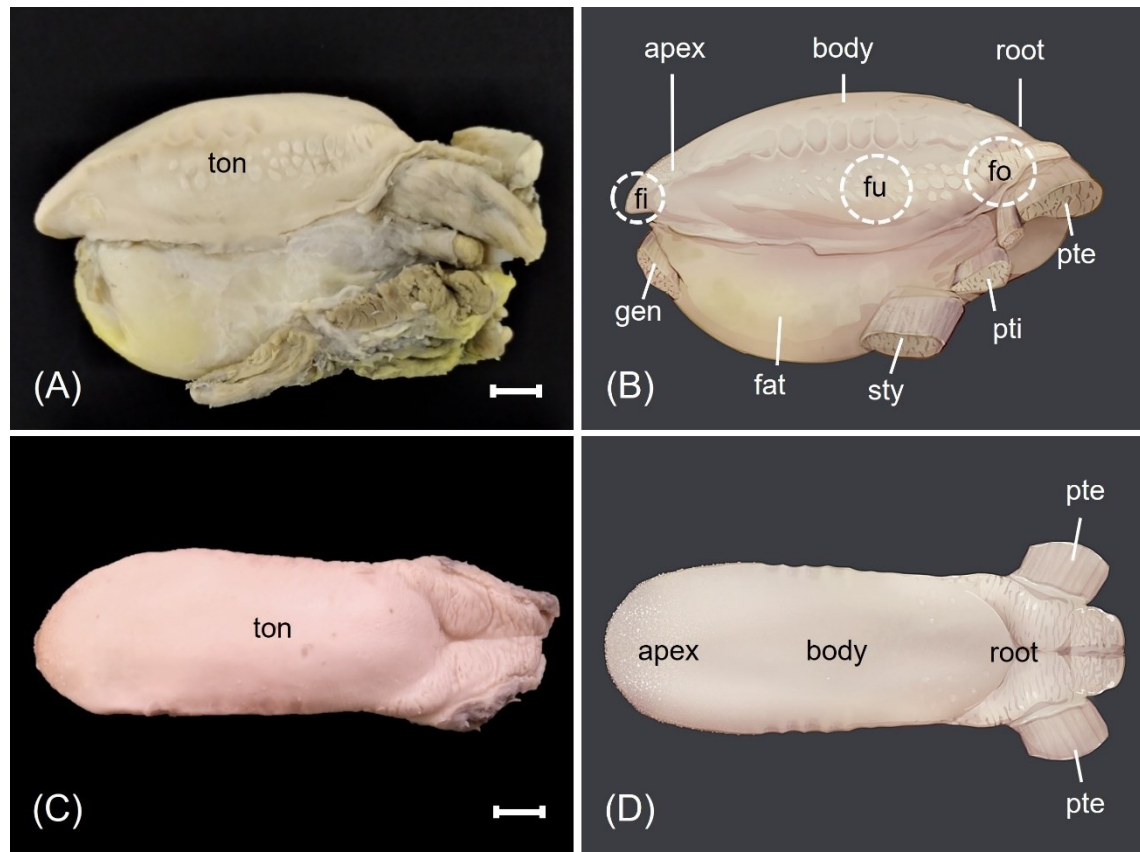


Figure1. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) tongue morphology. (A) Lateral tongue view. (B) Schematic of figure A. (C) Dorsal tongue view. (D) Schematic of figure C. Legends: tongue (ton); tongue apex (apex); tongue body (body); language root (root); filiform papillae (fi); fungiform papillae (fu); foliate papillae (fo); genioglossus muscle (gen); styloglossus muscle (est); internal/medial pterygoid muscle (pti); external/lateral pterygoid muscle (pte); sublingual fat (fat). Bar: 1.0 cm.

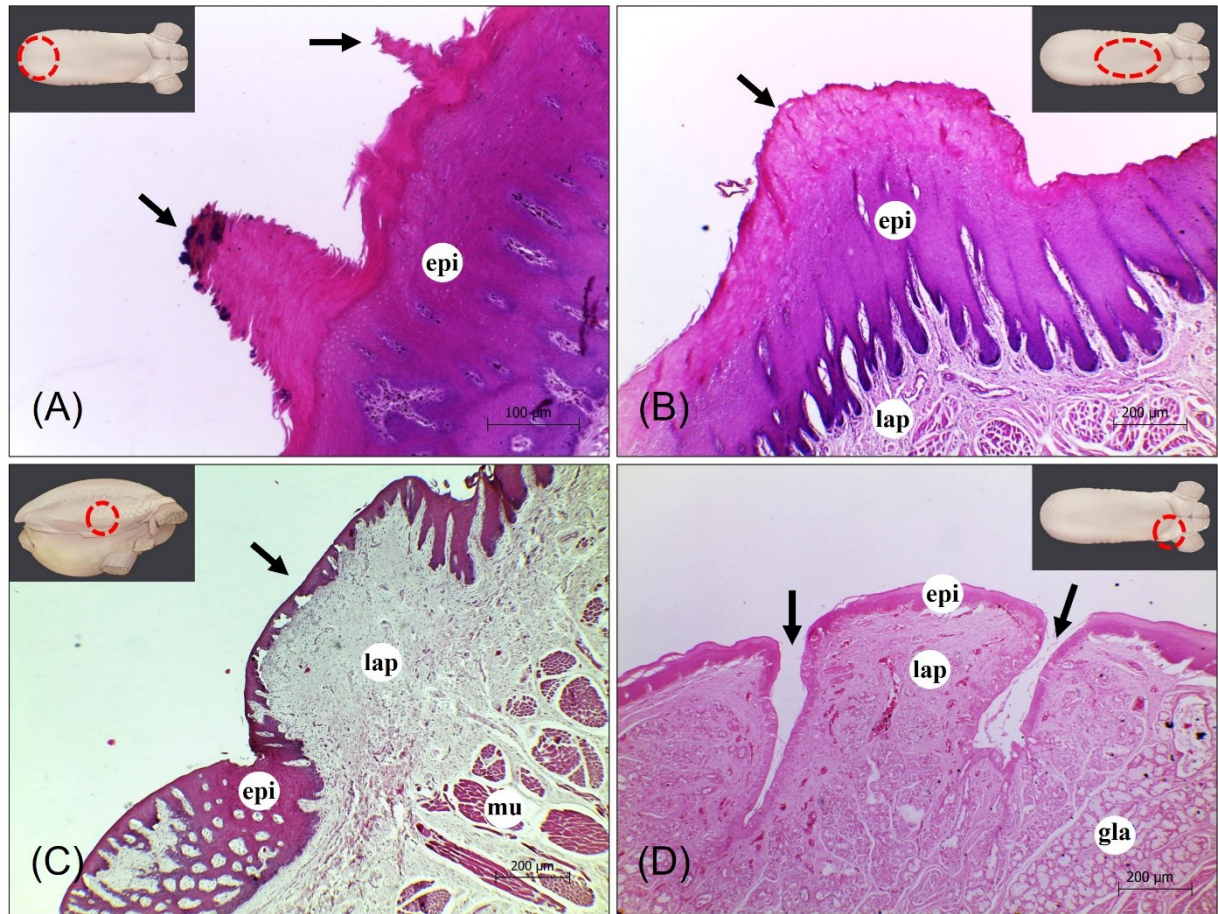


Figure 2. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) lingual papillae light microscopy images. (A) Filiform papilla (arrows). (B) Lentiform papilla (arrow). (C) Fungal papilla (arrow). (D) Foliate papilla (arrows). Caption: epithelium (epi); lamina propria (lap); lingual muscle (mu); compound tubuloacinar glands (gla). Staining: (A,B,C,D) hematoxylin and eosin.

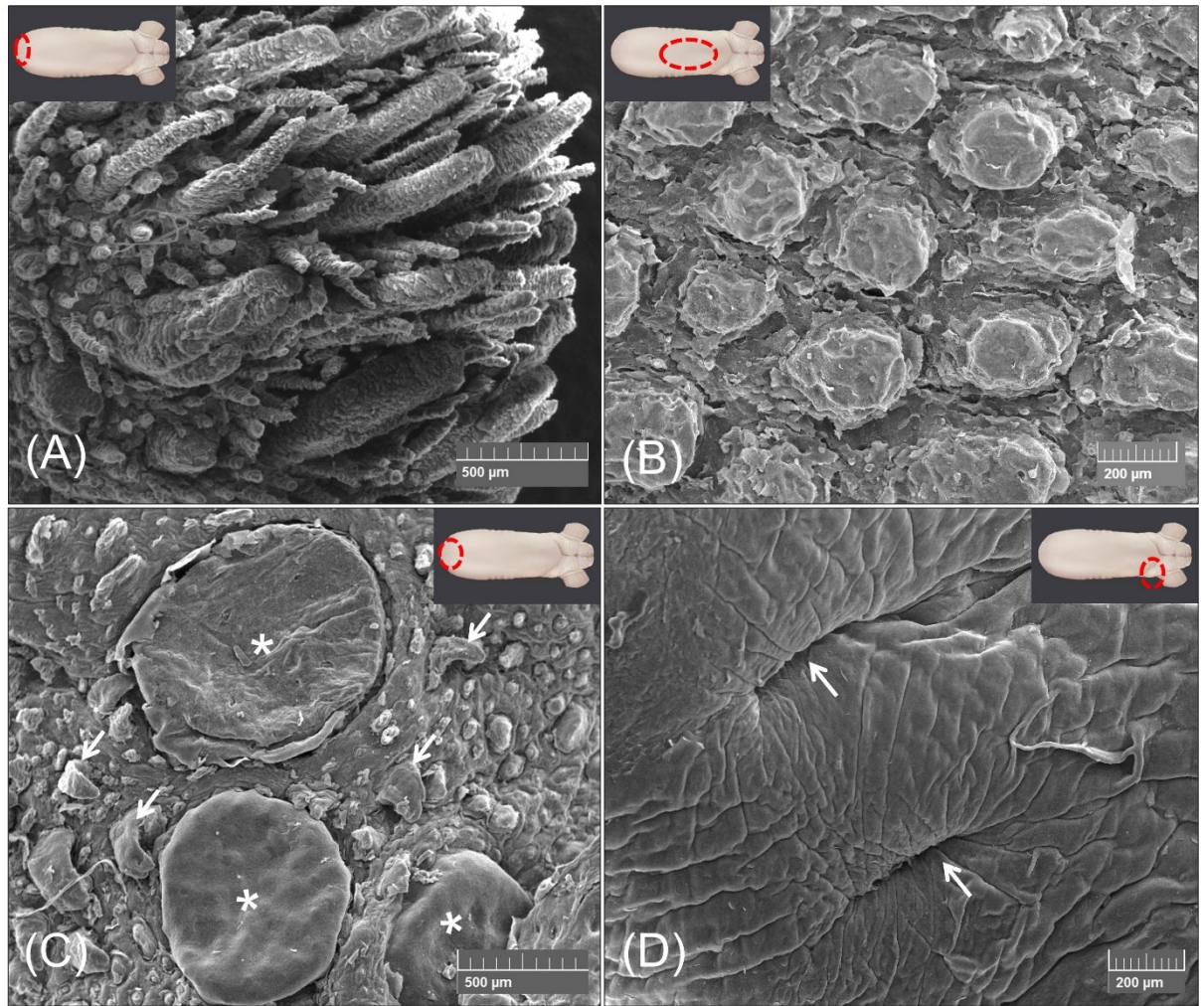


Figure 3. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) tongue papillae scanning electron microscopy images. (A) Elongated filiform papillae of the most rostral portion of the tongue apex. (B) Lentiiform papillae on the dorsal region of the tongue body. (C) Fungal papillae (*)

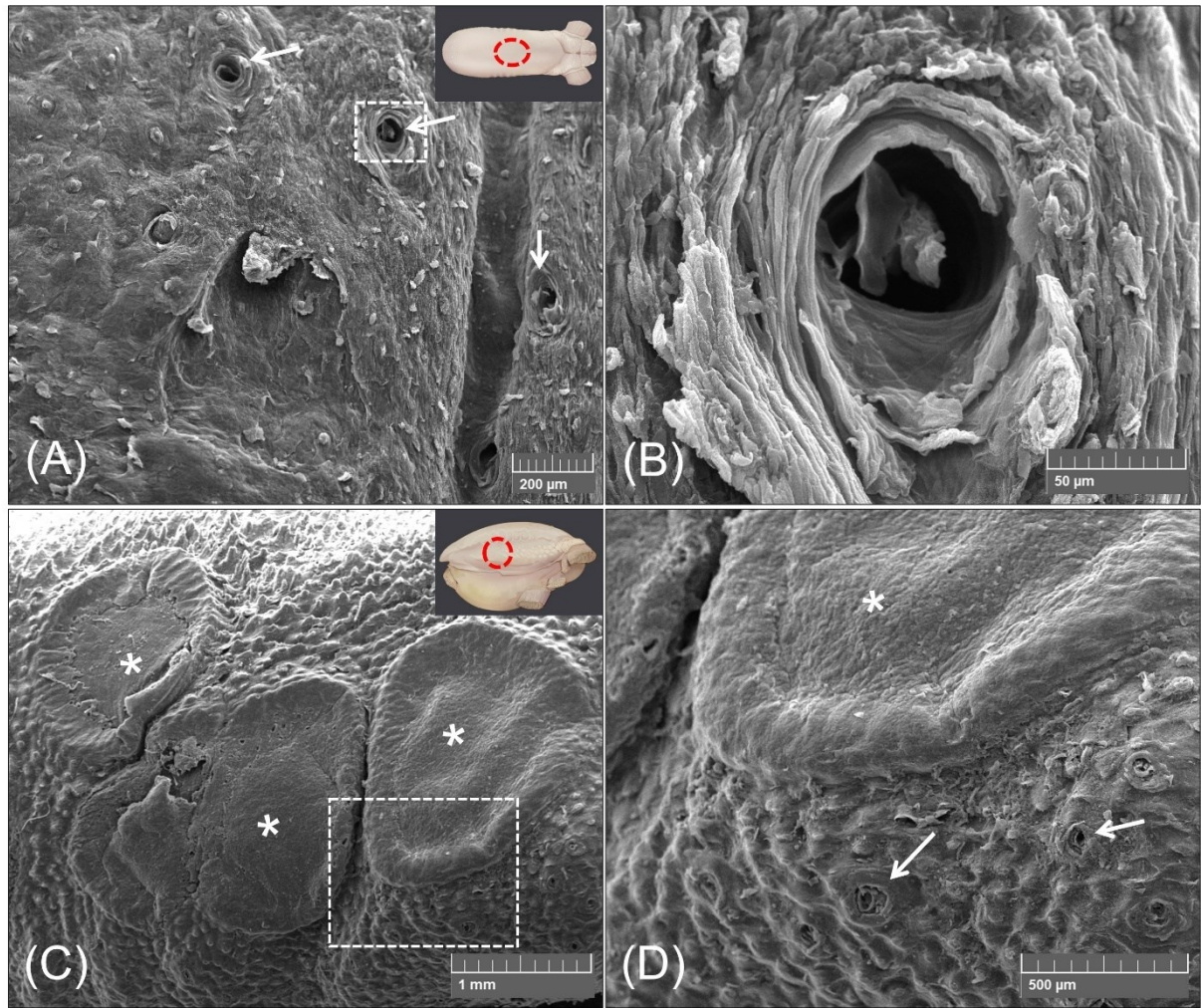


Figure 4. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) scanning electron tongue microscopy images. (A) Note the dorsal mucosa on the tongue body, presenting lingual salivary gland excretory duct openings (arrows). (B) Enlargement of figure A, indicating an excretory duct opening. (C) Note the lateral mucosa of the transition region between the tongue apex and body, with the presence of fungal papillae (*). (D) Enlargement of figure C. Note the lingual salivary gland excretory duct openings (arrows) close to the fungal papillae (*).

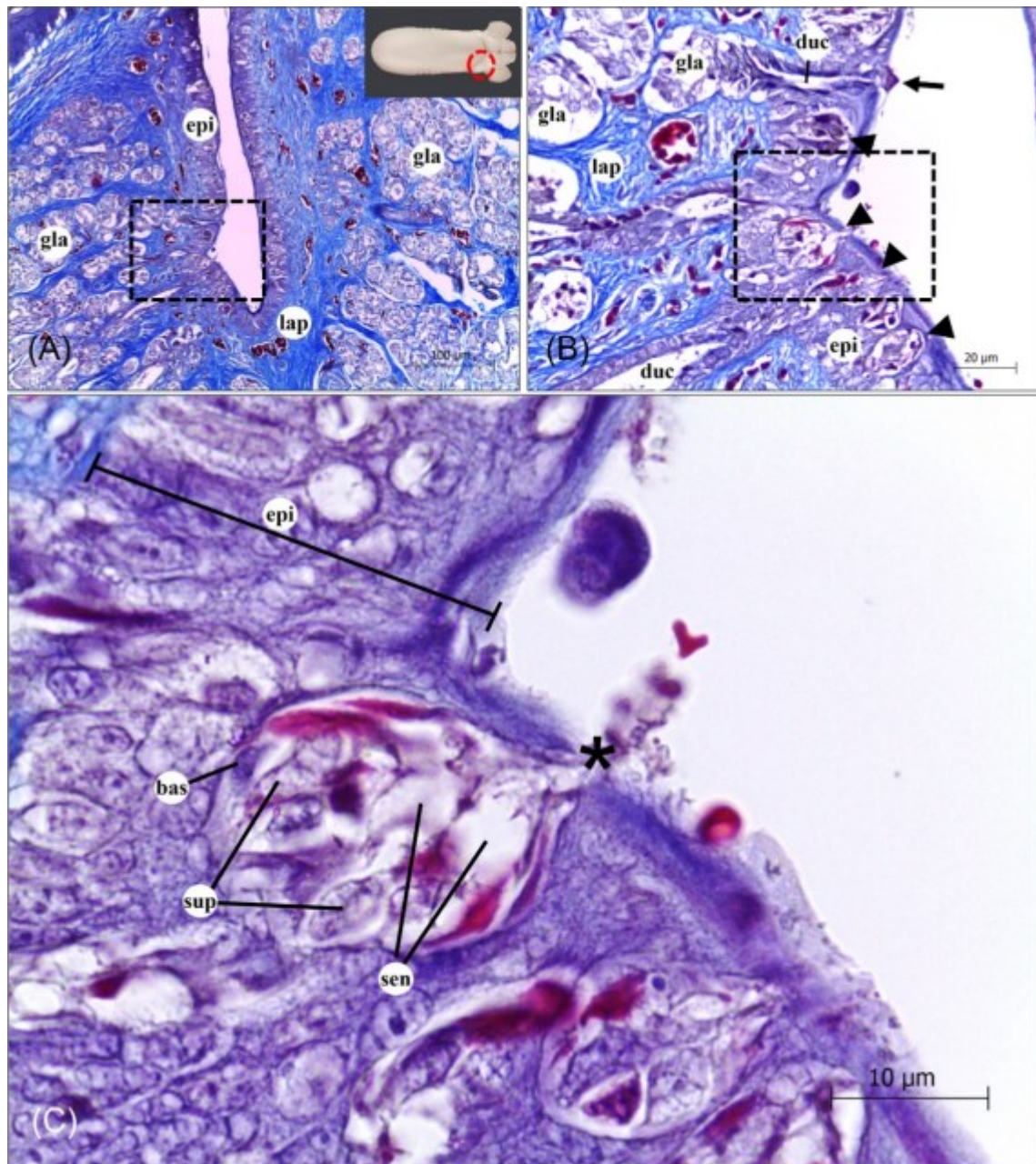


Figure 5. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) tongue foliate papilla taste buds light microscopy images. (A) Foliate papilla. (B) Enlargement of figure A, indicating the basal epithelium of the foliate papilla sulcus containing taste buds (arrowheads) and the tubuloacinar lingual salivary gland duct opening (arrow). (C) Enlargement of figure B, detailing the taste bud. Caption: epithelium (epi); lamina propria (lap); serous composite tubuloacinar lingual salivary glands (gla); excretory duct of the lingual salivary glands (duc); taste pore (asterisk); support cells (sup); sensory cells (sen); basal cell (bas). Staining: (A,B,C) Gomori trichrome.

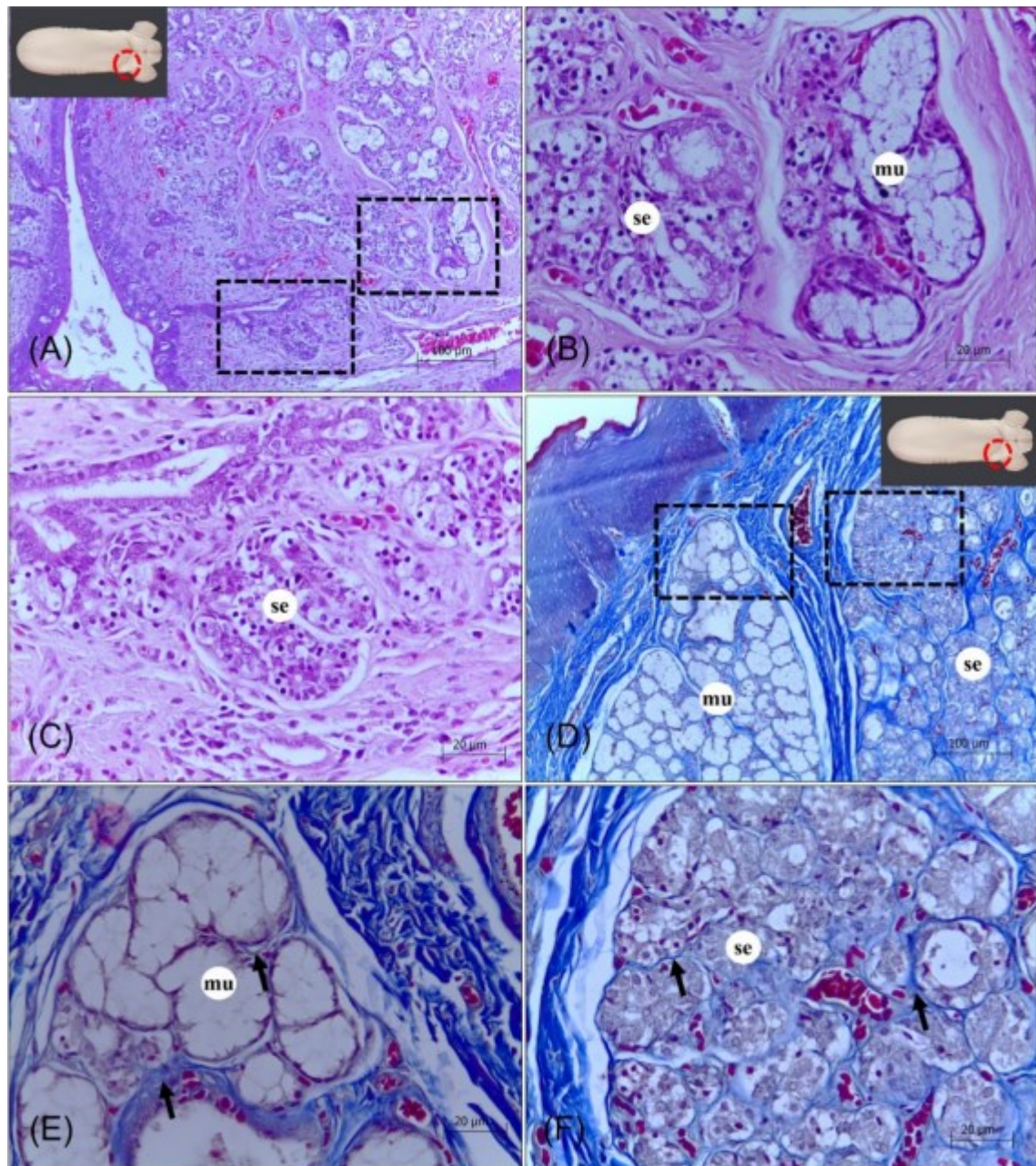


Figure 6. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) lingual salivary glands light microscopy images. (A) Tubuloacinar lingual salivary glands composed of veneered papilla. (B and C) Enlargement of figure A, showing the mucous (mu) and serous (se) tubuloacinar lingual salivary glands. (D) Shows the arrangement of connective tissue rich in collagen fibers between the compound tubuloacinar lingual salivary glands in the veneered papilla. (E and F) enlargement of figure D, showing the connective tissue fibers (arrows) entering the lingual salivary glands. Staining: (A,B,C) hematoxylin and eosin. (D,E,F) Gomori trichrome.

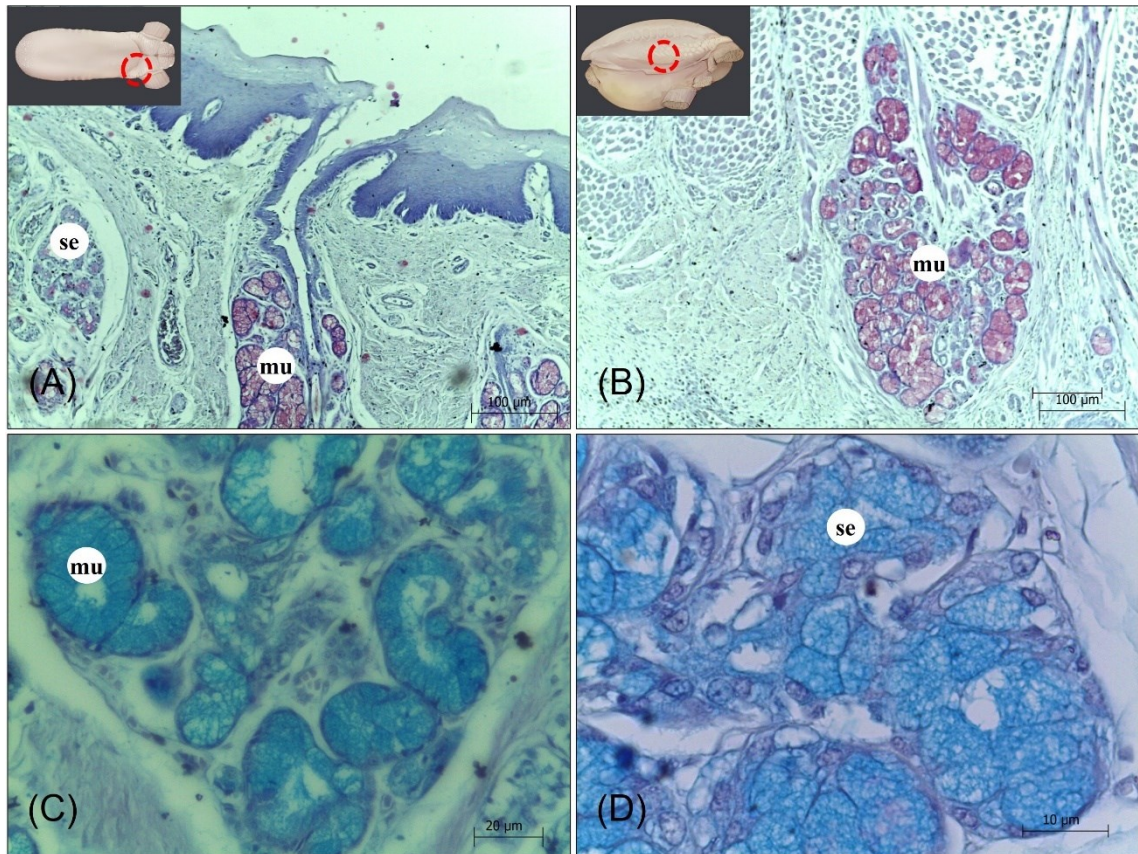


Figure 7. Manatee (*Trichechus manatus manatus*) lingual gland histochemistry. (A) Positive PAS staining for mucous (mu) and serous (se) foliaceous papillatubuloacinar salivary glands. (B) Positive PAS staining for mucous tubuloacinar salivary glands present in the lateral tongue region. (C) Positive staining of the AB for mucous tubuloacinar salivary glands. (D) Positive AB staining for serous tubuloacinar salivary glands. Staining: (A,B) Periodic Acid Schiff. (C,D) Alcian blue (pH 2.5).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A língua apresentou-se como um órgão musculoso e robusto, dividido em ápice, corpo e raiz. A mucosa revestida por epitélio escamoso estratificado queratinizado, presença de glândulas do tipo tubuloacinares compostas. As papilas linguais estavam distribuídas sobre toda a superfície do órgão, identificadas como papilas filiformes, papilas fungiformes, papilas foliáceas e as papilas dorsais, além de botões gustativas nas papilas foliáceas.

A língua do peixe-boi-marinho das Antilhas foi semelhante as outras espécies da ordem Sirenia, os quais compartilham de uma dieta totalmente herbívora. Além disso, apresentam uma língua mais especializada quando comparados as outras espécies de mamíferos marinhos carnívoras como os cetáceos e pinípedes.

Acreditamos que pela diversidade de itens alimentares na dieta do peixe-boi-marinho, implica em uma língua morfologicamente mais especializada para identificar os diversos sabores e texturas dos vegetais que compõem a sua dieta, levando-o a preferência alimentar já relatada em alguns estudos de dietas.

APÊNDICE

**APÊNDICEA– DIETA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS PARA ALIMENTAÇÃO
DO PEIXE-BOI-MARINHO (*Trichechus manatus manatus*)**

(Capítulo de livro)

**PUBLICADO NO LIVRO “GUIA DE ITENS ALIMENTARES DE PEIXE-BOI-
MARINHO”**

EDITORA: ICMBio

ISBN: 9786556930398

ANO DE PUBLICAÇÃO: 2022

DIETA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS PARA ALIMENTAÇÃO DO PEIXE-BOI-MARINHO (*TRICHECHUS MANATUS MANATUS*)

Lucas Inácio dos Santos Melo, Radan Elvis Matias de Oliveira, Moacir Franco de Oliveira, Joel Francolino da Silva Júnior, Camila Bezerra Amaral, Fábiana de Oliveira Luna, Fernanda Löffler Niemeyer Attademo, Karine Matos Magalhães

O peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) é um mamífero aquático, eurialino, com hábito alimentar do tipo herbívoro, mas classificado como um não-ruminante (REYNOLDS III; ROMMEL, 1996). A espécie brasileira (*Trichechus manatus manatus*) está categorizada como Em Ameaça de Extinção (EN), na lista vermelha brasileira (ICMBio, 2018) e como Vulnerável (VU) na lista da IUCN (2020) sendo o conhecimento de sua dieta de extrema importância para as estratégias de conservação desta espécie.

Os peixes-bois em ambiente natural, geralmente consomem entre 8 e 13% do seu peso corporal por dia (BEST, 1981), passando de 6 a 8 horas diárias alimentando-se (HARTMAN, 1979). Nos animais em cativeiro, esta variação pode ser de 4-12%, dependendo da necessidade do animal e do tipo de alimento, uma vez que recebem itens não naturais (ATTADEMO, F.A., Confirmação pessoal). Como a sua digestão é lenta, proporciona uma maior absorção de nutrientes, com um dos maiores coeficientes de digestibilidade de celulose, sendo cerca de 80% deste processo no intestino grosso (BURN, 1986).

Os itens alimentares naturais consumidos pelo peixe-boi variam entre angiospermas marinhas, algas, macrófitas de água doce e folhas de mangue. Essa variação de alimentos é justificada pelo fato de, apesar de passarem a maior parte da vida no mar, os peixes-bois-marinhos têm a necessidade de consumir água doce, por isso costumam buscar este item em estuários e rios e fontes de água doce no mar (WORTHY, 2001), daí acabam se alimentando de espécies nesses locais.

Apesar da alimentação variar de acordo com a disponibilidade dos itens na natureza, seu alimento favorito são as angiospermas marinhas, como o capim agulha (*Halodule wrightii* Ascherson, 1868) (LIMA, 1997) uma vez que essas plantas possuem taxas altas de proteína e níveis médios de nitrogênio maiores do que os de plantas terrestres (THAYER et al., 1984), o que facilita sua obtenção de energia. Contudo, além da composição química, o valor das angiospermas marinhas como fonte de alimento pode variar de acordo com sua disponibilidade que envolve sua distribuição no ambiente, abundância, morfologia e produção, sendo natural a ingestão de outros alimentos.

Assim, de acordo com a disponibilidade verifica-se que no Rio Grande do Norte e Paraíba há o alto consumo de algas vermelhas; já no Maranhão o consumo preferencial é por espécies de mangues e marismas; no Ceará e Alagoas, angiospermas marinhas; enquanto no Piauí há um balanço de consumos entre todos os itens (RODRIGUES, 2018).

Diante da variedade de sua alimentação, apesar dos peixes-bois adultos, em geral, pastarem enquanto se alimentam de plantas enraizadas de fundo, as adaptações anatômicas os permitem o consumo de alimentos em diferentes estratos: fundo (espécies enraizadas), na coluna d'água (espécies flutuantes enraizadas), na superfície (flutuantes) e até mesmo acima da lâmina da água como por exemplo, folhas de mangue (Figura 1).

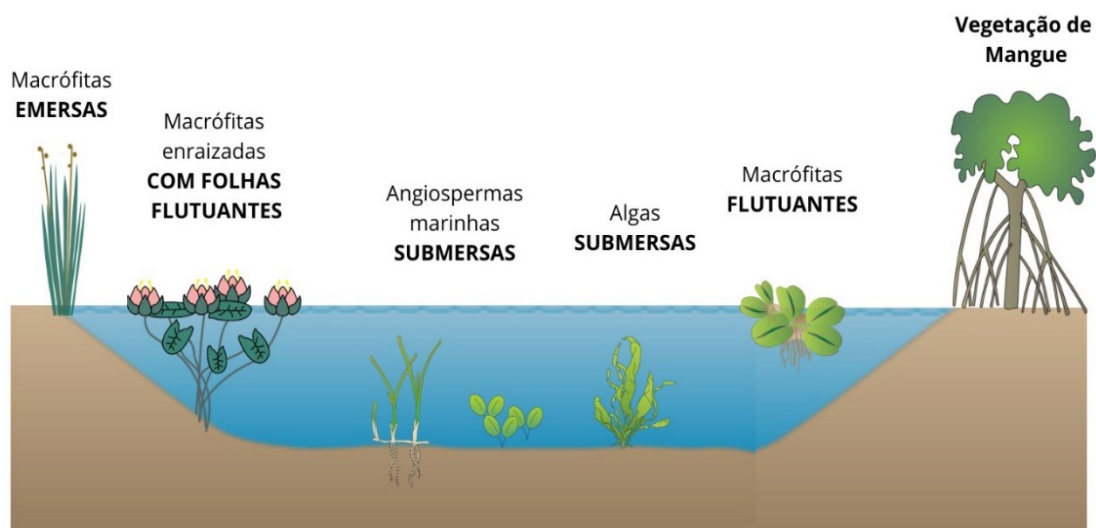


Figura1. Grupos ecológicos de macrófitas aquáticas nos diferentes substratos em que o peixe-boi pode se alimentar. Adaptado de Esteves 2011.

Apesar de herbívoros, além das plantas, há a ingestão acidental de sedimento e parte da fauna associada à vegetação. Há registro de ingestão de animais como ascídias (O'SHEA et al., 1991), peixes, crustáceos e cnidários (HARTMAN, 1979) sendo estes, inclusive, em alguns casos, considerados itens de alta relevância em sua dieta (DIAGNE, 2014). Além de acidental, existem registros de animais se alimentando deliberadamente de invertebrados, tendo sido relatado o barulho de mastigação das conchas (COURBIS e WORTHY, 2003).

Os mesmos autores relataram mastigação de cordas, o que já foi relatado por pescadores nas Áreas de Proteção Ambiental (APA) Costa dos Corais e de Santa Cruz, em relação a redes com peixes (MAGALHÃES, K.M., Confirmação pessoal). Infelizmente também há registros de resíduos plásticos e tecidos, como sacos plásticos, o que impede a absorção de nutrientes podendo até levar o animal à óbito (ATTADEMO et al., 2015).

ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS

Para sua alimentação este animal apresenta diversas adaptações anatômicas e fisiológicas. Por exemplo, possui um largo lábio superior lobado, com um grau de deflexão que o permite se alimentar no substrato, em qualquer nível de profundidade (BERTA; SUMICH, 1999). Outra característica importante nesses animais quanto à apreensão dos alimentos, é a presença de vibrissas espessas (Figura 2) nos lábios e dois músculos de projeção ou enchimento que possibilitam a apreensão e condução de itens alimentares ao interior da boca (MARSHALL et al., 2003).



Figura 2. Aspecto das vibrissas espessas, dispostas lateralmente aos lábios, a fim de permitir a apreensão de alimentos (em destaque). Foto: Fábila Luna

O alimento ingerido é, em geral, retirado do substrato pelos lábios superiores (Figura 3), mas o animal também pode utilizar as nadadeiras peitorais, como órgãos auxiliares para a apreensão e manipulação de alimentos. Durante o processo alimentar os animais mastigam incisivamente, enquanto manipulam seus lábios. Para triturar os alimentos, são utilizados de cinco a sete pares de dentes molares funcionais (Figura 4), uma vez que a boca desses animais é desprovida de dentes incisivos e pré-molares. Esses dentes, são substituídos de forma contínua e horizontal à medida que são desgastados. Os dentes possuem coroa e esmalte, e não apresentam cemento que sofrem desgaste em função da dieta (BERTA; SUMICH, 1999) (Figura 5).



Figura3. Detalhe dos proeminentes lábios superiores de peixe-boi, que possibilitam a apreensão de alimentos. Foto: Fábria Luna



Figura 4. Fileiras de dentes molares superiores e inferiores em peixe-boi-marinho contendo, em geral, 5 a 7 pares. Foto: Fernanda Attademo

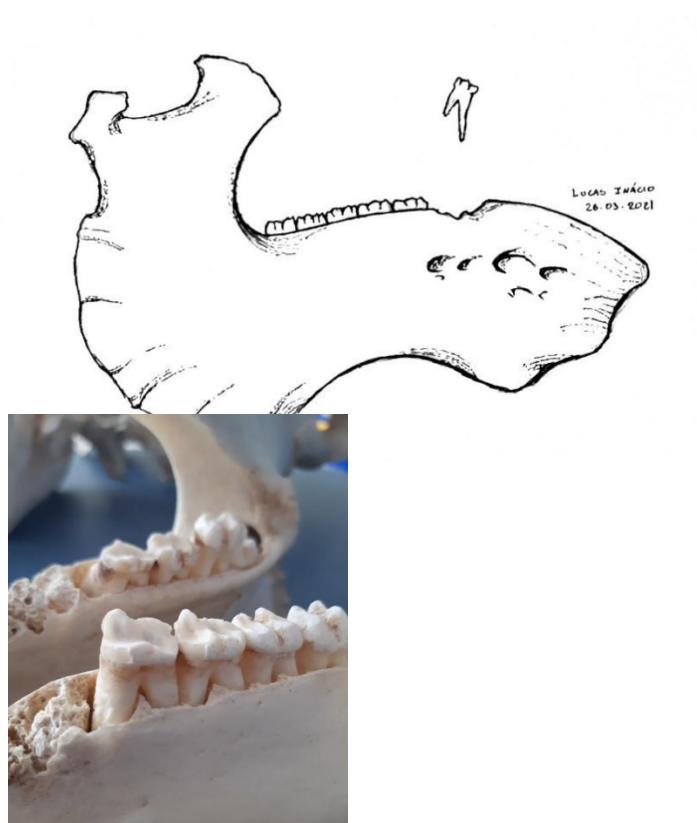


Figura 5. Dentes molares de peixe-boi-marinho. A: Esquema de troca dos dentes (Ilustração: Lucas Inácio); B: Detalhe dos dentes molares (Foto: Fernanda Attademo).

A língua dos peixes-bois está localizada no assoalho da boca, na região caudal da cabeça, e apresentam apenas o ápice livre, o que impede a capacidade de realizar protrusão. Na sua superfície dorsal são identificadas papilas gustativas dos tipos filiformes, fungiformes e foliáceas (YAMASAKI, 1981; LEVIN, 2002). Essas papilas são responsáveis por captar os estímulos de sabores dos alimentos, em diferentes regiões da língua.

O esôfago destes animais é um tubo estreito e muscular que termina no esfíncter cárdico, estrutura bem desenvolvida que se insere na porção cárdica do estômago, que impede a possibilidade de haver refluxo alimentar (PINHEIRO, 2019). Já o estômago é simples possuindo uma estrutura denominada de crista gástrica muscular, que divide o órgão em duas porções, sendo elas: a porção cárdica e a porção pilórica.

Uma estrutura proeminente associada ao estômago, denominada de glândula cárdica, está localizada na porção cranial, a qual possui túbulos secretores compostos por células secretoras que lançam seus produtos direto na luz do órgão, como o suco gástrico (ácido clorídrico, pepsina (enzima) e muco) (REYNOLDS III; ROMMEL, 1996). O ácido clorídrico e a pepsina são responsáveis pela digestão química dos alimentos, enquanto o muco atua inibindo a autodigestão da mucosa do estômago pela ação da própria pepsina e do ácido clorídrico.

A movimentação peristáltica dos peixes-boi é lenta devido a sua dieta, sendo que animais adultos e juvenis apresentam taxa metabólica distintas e correspondentes a 25 a 30%, respectivamente. O intestino dos peixes-bois é dividido em dois grandes segmentos, denominados intestino delgado e intestino grosso. A digestão química do alimento prossegue no intestino. O duodeno, primeira porção do intestino delgado, possui forma de ampola com presença de dois divertículos, que permitem a passagem de grandes volumes oriundos do estômago. Esse segmento serve como lugar de armazenagem, onde a digestão ocorre pela ação das enzimas pancreáticas sobre o material ingerido, degradando-o em partículas menores para absorção, além da ação da secreção biliar, responsável pela emulsificação da gordura, essencial para a digestão e absorção do alimento. Essas estruturas, assim como todo o trato digestório, são recobertas por uma camada de muco, secretado por um epitélio colunar do tipo mucoso. Logo após o duodeno, dando seguimento ao intestino delgado, sem delimitações macroscópicas, estão o jejuno e o íleo (RODRIGUES, 2018; PINHEIRO, 2019). Em

conjunto, estas estruturas atuam na absorção de nutrientes resultantes do processo de digestão que ocorre no estômago.

O intestino grosso dos peixes-bois-marinho mede cerca de 20 metros de comprimento e é o segmento onde ocorre a maior parte da absorção de fibras, que são digeridas de forma lenta pelos microrganismos incluindo bactérias anaeróbicas, que quebram a celulose por meio de processo de fermentação, além de ser o local de reabsorção de água. O ceco desses animais é bem desenvolvido, apresentando dois divertículos cecais, que se estendem até a junção ileocecal além de apresentar dois compartimentos, ampola e corpo, comunicadas por um orifício (SNIPES, 1984; LARKIN et al., 2007; RODRIGUES, 2018). Esse arranjo anatômico permite classificar esses animais como fermentadores pós-gástricos, uma vez que sua digestão ocorre principalmente no intestino grosso e ao nível de ceco (BURN, 1986; REYNOLDS III, ROMMEL, 1996). A grande maioria das fibras ingeridas tem seu processo de digestão ao nível do ceco por ação de bactérias anaeróbicas, a exemplo do que se verifica em outros herbívoros não-ruminantes, onde fibras ingeridas e não digeridas ao passar pelo estômago, são fermentadas a fim de que o animal possa completar o processo de digestão.

De forma geral, o intestino apresenta células caliciformes em abundância, localizadas na camada basal da mucosa, que são responsáveis pela produção da mucina, um polissacarídeo capaz de neutralizar a ação dos ácidos produzidos pelo estômago e lubrificar o epitélio do intestino, de maneira a facilitar a passagem dos alimentos. Na camada submucosa do intestino pode ser encontrado tecido linfóide, o qual se agrega para formar os nódulos linfáticos, denominados de Placas de Peyer, que compõem parte do sistema imunológico das mucosas intestinais e que a protege contra a invasão de microorganismos potencialmente patogênicos (REYNOLDS III; KRAUSE, 1982; PINHEIRO, 2019).

REFERÊNCIAS

- PINHEIRO, R. T. N. Análise morfológica do trato digestório de peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus manatus*, LINNAEUS, 1758) na Região Nordeste do Brasil / Rebeca Taínes do Nascimento Pinheiro. - Natal, 2019.
- WORTHY, G.A. Nutrition and energetics. In: Dierauf LA, Gulland FMD, editors. Marine Mammal Medicine. Boca Raton: CRC Press; 2001. p.791-827.
- BORGES, J. C. G. et al. Identificação de itens alimentares constituintes da dieta dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) na região Nordeste do Brasil. Revista Biotemas, X, v. 2, n. 21, p.77-81, jun. 2008.

- ALVES, M.D.O. Peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus*: ecologia e conhecimento no Ceará e Rio Grande do Norte, Brasil/Maria Denise de Oliveira Alves_Recife, 2007.
- ROMMEL S.; REYNOLDS J.E. 2000. Diaphragm structure and function in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *The Anatomical Record*. 259(1): 41–51.
- LEVIN, M. J.; PFEIFFER, C. J. Gross and Microscopic Observations on the Lingual Structure of the Florida Manatee *Trichechus manatus latirostris*. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, [s.l.], v. 31, n. 5, p.278-285, out. 2002. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0264.2002.00387.x>.
- BURN, D. M. The digestive strategy and efficiency of the West Indian Manatee, *Trichechus manatus*. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Physiology*, [s.l.], v. 85, n. 1, p.139-142, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90475-5](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(86)90475-5).
- BURN, D. M.; ODELL, D. K. Volatile fatty acid concentrations in the digestive tract of the West Indian Manatee, *Trichechus manatus*. *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, [s.l.], v. 88, n. 1, p.47-49, jan. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90077-0](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(87)90077-0).
- RODRIGUES, F.M. Ecologia alimentar e composicao bromatologica de alimentos do peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus*) na paraiba. Recife. 2018.
- MEDINA, V.E.H., 2008. Comportamento do peixe-boi (*Trichechus manatus manatus*) nos oceanários de Itamaracá: manejo e condições abióticas (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).
- RODRIGUES, N. F. B., A ocorrência de peixes-bois (*Trichechus* spp.) na Baía do Marajó, Pará e o estudo bromatológico de macrófitas aquáticas em potencial na dieta / Nilson Felipe Barros Rodrigues; Orientadora, Victória Judith Isaac Nahum; Coorientadora, Renata Emin-Lima. - 2017.
- SNIPES, R. L. Anatomy of the cecum of the West Indian manatee, *Trichechus manatus* (Mammalia, Sirenia). *Zoomorphology*, v. 104, n. 67–78, 1984.
- YAMASAKI, F.U.S.A.O., KOMATSU, S.H.U.N.R.O., KAMIYA, T.O.S.H.I.R.O., 1980. A comparative morphological study on the tongues of manatee and dugong (Sirenia). *Sci Rep Whales Res Inst*, 32, pp.127-144.
- LARKIN, I.L., FOWLER, V.F., REEP, R.L., 2007. Digesta passage rates in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *Zoo biology*, 26(6), pp.503-515.
- MARSHALL, C.D., MAEDA, H., IWATA, M., FURUTA, M., ASANO, S., ROSAS, F., REEP, R.L., 2003. Orofacial morphology and feeding behaviour of the dugong, Amazonian,

West African and Antillean manatees (Mammalia: Sirenia): functional morphology of the muscular-vibrissal complex. *Journal of Zoology*, 259(3), pp.245-260.

Reynolds III JE, Rommel SA. Structure and function of the gastrointestinal tract of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 1996 Jul;245(3):539-58.

Snipes, R. L. (1984). Anatomy of the cecum of the West Indian manatee, *Trichechus manatus* (Mammalia, Sirenia). *Zoomorphology*, 104(2), 67–78. doi:10.1007/bf00312020

Reynold, III, J. E., & Krause, W. J. (1982). A Note on the Duodenum of the West Indian Manatee (*Trichechus manatus*), with Emphasis on the Duodenal Glands. *Cells Tissues Organs*, 114(1), 33–40. doi:10.1159/000145576

ANEXOS

ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA

Microscopy and Microanalysis - MAM-23-084

Microscopy and Microanalysis <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Sáb, 08/04/2023 07:46

Para: radan_elvis@hotmail.com <radan_elvis@hotmail.com>

Cc: llucas.melo@outlook.com <llucas.melo@outlook.com>; radan_elvis@hotmail.com
<radan_elvis@hotmail.com>; carolfreitas04@outlook.com
<carolfreitas04@outlook.com>; rysonely_maclay@hotmail.com
<rysonely_maclay@hotmail.com>; marianaalml@icloud.com
<marianaalml@icloud.com>; anafragoso@uern.br <anafragoso@uern.br>; flaviolima@uern.br
<flaviolima@uern.br>; niemeyerattademo@yahoo.com.br
<niemeyerattademo@yahoo.com.br>; fabialunacma@gmail.com
<fabialunacma@gmail.com>; alexsandra.pereira@ufersa.edu.br
<alexsandra.pereira@ufersa.edu.br>; moacir@ufersa.edu.br <moacir@ufersa.edu.br>

08-Apr-2023

Dear Dr. Matias de Oliveira:

This email is a confirmation of the receipt of your manuscript entitled "Antillean manatee (Trichechus manatusmanatus Linnaeus, 1758) tongue morphology and adaptive herbivorous implications". Your manuscript has been assigned the following ID number: MAM-23-084.

An Editor will be in touch shortly. Thank you for submitting your manuscript to Microscopy and Microanalysis.

Sincerely,
Microscopy and Microanalysis
Editorial Office

ANEXO B – PRIMEIRA PÁGINA DO CAPÍTULO DE LIVRO

DIETA E ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS PARA ALIMENTAÇÃO DO PEIXE-BOI-MARINHO (*TRICHECHUS MANATUS MANATUS*)

Lucas Inácio dos Santos Melo, Radan Elvis Matias de Oliveira, Moacir Franco de Oliveira, Joel Francolino da Silva Júnior, Camila Bezerra Amaral, Fábila de Oliveira Luna, Fernanda Loffler Niemeyer Attademo, Karine Matos Magalhães

O peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) é um mamífero aquático, eurialino, com hábito alimentar do tipo herbívoro, mas classificado como um não-ruminante (REYNOLDS III; ROMMEL, 1996). A espécie brasileira (*Trichechus manatus manatus*) está categorizada como Em Ameaça de Extinção (EN), na lista vermelha brasileira (ICMBio, 2018) e como Vulnerável (VU) na lista da IUCN (2020) sendo o conhecimento de sua dieta de extrema importância para as estratégias de conservação desta espécie.

Os peixes-bois em ambiente natural, geralmente consomem entre 8 e 13% do seu peso corporal por dia (BEST, 1981), passando de 6 a 8 horas diárias alimentando-se (HARTMAN, 1979). Nos animais em cativeiro, esta variação pode ser de 4-12%, dependendo da necessidade do animal e do tipo de alimento, uma vez que recebem itens não naturais (ATTADEMO, F.A., Confirmação pessoal). Como a sua digestão é lenta, proporciona uma maior absorção de nutrientes, com um dos maiores coeficientes de digestibilidade de celulose, sendo cerca de 80% deste processo no intestino grosso (BURN, 1986).

Os itens alimentares naturais consumidos pelo peixe-boi variam entre angiospermas marinhas, algas, macrófitas de água doce e folhas de mangue. Essa variação de alimentos é justificada pelo fato de, apesar de passarem a maior parte da vida no mar, os peixes-bois-marinhos têm a necessidade de consumir água doce, por isso costumam buscar este item em estuários e rios e fontes de água doce no mar (WORTHY, 2001), daí acabam se alimentando de espécies nesses locais.

Apesar da alimentação variar de acordo com a disponibilidade dos itens na natureza, seu alimento favorito são as angiospermas marinhas, como o capim agulha (*Halodule wrightii* Ascherson, 1868) (LIMA, 1997) uma vez que essas plantas possuem taxas altas de proteína e níveis médios de nitrogênio maiores do que os de plantas terrestres (THAYER et al., 1984), o que facilita sua obtenção de energia. Contudo, além da composição química, o valor das angiospermas marinhas como fonte de alimento pode variar de acordo com sua disponibilidade que envolve sua distribuição no ambiente, abundância, morfologia e produção, sendo natural a ingestão de outros alimentos. Assim, de acordo com a disponibilidade verifica-se que no Rio Grande do Norte e Paraíba há o alto consumo de algas vermelhas; já no Maranhão o consumo preferencial é por espécies de mangues e marismas; no Ceará e Alagoas, angiospermas marinhas; enquanto no Piauí há um balanço de consumos entre todos os itens (RODRIGUES, 2018).

Diante da variedade de sua alimentação, apesar dos peixes-bois adultos, em geral, pastarem enquanto se alimentam de plantas enraizadas de fundo, as adaptações anatômicas os permitem o consumo de alimentos em diferentes estratos: fundo (espécies enraizadas), na coluna d'água (espécies flutuantes enraizadas), na superfície (flutuantes) e até mesmo acima da lâmina da água como por exemplo, folhas de mangue (Figura 1).



ANEXO C – COMPROVANTE DO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79407-1	Data da Emissão: 02/08/2021 16:18:47	Data da Revalidação*: 02/08/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucas Inácio dos Santos Melo	CPF: 016.433.134-44
Título do Projeto: MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS SENSITIVOS (GLOBO OCULAR E LÍNGUA) DO PEIXE-BOI MARINHO (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758).	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material e realização de exames de imagem.	09/2021	10/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	Orientador	325.949.504-59	Brasileira
2	Fernanda Loffer Niemeyer Attademo	Pesquisador associado	073.122.037-44	Brasileira
3	Fabia De Oliveira Luna	Pesquisador associado	012.615.617-40	Brasileira
4	RADAN ELVIS MATIAS DE OLIVEIRA	Pesquisador associado	076.974.554-71	Brasileira
5	Mariana Almeida Lima	Pesquisador associado	117.400.564-50	Brasileira
6	FLÁVIO JOSÉ DE LIMA SILVA	Pesquisador associado	485.543.674-72	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0794070120210802

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79407-1	Data da Emissão: 02/08/2021 16:18:47	Data da Revalidação*: 02/08/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucas Inácio dos Santos Melo	CPF: 016.433.134-44
Título do Projeto: MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS SENSITIVOS (GLOBO OCULAR E LÍNGUA) DO PEIXE-BOI MARINHO (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758).	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Observações e ressalvas

8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	COINF
---	-------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro de Reabilitação do Centro de Mamíferos Marinhos - CMA/ICMBio	Ilha de Itamaracá-PE	Marinho	Não	Fora de UC Federal
2	Centro de Reabilitação do Projeto Cetáceos da Costa Branca - PCCB/UERN	Areia Branca-RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Atividades ex-situ (fora da natureza)

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Trichechus manatus	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Trichechus manatus	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município. Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0794070120210802

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79407-1	Data da Emissão: 02/08/2021 16:18:47	Data da Revalidação*: 02/08/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucas Inácio dos Santos Melo	CPF: 016.433.134-44
Título do Projeto: MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS SENSITIVOS (GLOBO OCULAR E LÍNGUA) DO PEIXE-BOI MARINHO (<i>Trichechus manatus manatus</i> Linnaeus, 1758).	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Sirênios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0794070120210802

Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79407-1	Data da Emissão: 02/08/2021 16:18:47	Data da Revalidação*: 02/08/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucas Inácio dos Santos Melo	CPF: 016.433.134-44
Título do Projeto: MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS SENSITIVOS (GLOBO OCULAR E LÍNGUA) DO PEIXE-BOI MARINHO (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758).	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0794070120210802

Página 4/4