

**LEANDRO NOGUEIRA PRESSINOTTI**

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CICATRIZAÇÃO DO TEGUMENTO DE  
JACARÉ-DO-PANTANAL *Caiman yacare* (DAUDIN, 1802)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2014

**LEANDRO NOGUEIRA PRESSINOTTI**

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CICATRIZAÇÃO DO TEGUMENTO DE  
JACARÉ-DO-PANTANAL *Caiman yacare* (DAUDIN, 1802)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Professor Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Versão original

São Paulo  
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pressinotti, Leandro Nogueira.

Influência da temperatura na cicatrização do tegumento de jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802) / Leandro Nogueira Pressinotti. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Histofisiologia em répteis.

Versão do título para o inglês: Influence of temperature on the wound healing on integument of the jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802).

1. Temperatura 2. Crocodiliano 3. Inflamação 4. Regeneração 5. Pele I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB095/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Leandro Nogueira Pressinotti.

Título da Tese: Influência da temperatura na cicatrização do tegumento de jacaré-do-pantanal *Caiman yacaré* ( Daudin, 1802).

Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **125** nas fls. **76** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Roberto Machado Cunha da Silva, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Influência da temperatura na capacidade cicatricial do jacaré-do-pantanal Caiman yacare (Daudin,1802)** do qual participou(aram) o(s) alunos **Leandro Nogueira Pressinotti, Paola Cristina Branco e os pesquisadores João Carlos Shimada Borges, Victor Manuel Aleixo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.09.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 23 de setembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA  
Secretária  
CEEA - ICB/USP

À minha esposa e filho, Rhavena e Pedro.  
Aos meus amigos Victor e Ricardo

## AGRADECIMENTOS

A minha esposa Rhavena Graziela Liotti, que cuidou de nosso filho enquanto me envolvia com os trabalhos dessa tese.

Aos meus pais, Márcia e Paulo, e avó, Vilma, que sempre me recebiam em São Paulo durante minhas estadias para execução de diversas etapas do trabalho. Tenho em mente a importância da dedicação de vocês.

Ao meu orientador prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva, pessoa humana e sábia. Nesses últimos 14 anos tive o privilégio de ser seu aluno. Muito obrigado! Espero que possa continuar sob sua orientação para novos trabalhos!

Ao prof. Dr. Victor Manuel Aleixo, parceiro e amigo para os trabalhos com crocodilianos.

Ao Dr. Bruno Cogliati, pelos anticorpos e estruturas laboratoriais disponibilizados.

A toda equipe do ICB para os quais destaco o respeito, profissionalismo e atenção.

A Emília Ribeiro, pelos belíssimos cortes e colorações. Cabe ainda destacar os bons conselhos e a amizade.

Ao Gaspar, pelo processamento das amostras encaminhadas para MET.

Ao Edison, pela prontidão em me atender no MET.

A Celiana, que sempre nos atendia no sentido de solucionar os problemas dos trâmites documentais.

A Regina Valbom, para a qual destaco a prontidão e proatividade no atendimento.

A equipe da UNEMAT que viabilizava minhas saídas para São Paulo a fim de permitir o bom andamento do Doutorado, em especial os chefes de Departamento: Leila Gatass, Luciana Melhorança, Vilma Barretto, Marcia Mattos, Francisco de Assis. E ao secretário Gustavo Bizinoto.

A COOCRIJAPAN, principalmente na figura do Médico Veterinário Alessandro Spíndola Bérgamo, esse é o primeiro trabalho de muitos que faremos juntos.

Aos alunos de TCC que orientei nos trabalhos envolvendo crocodilianos, em especial a Carlos Roberto, Angela Paula, Poliana Dias, Derick Campos, Adriano Romano, Luis Guilherme, Thayane e Francisco Morais (esse ultimo foi com peixes, mas foi de grande serventia para os trabalhos).

A todos os integrantes do laboratório de histofisiologia evolutiva, sem vocês não teria feito nada.

A MSc. Tânia Cristina, pelo auxílio nas imunohistoquímicas.

A MSc. Ana Paula, pelo auxílio nas histoquímicas e imunohistoquímicas.

Ao MSc. Ricardo Borges, pelo auxílio na redação do trabalho, atualizações bibliográficas e prestação de contas.

A Dra. Paola, pelo trâmite dos documentos junto ao comitê de ética.

A MSc. Renata, pela prestação de contas e auxílio em diversas das técnicas.

Ao MSc. Andrews, pelo auxílio na tramitação administrativa dos documentos junto ao ICB.

A MSc. Karina, pelos conselhos e orientações de protocolos científicos de grande serventia.

A Camila (IC do laboratório), pelos auxílios nas imunohistoquímicas.

Ao excêntrico Alfonso, pela revisão do português e palpites importantes sobre a discussão.

Ao grande Dr. João Carlos Shimada Borges, um parceiro e amigo em todas as ocasiões.

A Dra. Luciana Harumi, pela amizade e conselhos no que tange a imunohistoquímica e padronizações de outras técnicas.

Ao Dr. Mauricio Martins da Rocha, pela amizade e hospedagem durante as disciplinas na USP-SP.

A Carolina Potter do Instituto Chico Mendes de Chapada dos Guimarães, pela correção do abstract da tese e pela amizade.

Se estiver esquecendo de algum nome, me perdoe a injustiça, pois foram muitos que contribuíram para o bom andamento dos trabalhos, até mesmo os técnicos da ANVISA em Guarulhos, que autorizaram o embarque das lâminas impedindo que o trabalho fosse perdido.

Esse trabalho contou com auxílio pesquisa FAPESP (2010/04527-5) e FAPEMAT (715823/2008).



Ao Mato Grosso, estado que me acolheu:

Para escrever essa epígrafe tive que ler a poesia de **Manoel de Barros** e apreciar algumas das pinturas de **Sebastião Mendes**. Nesse dia fiquei mato-grossense. Comi **bolo doce de arroz** no café da manhã, **peraputanga assada** no almoço, **pintado a bororo** na janta e **mojica de pintado** na ceia! Tudo isso ouvindo **viola de coxo**, sentado numa varanda em **Chapada dos Guimarães** que fica pertinho do **Pantanal**. As lembranças eram do **Vale do Araguaia** e do **Rio das Mortes** que fica do outro lado do estado, distante da **Serra Ricardo Franco** e do **Vale do Guaporé**. Quando amanheceu, pude tomar **banho de rio** no **calor de 42°C** e agradecer a Deus pelas oportunidades que ele nos deu.

“O APANHADOR DE DESPERDÍCIOS

Uso a palavra para compor meus silêncios.  
Não gosto das palavras  
fatigadas de informar.  
Dou mais respeito  
às que vivem de barriga no chão  
tipo água pedra sapo.  
Entendo bem o sotaque das águas.  
Dou respeito às coisas desimportantes  
e aos seres desimportantes.  
Prezo insetos mais que aviões.  
Prezo a velocidade  
das tartarugas mais que as dos mísseis.  
Tenho em mim esse atraso de nascença.  
Eu fui aparelhado  
para gostar de passarinhos.  
Tenho abundância de ser feliz por isso.  
Meu quintal é maior do que o mundo.  
Sou um apanhador de desperdícios:  
Amo os restos  
como as boas moscas.  
Queria que a minha voz tivesse um formato de canto.  
Porque eu não sou da informática:  
eu sou da invencionática.  
Só uso a palavra para compor os meus silêncios.”

Manoel de Barros

## RESUMO

PRESSINOTTI, L. N. **Influência da temperatura na cicatrização do tegumento de jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802)**. 2014. f88. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os estudos de restituição tecidual em reptéis são frequentes em lagartos e menos frequentes em serpentes, por sua vez, em crocodilianos, há apenas uma rara coleção de relatos de casos. Os crocodilianos são um grupo consolidado, constituído por animais morfológicamente adaptados a vida aquática e sob forte influência da temperatura do ambiente. Em condições de cultivo, na zootecnia, são frequentes as mutilações de apêndices inteiros, ou mesmo a formação de feridas. Nesse sentido, há a necessidade de compreender como a temperatura interfere nas respostas de restituição tecidual desses organismos. Foram estudados 16 jacarés *Caiman yacare* submetidos à retirada cirúrgica de um osteodermo e mantidos sob 23 °C e 33 °C, 8 jacarés em cada temperatura. Posteriormente, os jacarés tinham suas lesões fotografadas para análise macroscópica e, para análise microscópica, 2 jacarés eram abatidos e suas cicatrizes fixadas nos prazos de 3, 7, 15 e 30 dias. As amostras foram processadas para microscopia e coradas para histoquímica e imunohistoquímica. Macroscopicamente foi observada a manutenção do coágulo até 30 dias sob a temperatura de 23 °C, enquanto a cicatriz já estava reepitelizada sob 33 °C. Microscopicamente foi observado o atraso da migração da epiderme, escassez de fibras na derme e novos vasos sob a temperatura de 23 °C. Apesar dos jacarés terem se mantido totalmente viáveis em ambas as temperaturas até os 30 dias estudados, recomendamos o isolamento dos animais mutilados em tanque com controle de temperatura para acelerar o fechamento epidérmico.

**Palavras chave:** Temperatura. Crocodiliano. Inflamação. Regeneração. Pele.

## ABSTRACT

PRESSINOTTI, L. N. **Influence of temperature on the wound healing of the integument of the jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1801)**. 2014. f88. Ph. D. Thesis (Cell and Tissue Biology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Studies of tissue healing in reptiles are common in lizards and less frequent in snakes. In crocodylians, there are only a rare collection of case reports. Crocodylians are a consolidated group, consisting of morphologically adapted animals to aquatic life and strongly influenced by environmental temperature. In husbandry conditions, there are frequent mutilations of entire appendages, or even the formation of wounds. In this sense, it is necessary to understand how temperature affects the responses of tissue restitution of these organisms. For that 16 *Caiman yacare* were submitted to surgical removal of an osteoderm and kept at 23 °C and 33 °C, 8 caiman at each temperature. Subsequently, the caimans had their injuries photographed for macroscopic analysis. For microscopic analysis, 2 alligators of each treatment had their scars fixed at 3, 7, 15 and 30 days after surgery. The samples were processed for microscopy and stained for histochemistry and immunohistochemistry. Macroscopically, the clot was maintained until 30 days under temperature of 23 °C, while the scar had been re-epithelized under 33 °C. Microscopically, it was observed the delay of epidermis migration, lack of fibers and new vessels in dermis under 23 °C. Despite the caimans have remained fully viable at both temperatures up to 30 days, we recommend the isolation of mutilated animals in a tank with controlled temperature to accelerate epidermal closure.

**Keywords:** Temperature. Crocodylians. Inflammation. Regeneration. Skin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica de <i>C. yacare</i> . .....	30
Figura 2 – Gráficos de dispersão que correlaciona o tamanho relativo da lesão (Y) com os dias em que as medições foram executadas (X). .....	38
Figura 3 – Gráfico de dispersão correlacionando o tamanho relativo da lesão (Y) após 24 horas com o tamanho absoluto da lesão (X).....	39
Figura 4 - Prancha contendo duas séries de fotografias do processo cicatricial no dorso do jacaré em 0 hora, 7 dias e 30 dias.....	40
Figura 5 - Prancha contendo duas séries de fotografias do processo cicatricial no ventre do jacaré em 0 hora, 7 dias e 30 dias.....	40
Figura 6 - Lesão com 100 dias de cicatrização no dorso e no ventre do jacaré respectivamente.....	41
Figura 7 - Prancha contendo 3 fotomicrografias de pele dorsal íntegra de <i>C. yacare</i> . .....	42
Figura 8 - Prancha com 4 fotomicrografias da cicatriz dorsal após 3 dias de cicatrização sob temperatura média de 33 °C .....	45
Figura 9 - Prancha com 3 fotomicrografias da lesão após 7 dias de cicatrização sob temperatura de 33 °C.....	47
Figura 10 - Prancha com 4 fotomicrografias da lesão após 15 dias de cicatrização sob 33 °C. ....	49
Figura 11 - Prancha com 4 fotomicrografias da lesão com 30 dias de cicatrização sob 33 °C. ....	51
Figura 12 - Prancha com 2 eletromicrografias da cicatriz após 30 dias sob 33 °C. ..	52
Figura 13 - Prancha com 3 fotomicrografias da lesão com 3 dias de cicatrização sob 23 °C.....	53
Figura 14 - Segunda prancha com 3 fotomicrografias da lesão com 3 dias de cicatrização sob 23 °C.....	54
Figura 15 – Prancha com 3 fotomicrografias da lesão com 7 dias de cicatrização sob 23 °C.....	56
Figura 16 - Prancha com 3 fotomicrografias da lesão após 15 dias de cicatrização sob 23 °C. ....	58
Figura 17 - Prancha com 4 eletromicrografias da lesão após 15 dias de cicatrização sob 23 °C. ....	59

Figura 18 - Prancha com 3 fotomicrografias da região da lesão após 30 dias de cicatrização sob 23 °C.....	61
Figura 19 – Segunda prancha com 3 fotomicrografias da região da lesão após 30 dias de cicatrização sob 23 °C. ....	62
Figura 20 - Prancha com duas fotomicrografias da derme de C. yacare após 30 dias de cicatrização sob a coloração de picrossirius.....	63
Figura 21 - Prancha contendo 6 fotomicrografias comparando as lesões entre as temperaturas nos prazos de 3 e 7 dias de cicatrização. ....	65
Figura 22 - Prancha contendo 6 fotomicrografias comparando as lesões entre as temperaturas nos prazos de 15 e 30 dias de cicatrização. ....	67
Figura 23 - Fotomicrografias da cicatrizações de incisões em diferentes prazos sob 22 °C e 23 °C. ....	74
Figura 24 - Esquema ilustrativo de proposta de controle de temperatura por aquecimento solar para os momentos em que as temperaturas são frias. ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela destacando as mensurações das fibras colágenas coradas pelo picrossirius das cicatrizes dos animais mantidos nas duas temperaturas por 30 dias.

.....63

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1	Restituição tecidual .....	17
2.2	Restituição tecidual em vertebrados ectotermos .....	21
2.3	Influência da temperatura na inflamação e componentes da restituição tecidual em vertebrados ectotermos .....	25
2.4	Crocilianos e o <i>Caiman yacare</i> .....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1	Local de estudo e obtenção dos animais .....	33
3.2	Procedimento experimental.....	33
3.3	Coleta e processamento das amostras .....	34
3.4	Análise dos resultados .....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Procedimento .....	37
4.2	Área e perímetro da lesão.....	37
4.3	Análises macroscópicas da lesão.....	39
4.4	Morfologia microscópica geral do processo cicatricial .....	41
4.4.1	<i>Pele dorsal íntegra</i> .....	41
4.4.2	<i>Lesão dorsal após 3 dias a 33 °C</i> .....	42
4.4.3	<i>Lesão dorsal após 7 dias a 33 °C</i> .....	46
4.4.4	<i>Lesão dorsal após 15 dias a 33 °C</i> .....	48
4.4.5	<i>Lesão dorsal após 30 dias a 33 °C</i> .....	50
4.4.6	<i>Lesão dorsal após 3 dias a 23 °C</i> .....	52
4.4.7	<i>Lesão dorsal após 7 dias a 23 °C</i> .....	55
4.4.8	<i>Lesão dorsal após 15 dias a 23 °C</i> .....	57
4.4.9	<i>Lesão dorsal após 30 dias a 23 °C</i> .....	59
4.5	Comparação entre as fibras da derme entre as temperaturas no prazo de 30 dias.....	63
4.6	Comparação das cicatrizações entre as temperaturas .....	64
5	DISCUSSÃO .....	69
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	79
	REFERÊNCIAS .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

Primeiramente a nomenclatura da espécie pode causar estranhamento aos leitores iniciantes ao assunto, pois na literatura encontramos referências a subespécie *Caiman crocodylus yacare* (Daudin, 1802) (BAMPI; COUTINHO, 2003) e a espécie *Caiman yacare* (Daudin, 1802) (MIGUEL; RODRÍGUEZ, 2000). Isso decorre de uma variação morfológica gradual entre as espécies *C. yacare* e *C. crocodylus*, sendo que as revisões mais atuais sobre o assunto sugerem que *C. yacare* é uma subespécie de *C. crocodylus* (FARIAS et al., 2013). A discussão ainda não está encerrada, e, para fins deste trabalho, seguiremos a mesma linha que a maioria, e adotaremos a nomenclatura preponderante na literatura, *C. yacare*.

O Brasil dispõe de uma fauna rica e diversa, e possui uma rígida legislação que a protege, a lei 5197/67 (BRASIL, 1967). No entanto, existe a flexibilização dessa norma desde a década de 80, sendo que há uma portaria que dispõe sobre a implantação e funcionamento de criadouro de *Caiman crocodylus yacare* na Bacia do Rio Paraguai (BRASIL, 1990). A atualização das normas vigentes consolidam as atividades voltadas para zootecnia de *Caiman yacare*, sendo que a Instrução Normativa nº 169 (BRASIL, 2008) versa sobre as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro. Sendo assim, cabe destacar que a atividade de criação de crocodilianos para fins comerciais soma atualmente mais de 20 anos de história, e mesmo assim, são poucas as cooperações entre pesquisadores e criadores que visam aprimorar o conhecimento sobre esses crocodilianos.

Mesmo somados mais de 20 anos de experiência no ramo, as zootecnia de *Caiman yacare* não possuem diretriz ou orientação que norteie uma melhor estratégia para o cultivo dessa espécie. Sendo assim, observa-se uma diversidade de arquiteturas e estratégias de manejo, por vezes questionáveis. Seria imprudente ou mesmo ingênuo acreditar que há como discutir manejo a partir da ciência básica. No entanto, a mesma se faz necessária por falta dos conhecimentos básicos sobre essa espécie.

Dentre as condições encontradas nos criatórios, destaca-se a frequente mutilação de dedos e extremidades de caudas dos espécimes, assim como a



tolerância desses animais diante das lesões, visto que os mesmos cicatrizavam em condições sem assepsia.

Além disso, *C. yacare* é animal ectotermo (termoconformador), ou seja, suas competências fisiológicas podem ser influenciadas pela temperatura do ambiente. Sendo assim, é necessário descrever como a baixa temperatura influencia o processo de cicatrização.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Numa perspectiva mecanicista, pode-se dizer que as células envolvidas no processo de restituição tecidual respondem a sinalização mediada por moléculas existentes em microambiente adequado, ou mesmo pela interação célula-célula diretamente. Nesse sentido, existe um rebuscado mecanismo de regulação celular para o reparo das injúrias. A revisão pormenorizada de todos esses mecanismos torna-se um desafio sobre-humano, visto que o grau de detalhamento das descobertas obriga o pesquisador a se especializar em apenas um dos fenômenos que colaboram na restituição tecidual. Nesse sentido, utilizando as bibliografias atuais, serão destacadas algumas moléculas, referenciadas pela literatura, que intermediam processos como angiogênese, reepitelização e diminuição da área da lesão, sendo esses, partes do processo de restituição tecidual.

Além de abordarmos o processo de restituição tecidual como um todo, faz-se necessário desmembrar a restituição tecidual em vertebrados ectotermos, visto que são organismos evolutivamente distantes de mamíferos que possuem morfologia e fisiologia peculiares a cada grupo.

Num momento posterior, torna-se necessário verificar qual a influência da temperatura nos processos inflamatórios e de restituição tecidual, visto que vertebrados ectotermos são mais susceptíveis a temperatura externa.

Por fim, cabe rever os conhecimentos atuais sobre crocodilianos, em especial o *C. yacare*, visto que o trabalho almeja subsidiar conhecimento para melhoria das condições zootécnicas da espécie.

### 2.1 Restituição tecidual

Inicialmente é necessário apresentar algumas das dificuldades quanto à tradução dos termos técnicos da nomenclatura internacional. O termo *wound healing* (GUERRA et al., 2008) é por vezes traduzido como cicatrização, no entanto, existe na literatura a expressão *scar free wound healing* (DELORME, 2011), o qual seria traduzido como cicatrização sem cicatriz. Nesse sentido, a segunda tradução é um paradoxo, e para solucionar tal paradoxo adotaremos a tradução de *scar free wound healing* como solução de feridas sem a formação de cicatriz, enquanto *wound healing* obedecerá a literatura vigente, e será adotado o termo cicatrização. Além

disso, é frequente o uso do termo regeneração como restituição de apêndices ou partes inteiras do mesmo, sendo a cicatrização apenas a primeira etapa do processo de regeneração (MCLEAN; VICKARYOUS, 2011). Portanto, nos momentos que nos referirmos indistintamente aos processos de cicatrização e regeneração adotaremos a expressão restituição tecidual.

A cicatrização é um fenômeno que abrange as fases de inflamação, formação de novos tecidos (proliferativa) e remodelamento (GURTNER et al., 2008; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A primeira etapa, inflamação, inicia-se com a hemostasia, promovida pela cascata de coagulação e agregação de plaquetas. Paralelamente, neutrófilos são recrutados para a região em virtude do desencadeamento das cascatas do complemento, desgranulação das plaquetas e degradação bacteriana. Posteriormente são recrutados monócitos para a região da injúria, onde os mesmos se transformam em macrófagos (GURTNER et al., 2008; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Entre os fatores de coagulação que atuam durante a hemostasia há o Fator VIII (FVIII) coagulante, carregado por uma macromolécula de aproximadamente 250 KDa chamada Fator de von Willebrand (vWF). A clonagem do gene para vWF (*Vwf*), do cDNA e redesenho da molécula permitiu a identificação de diferentes causas para a doença de von Willebrand (vWD). Dessa forma há um esforço para aferir as variações da vWD, a qual confere susceptibilidade à hemorragias ao seu portador. Paralelamente a todo esse esforço voltado para a atividade classicamente conhecida do vWF, como carreador do FVIII, verificou-se que o vWF também apresenta atividade mitogênica em musculatura lisa na túnica média de vasos, induz apoptose em plaquetas e células tumorais, é antiangiogênico em certas circunstâncias, apresenta atividade proinflamatória em algumas circunstâncias (LENTING et al., 2012; RAUCH et al., 2013).

O vWF é produzido por megacariócitos e células endoteliais, sendo que essas células são marcadas quando utilizadas técnicas de imunohistoquímica (RAUCH et al., 2013).

Além da fase de inflamação, durante a restituição tecidual, inicia-se a fase proliferativa. Nessa fase é caracterizada a migração de queratinócitos sobre a lesão, angiogênese, e reposição da matriz extracelular (GURTNER et al., 2008; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Muitos reguladores impactam a habilidade migratória dos queratinócitos para a reepitelização de lesões. Há precisão espaço temporal na atividade desses reguladores. Dentre os reguladores mais estudados cabem destacar os mecanismos de adesão celular por desmossomos, hemidesmossomos e integrinas, expressão de queratinas, papel dos fatores de crescimento, citosinas, quimiocinas, eicosanoides, tensão de oxigênio, peptídeos antimicrobianos, e metaloproteinases da matriz. Menos frequentes são os estudos da influência do campo elétrico através de receptores de acetilcolina e beta adrenérgicos (RAJA; GARCIA; ISSEROFF, 2007).

Dentro do escopo do trabalho, deve ser dedicada uma breve revisão sobre o papel da queratina durante a migração da epiderme. A queratina é o filamento intermediário predominante da epiderme, consagrado como responsável pela resistência e coesão dos queratinócitos. Em mamíferos, o peso molecular pode variar de 40 a 70 KDa dependendo do tipo de queratina, sendo que cada tipo de queratina possui propriedades diferentes e são distribuídas espaço temporalmente conforme a necessidade do organismo (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009). Sabe-se que o tipo de queratina na camada basal (K5 e K14) e superiores (K1 e K10) da epiderme íntegra se alteram na epiderme em cicatrização, expressando queratinas K6, 16 e 17. Atribui-se que essa mudança no perfil de expressão de queratinas permite maior fluidez celular e consequente deformação para migração dos queratinócitos (RAJA; GARCIA; ISSEROFF, 2007). Recentemente essa proposta foi corroborada (SELTMANN et al., 2013). A citocina e fatores de crescimento que preponderam na região da lesão e que podem interferir no padrão de expressão das queratinas são a interleucina-1 (IL-1), fator de crescimento da epiderme (EGF) e fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (RAJA; GARCIA; ISSEROFF, 2007).

Quanto a angiogênese, dentre os principais fatores de crescimentos estimuladores da angiogênese, são destacáveis o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos 1 e 2 (FGF1 e FGF2) (MENDONÇA, 2009; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000; WERNER; GROSE, 2003), Além desses fatores de crescimento, há a contribuição significativa dos produtos dos mastócitos, como a tryptase, e uma delicada interação entre matriz extracelular e reconhecimento da mesma pelo endotélio vascular (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

A família VEGF inclui atualmente o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fator de crescimento placentário (PLGF). O VEGF interage com

receptores transmembrana presente em células endoteliais, com atividade tirosina quinase, havendo pelo menos três tipos de receptores para VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (MENDONÇA, 2009; WERNER; GROSE, 2003). Além desses receptores há ligante não enzimático do tipo proteoglicana ricos em heparan sulfato. Como resultado da ligação desses receptores com os membros da família do VEGF foi verificado aumento da vida celular (efeito antiapoptótico), proliferação e migração endotelial. Foi caracterizado especificidade de ligação entre VEGF e seus receptores: o VEGF-A liga-se ao VEGFR-1 e 2, o VEGF-B liga-se ao VEGFR-1, VEGF-C liga-se ao VEGFR-2 e 3, o VEGF-D liga-se ao VEGFR-3, o VEGF-E liga-se ao VEGFR-2, e o PLGF liga-se ao VEGFR-1. Atribui-se a atividade de VEGFR-1 e 2 à angiogênese hemal, enquanto que o VEGFR-3 está envolvido com a linfangiogênese (MENDONÇA, 2009).

Muitos tipos diferentes de células produzem VEGF, como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e queratinócitos, sendo, essas duas últimas consideradas as principais produtoras durante a restituição tecidual (MENDONÇA, 2009).

Os FGFs são uma família de proteínas consagradas por estimular o crescimento de fibroblastos em cultura, porém seus efeitos não são restritos aos fibroblastos. O FGF-1 e o FGF-2 são aquelas preferencialmente consideradas em discussões sobre angiogênese. São polipeptídios com aproximadamente 18 KDa que transmitem sinal via 4 receptores específicos de alta afinidade (FGFR-1 a FGFR-4). Os receptores pertencem à família das proteínas tirosina quinase. Além disso, o FGF-1 e 2 se aderem fortemente a glicosaminoglicanas heparan sulfato presente na matriz, permitindo que a mesma atue como reserva dessa molécula, além de restringir a dispersão da mesma. O FGF-1 e 2 exerce função antiapoptótica, mitogênica e estimula a migração endotelial (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; WERNER; GROSE, 2003).

Credita-se aos FGF-1 e 2 estímulos frente às injúrias teciduais, ação plaquetária e formação de fibrina, enquanto que o VEGF protagonizaria em momentos mais tardios, como durante a formação do tecido de granulação (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000)

Tardiamente na fase proliferativa há a formação de tecido de granulação, onde fibroblastos das margens das feridas, ou mesmo oriundos de células tronco, migram e sintetizam colágeno. Muitos desses fibroblastos são estimulados a se transformarem em miofibroblastos contráteis, e dessa forma causam a retração da

lesão (GURTNER et al., 2008).

A fase de remodelamento consiste na diminuição gradual até a parada das atividades anteriores na tentativa de retomar a homeostase. Durante esse estágio, a maioria dos macrófagos e miofibroblastos entram em apoptose, restando um predomínio de matriz extracelular e poucas células. Em períodos maiores (de 6 a 12 meses) observa-se a substituição gradual das fibras colágenas da derme, onde o predomínio por colágeno III é gradualmente substituído por colágeno I (GURTNER et al., 2008).

As principais citocinas envolvidas nessa fase são: fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) produzidas pelos fibroblastos, além do EGF e TGF- $\beta$  produzidos pelos queratinócitos (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

## **2.2 Restituição tecidual em vertebrados ectotermos**

A primeira fase do processo de restituição tecidual é a fase inflamatória. Nesse sentido faz-se necessário diferenciar a hematologia de mamíferos e vertebrados ectotermos. Em todos os vertebrados há elementos com funções equivalentes como eritrócitos, leucócitos e células que exercem funções de homeostasia. Os eritrócitos de vertebrados não mamíferos, em geral, são nucleados e ovais. Entre os leucócitos de répteis, destaca-se o heterófilo, que é um granulócito acidófilo e exerce função semelhante ao neutrófilo, e no lugar de plaquetas existem os trombócitos (CLAVER; QUAGLIA, 2009).

Os leucócitos diferem entre os grupos zoológicos, não apenas na morfologia, mas também na composição bioquímica e frequência no sangue periférico. Nesse sentido, há duas formas básicas para classificar os tipos leucocitários em vertebrados não mamíferos: pela bioquímica celular, utilizando técnicas clássicas como fosfatase alcalina, fosfatase ácida, peroxidase, PAS e Sudan Black (GOULARD, 2004), ou pela morfologia celular (CLAVER; QUAGLIA, 2009). Por vezes, há discordância quanto à nomenclatura. Dentre os leucócitos em répteis, discute-se quanto a nomenclatura do azurófilo, célula exclusiva deste grupo, morfológicamente distinta por ser pequena com citoplasma relativamente mais abundante, levemente basófilo e de granulação azurofílica (CLAVER; QUAGLIA, 2009). Revisões sobre o assunto permitem dizer que os azurófilos são variações

morfológicas de monócitos em quelônios, crocodilianos e lagartos sendo positivos para fosfatase ácida e negativos para peroxidase e sudan black B (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011), enquanto que em serpentes os azurófilos são uma linhagem celular específica com atividade bioquímica semelhante a neutrófilos (positivos para PAS, sudan black B e peroxidase) (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; SYKES; KLAPHAKE, 2008). A discussão ainda não está totalmente elucidada, e, para fins deste trabalho, os azurófilos serão considerados variações de monócitos.

Outro leucócito bastante característico de répteis são os heterófilos. Tais células possuem granulação acidófila, e são facilmente distinguíveis em crocodilianos e quelônios por possuírem granulação elíptica, enquanto os eosinófilos apresentam granulação acidófila esférica (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011).

Os trombócitos são células nucleadas de formato oval e vacuolização citoplasmática que garante contorno celular sinuoso. São células que exercem função equivalente às plaquetas (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011).

Geralmente os estudos de regeneração em caudas de lagartos discutem as relações evolutivas quanto ao custo da autotomia e regeneração da cauda, frente aos benefícios (MCLEAN; VICKARYOUS, 2011). A eficiência regenerativa dos lagartos torna-se menor quando comparados às salamandras, pois as mesmas podem regenerar inclusive membros inteiros. Entende-se que a amputação de membros em lagartos possui um valor de seleção tão drástico que impede a viabilidade do amputado em ambiente natural, diferentemente da amputação de cauda, permitindo a evolução de mecanismos regenerativos para cauda e justificando a ausência dos mesmos para os membros. Algumas características observadas em salamandras parecem conferir maior capacidade regenerativa aos apêndices, como maior inervação e cobertura epitelial muito rápida (ALIBARDI, 2010).

Recentemente, estudos sobre regeneração da cauda de lagartos como modelo biomédico tem se tornado mais frequente na literatura. Isso porque os lagartos são amniotos bastante derivados, e que mantiveram a capacidade regenerativa em pelo menos um apêndice, a cauda.

Em lagartos *Eublepharis macularius* já foi verificado que a regeneração da cauda autotomizada, ou amputada artificialmente, apresentam basicamente o mesmo processo de regeneração, ou seja, a zona de autotomia pouco influenciou no

processo (DELORME; LUNGU; VICKARYOUS, 2012; DELORME, 2011). Além disso, a imunohistoquímica de TGF- $\beta$  durante a regeneração da cauda demonstrou maior expressão da proteína na epiderme principalmente em estágios tardios de regeneração (GILBERT; VICKARYOUS; VILORIA-PETIT, 2013; GILBERT, 2013). Ainda nesse modelo, estudos envolvendo citocinas e proteínas de matriz extracelular mediadoras de angiogênese discutem quanto à necessidade da angiogênese para a restituição tecidual, e, apesar do forte indicio da necessidade de novos vasos para uma regeneração mais eficiente, os estudos não foram conclusivos (PAYNE, 2012). Outro estudo recente nesse modelo verificou que a expressão de Sox9, proteína classicamente correlacionada com condrogênese, ocorre tardiamente durante a regeneração, mesmo após o início da produção de tecido cartilaginoso ao longo da regeneração da cauda (MCLEAN; VICKARYOUS, 2011).

Alguns outros modelos estudados são: a regeneração da cauda de lagartos europeus do gênero *Podarcis* sp., no qual foi verificado a presença de queratinas K6, 16 e 17 nos queratinócitos da epiderme recém restituída (ALIBARDI; TONI, 2005); em *Lampropholis guichenoti* foi observado que FGF-1 e 2 participaram principalmente da regeneração de nervos, gânglios, componentes da medula, epiderme e músculos, enquanto não foi detectada marcação do blastema pelo FGF-2 (ALIBARDI; LOVICU, 2010); em lagartos americanos *Anolis carolinensis* foi verificado que a musculatura, a estrutura óssea das vértebras e a organização do tecido nervoso reproduzem apenas parcialmente a cauda original (FISHER et al., 2012). *Anolis carolinensis* pode ser um modelo promissor para as ciências biomédicas, visto o recente sequenciamento do genoma dessa espécie (ALFÖLDI et al., 2011).

Extensas revisões sobre o assunto descrevem a regeneração em lagartos com enfoque histológico, histoquímico, bioquímico e imunohistoquímico, revelando respectivamente a sequência morfológica dos processos, e a localização/intensidade de participação de moléculas específicas (ALIBARDI, 2010, 2014). Cabe destacar que a regeneração em lagartos, uma antiga área de pesquisas, voltou a chamar a atenção da comunidade científica, com grande volume de publicações recentes. Esse fenômeno coincide com as afirmações quanto à necessidade de procurarmos novos modelos biomédicos (BOLKER, 2012).

Em crocodilianos, destaca-se a capacidade regenerativa parcial da cauda e



mandíbula. Os segmentos vertebrais, de uma cauda em regeneração de crocodilianos, são substituídos por uma ossificação endocondral na forma de bastão retilíneo e não articulável. A pele desse mesmo segmento não reproduz a organização original, sem osteodermos, mantendo apenas uma pigmentação semelhante a original (ALIBARDI, 2010). Há pelo menos um relato formal de regeneração de cauda de *C. crocodilus* na literatura específica, e o mesmo está de acordo com a descrição acima (VOIGT, 2008).

Em lagartos, recentemente destacou-se a relação intrínseca entre inflamação e regeneração, sendo que a perpetuação de processos inflamatórios pode culminar no recrutamento de maior número de linfócitos, e concomitantemente, impedir a regeneração da cauda em lagartos (ALIBARDI, 2014). Nesse sentido cabe destacar o estudo de inflamação em *Alligator mississippiensis*, que revelou rápida resposta inflamatória sob 25 °C. No entanto, existe a lacuna quanto ao entendimento dessa resposta inflamatória em outras temperaturas (MATEO; ROBERTS; ENRIGHT, 1984).

Cabe destacar que na literatura é recorrente a afirmação de que são poucas as informações sobre regeneração em crocodilianos, e que esses processos precisam ser mais bem estudados para esse grupo (ALIBARDI, 2010). Isso porque esses animais apresentam alta tolerância a ambientes contaminados, apresentando potencial de cicatrização mesmo frente a situações estressoras intensas, podendo revelar boas estratégias para resolução de feridas e servindo assim como novo modelo (SALCIDO, 2008).

Além dos lagartos e dos crocodilianos há também estudos em serpentes *Thamnophis sirtalis* que constataram que lesões paralelas às linhas de força do corpo possuem melhor cicatrização (SMITH; BARKER, 1988). E experimentos de cicatrização em serpentes *Nerodia sipedon* apresentaram preponderância da influência da genética parental ao invés da influência de contaminantes ambientais (HOPKINS et al., 2013).

Os reptéis destacados são amniotos ectotérmicos, no entanto há uma grande densidade de estudos de regeneração em peixes. Nesses organismos existem diversos trabalhos que usam a cicatrização como modelo experimental para aferição da eficácia de tratamentos como: a suplementação da ração do pacú (*Piaractus mesopotamicus*) com vitamina C que permitiu hiperplasia de células mucosas, aumento da angiogênese e melhora na produção e organização das fibras

colágenas (MORAES et al., 2003); a suplementação com vitamina E na ração de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) melhorou a capacidade cicatricial nessa espécie pelo incremento em células inflamatórias e deposição de tecido de granulação no foco da injúria (IWASHITA, 2008); e a cicatrização entre trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) triplóides e diplóides, no qual se constatou uma regeneração mais rápida em trutas triplóides devido ao aumento no tamanho individual das células (ALONSO et al., 2000). Visto isso, experimentos de cicatrização permitem aferir quanto ao efeito da temperatura em diversos processos teciduais em jacarés-do-pantanal.

Cabe ainda mencionar os estudos iniciais de nosso grupo de pesquisas sobre temperatura e cicatrização utilizando peixes como modelo. O peixe antártico *Notothenia coriiceps* apresentou reparo tecidual incompleto, fenômeno possivelmente ligado à baixa temperatura em que o organismo ectotérmico vivia (0 °C) (CUNHA DA SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2004). No bagre africano *Clarias gariepinus* houve cicatrização mais rápida, porém, mesmo o peixe vivendo em altas temperaturas, ainda havia a formação de uma cicatriz (GUERRA et al., 2008). Por fim, o curimatá revelou um potencial de cicatrização competente para a restauração inclusive das escamas (BOLONHA, 2003).

### **2.3 Influência da temperatura na inflamação e componentes da restituição tecidual em vertebrados ectotermos**

A geração de calor para manutenção da temperatura corporal dos animais pode ser classificada em ectotermos, animais que tem como principal fonte de calor o ambiente, e endotermos, animais que tem como principal fonte de calor o metabolismo do organismo. Quanto a estabilidade dessa temperatura durante períodos diários ou sazonais, os animais também podem ser classificados como homeotermos, capazes de manter sua temperatura estável, ou heterotermos, incapazes de manter a temperatura constante (SCHMIDT-NIELSEN, 1997). Os crocodilianos são animais que termoregulam comportamentalmente durante o dia e termoconformam durante a noite, apresentando um perfil ectotermo heterotermo, com temperaturas corporais mais altas no final da tarde e mais baixas no início da manhã (BASSETTI et al., 2014).

Os répteis apresentam uma zona ótima de temperatura preferencial, podendo

essa flutuar ao longo do ano conforme a estação e frente a mudanças sazonais do ambiente. Nos extremos da curva de conforto térmico existe a temperatura mínima e máxima crítica para a manutenção da vida, nessas temperaturas são observadas alterações metabólicas e comportamentais dos indivíduos, como jejum prolongado e letargia (JACOBSON, 2007).

Poucos estudos abordam o efeito da temperatura na cicatrização e regeneração em amniotos ectotérmicos. Como a cicatrização em serpentes *Thamnophis sirtalis*, que se mostrou mais competente a 30 °C desde que garantidas às exigências nutricionais das cobras (SMITH; BARKER; ALLEN, 1988). Existe ainda uma correlação direta entre alongamento da cauda em regeneração e temperatura nas diferentes espécies de lagartos (*Podarcis sicula*, *Lampropholis delicata*, *Leiopisma nigriplantare* e *Hoplodactylus maculatum*) (ALIBARDI, 2010). Em virtude da afirmação que a fase inflamatória da cicatrização interfere diretamente no processo, cabe destacar como a temperatura interfere nos diferentes componentes da inflamação em crocodilianos.

Nesse sentido, foi demonstrado que *Alligator mississippiensis* desafiados com LPS assumem um comportamento de procura por microambientes que garantam temperaturas maiores, e esse tipo de comportamento foi assumido como um tipo de febre comportamental (MERCHANT et al., 2007).

A imunidade inata humoral é mais bem investigada dentre os crocodilianos. Em *Alligator mississippiensis*, a ação da via alternativa do sistema complemento, assim como da atividade amebicida do soro tem temperatura ótima entre 20 e 30 °C (MERCHANT et al., 2004, 2005), enquanto que a ação da fosfolipase A2 dessa mesma espécie possui maior atividade entre 30 e 40 °C (MERCHANT; HEARD; MONROE, 2009). A atividade do complemento de *Crocodylus porosus* e *Crocodylus johnstoni* possui temperatura ótima entre 25 e 35 °C (MERCHANT; BRITTON, 2006).

Cabe ressaltar que as extremidades dos jacarés, como a cauda, possuem temperaturas corporais médias menores que nos porções mais centrais do tronco, uma vez que a troca de temperatura é favorecida pela razão entre superfície e volume corporal (SANTOS, 2006). Modelagens matemáticas tentam aferir em quais dimensões de massa corporal existe maior variação de temperatura ao longo de um dia, sendo que as maiores variações parecem acontecer em animais com massa de até 1 Kg (STEVENSON, 1985).

Além dos estudos em crocodilianos cabe destacar que lagartos *Hemidactylus*

*flaviviridis* apresentam temperatura ótima para fagocitose e hematopoese em 25 °C (MONDAL; RAI, 2001). A atividade dos leucócitos de *Rana pipiens* diminui quando em 5 °C, no entanto, há aumento no número de neutrófilos quando mantidas a frio e, por fim, existe uma compensação da atividade do complemento quando a rã retorna de 5 °C para 22 °C (MANIERO; CAREY, 1997). Efeitos compensatórios frente ao retorno de baixas temperaturas para temperaturas maiores são bem conhecidos em peixes como o pacu, os quais são submetidos a ciclos alternados de jejum e realimentação para promover um crescimento mais ágil da carcaça quando realimentados, e diminuindo os gastos com a ração em períodos de inverno (SOUZA et al., 2002; WICKI; ROSSI; LUCHINI, 2003). Em anfíbios *Rana catesbeiana* desafiados com carragenina e fio de sutura, e mantidas em 6 e 24 °C, a baixa temperatura não influenciou no tamanho da área inflamada, diminuindo apenas o número de células inflamatórias que migraram para o local nos animais mantidos em 6 °C (CATÃO-DIAS; SINHORINI, 1999).

A temperatura de aclimação interfere diretamente na forma como os leucócitos reagem frente à variação de temperatura. As atividades de macrófagos de anfíbios (*Salamandra salamandra* e *Bufo bufo*) e peixes (*Cyprinus carpio* e *Carassus auratus*) desafiados em diferentes temperaturas revelaram que a aclimação em baixa temperatura “adaptou” as atividades dos macrófagos às menores temperaturas experimentais, havendo certa equivalência quanto a essas atividades dos macrófagos dos animais aclimatados e não aclimatados em temperaturas maiores (PXYTYCZ; JÓZKOWICZ, 1994). A avaliação da ação da aclimação na capacidade migratória de queratinócitos epiteliais de 4 espécies de peixes (*Gillichthys mirabilis*, *Amphiprion percula*, *Cyprinodon aslinus*, *Trematomus bernacchii*) também sugere influência da aclimação na atividade do citoesqueleto e receptores de membrana, havendo diferença na resposta migratória quando cruzadas a temperatura de aclimação e temperatura de experimentação (REAM; THERIOT; SOMERO, 2003). A expressão gênica do bacalhau do atlântico é alterada durante a aclimação em diferentes temperaturas, revelando certa capacidade “adaptativa” dos organismos frente a variação ambiental, revelando uma certa plasticidade metabólica (PÉREZ-CASANOVA et al., 2008). Nesse sentido, organismos de latitudes diferentes podem variar em termos de respostas fisiológicas quando submetidos a temperaturas diferentes a qual está aclimatado, como visto no estudo de aclimação realizado com *Eremias ssp.*, em que a preferência térmica foi

alterada em virtude da aclimação (LI et al., 2009).

## 2.4 Crocodilianos e o *Caiman yacare*

Existem muitas diferenças dentre os animais considerados equivocadamente como répteis, pois se trata de um grupo artificial e polifilético. Dentre as diferenças dos crocodilianos com relação aos demais répteis deve-se ressaltar: o coração de quatro câmaras, forame de Panizza no tronco aórtico, válvula dentada e anastomose entre arcos aórticos (AXELSSON; FRANKLIN, 1997), o pseudodiafragma, a presença de um extenso palato duro, membrana nictitante nos olhos, achatamento latero-lateral da cauda para natação, e a constituição do tegumento contendo armadura mineralizada de osteodermos no sentido dorso-ventral (JACOBSON, 2007; SARKIS-GONÇALVES; CASTRO; VERDADE, 2002).

Osteodermos são estruturas mineralizadas com perióstio pouco definido e endóstio melhor constituído. O osteodermo tem sua mineralização a partir das próprias fibras colágenas, sem a produção de um osteóide prévio, o que afere uma morfologia ramificada à estrutura mineralizada. A mineralização ocorre tardiamente durante o desenvolvimento, quando o comprimento focinho cloaca é de 175 mm (VICKARYOUS; HALL, 2008).

Estudos com microscopia eletrônica de varredura de osteodermos de *C. yacare* mantidos em três sistemas de produção diferentes revelaram que quanto maior a incidência solar na pele, maior é a mineralização dos osteodermos, isso devido à relação entre mineralização e vitaminas A e D, mais abundantes nas partes irradiadas pelo sol (JACINTO et al., 2008).

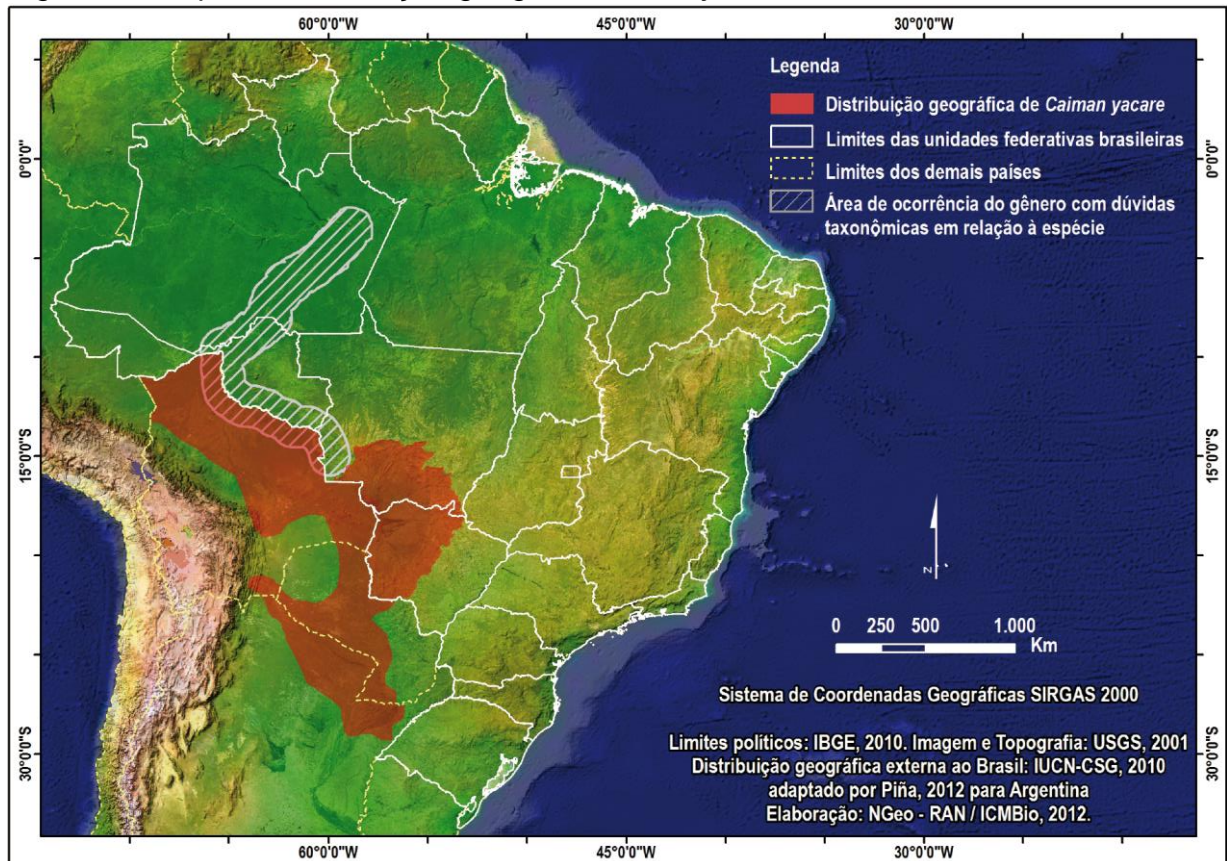
O *C. yacare* apresenta temperatura ótima para o desenvolvimento embrionário e ganho de peso entre 32 a 34 °C (MIRANDA et al., 2002), além disso, estudos comportamentais revelaram temperatura ótima preferencial nessa mesma faixa (CAMPOS; COUTINHO; MAGNUSSON, 2003; PINHEIRO; ANDREOTTI E SILVA; SANTOS, 2001). Podendo até mesmo estar quando submetidos a baixas temperaturas (CAMPOS; COUTINHO; MAGNUSSON, 2004). A temperatura corporal do *C. yacare* durante os meses de frio variou as médias mensais de 23,8 a 28,3 °C (CAMPOS; COUTINHO; MAGNUSSON, 2005).

*Caiman yacare* e *Caiman latirostris* apresentam valores hematológicos inferiores para a série eritrocítica durante o inverno (MUSSART; FIORANELLI;

BARBOZA, 2007). E mesmo a temperatura influenciando diversos processos fisiológicos, não foi verificada correlação entre crescimento e temperatura nos *C. yacare* presentes na natureza (CAMPOS et al., 2014). A temperatura influencia também a definição do sexo dos animais, sendo que ovos mantidos em médias maiores que 31,5 °C preponderam machos, enquanto em temperaturas menores que essas preponderam fêmeas (FARIAS et al., 2013). E, ainda quanto à temperatura, afirma-se que o comportamento de buscar a água está relacionado com termorregulação, visto que esses animais carecem de glândulas na pele, sendo assim, tradicionalmente, afirmam que os jacarés resfriariam seus corpos entrando na água, entretanto, pesquisas recentes demonstram que esse hábito deve ser prevalentemente influenciado por outras variáveis que não somente a temperatura, como comunicação social ou alimentação (CAMPOS; MAGNUSSON, 2011).

A população de *C. yacare* é uma das mais vigorosas dentre os crocodilianos, sendo que o número de indivíduos extrapola a casa dos milhões, sendo sua distribuição na região do pantanal brasileiro, sudeste da Bolívia, leste do Paraguai, e nordeste da Argentina (Figura 1). A espécie é considerada de baixo risco de extinção. Dentre as pressões atuais para a manutenção da população cabe listar: ocupação humana sem planejamento, degradação de áreas naturais e caça ilegal (FARIAS et al., 2013). Nesse sentido, o cultivo de *C. yacare*, dentro de padrões de responsabilidade, pode diversificar a economia e diminuir a pressão sobre a espécie.

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica de *C. yacare*.



Fonte: (FARIAS et al., 2013)

Existem três formas de manejo de crocodilianos: manejo silvestre (*Harvesting*), atividade que compreende a aferição periódica da população de jacarés, e, mediante as autorizações prévias, os animais podem ser retirados da natureza para comercialização; criação com coleta de ovos na natureza (*Ranching*), mediante a aferições do número de fêmeas e postura de ovos são liberadas autorizações para coleta de ovos ou filhotes, e, posteriormente os animais são mantidos em condições de cultivo até o abate; ciclo fechado (*Farming*), a postura de ovos e manutenção dos animais em condições de cultivo ocorre integralmente dentro das fazendas (CAMPOS; MOURÃO; COUTINHO, 2005; VERDADE, 2004). O modelo de cultivo recomendado para *C. yacare* é o *ranching*, uma diversificação das atividades econômicas, descentrando-a da agropecuária, a exemplo da criação de outras espécies silvestres como capivara, caititu e queixada (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 2000).

Os produtos tradicionalmente comercializados à partir da zootecnia de crocodilianos são a carne e o couro. O couro é historicamente apreciado no mercado internacional, porém, apresenta grandes flutuações de valor em virtude do

fornecimento inconstante (WOODWARD; DAVID; DEGNER, 1993). Atualmente, há estudos sobre o beneficiamento de partes menos nobres da carne para o preparo de hambúrgueres (FERNANDES et al., 2014), mortadelas (MORAIS et al., 2013). Quanto ao aproveitamento de subprodutos, cabe destacar os estudos que investigam o aproveitamento da gordura de jacaré como biodiesel (AYALASOMAYAJULA et al., 2012), além dos potenciais efeitos biológicos do óleo (LI et al., 2012) e aproveitamento da bile no combate de hepatocarcinoma e colangiocarcinoma (KANG et al., 2012; SONG et al., 2012). Existe ainda a especulação quanto ao aproveitamento de moléculas existentes na urina como fixador de perfumes (RIEDER et al., 2004).

Além disso, em termos de etnoconhecimento, um dos animais mais encontrados nos mercados onde se comercializa produtos da medicina tradicional são os crocodilianos *Paleosuchus palpebrosus* e *Caiman crocodilus* (ALVES; ROSA, 2010). Os relatos na medicina tradicional abrangem: o uso de gorduras frescas de *C. latirostris*, *Melanosuchus níger* e *Paleosuchus palpebrosus* para tratamentos de reumatismos (NÓBREGA ALVES; SILVA VIEIRA; SANTANA, 2008); uso de gordura fresca de *C. crocodilus* para tratamento de pneumonia (BARROS et al., 2012); o uso de gordura de *C. latirostris* como cicatrizante (SOUTO et al., 2011) ou para tratamento de asma (OLIVEIRA et al., 2010). Há trabalhos que relatam todos esses usos da gordura já mencionados, como também o uso da pele (SILVA, 2008). Além do extenso uso da gordura desses animais, cabe mencionar que a carne é consumida por populações tradicionais por se acreditar que a mesma proporcione terapêutica aos problemas listados: asma, derrame, bronquite, dor nas costas, dor de ouvido, reumatismo, trombose, impotência sexual, picada de serpentes, irritação nos olhos, sudorese, problemas oftalmológicos e dor de garganta (ALVES; OLIVEIRA; ROSA, 2013).

Na África do Sul são comercializados cosméticos derivados da gordura de *Crocodylus niloticus* a qual se atribui propriedades terapêuticas imunomoduladoras. Tal produto é comercializado pela internet sob o nome fantasia “repcillin” (REPCILLIN acessado em 13/05/2014).

Cabe mencionar ainda que os ácidos graxos de *C. yacare* em cativeiro possuem maiores concentrações de ácidos graxos monoinsaturados, enquanto que jacarés selvagens possuem maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (VICENTE-NETO et al., 2010). Ou seja, o perfil de ácidos graxos varia



conforme o manejo dos animais, podendo assim interferir nas potenciais propriedades terapêuticas esperadas.

Na hematologia de *C. yacare* cabe destacar a baixa seletividade da medula quanto a passagem de eritrócitos imaturos para o sangue periférico (MOURA; SANTOS, 2005), os leucócitos heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos já foram descritos histoquimicamente (MOURA et al., 1999) havendo também a descrição da ultraestrutura dos eosinófilos e trombócitos (DE MOURA; OLIVEIRA; EGAMI, 1997; WALDEMAR OLIVEIRA et al., 1998).

Ainda são poucos estudos encontrados sobre patologias que acometem o *C. yacare*, como a presença do parasita *Hepatozoon caimani* no sangue, (VIANA et al., 2010) e o surto de dermatite em jacarés-do-pantanal causado pela infecção por poxvírus (RAMOS et al., 2002), sendo que, certamente, existem muitas outras doenças ainda por descrever. Nesse sentido, cabe mencionar que jacarés mantidos em grandes populações em condições de cultivo estão sujeitos a infecções e surtos epizooticos, o que oferece riscos a produção, sendo necessário entender os mecanismos de resistência a infecções desses organismos.

É perceptível que os crocodilianos, assim como outros organismos ectotermos, são influenciados pela temperatura, apresentando variações fisiológicas e comportamentais. Nesse sentido, a hipótese vigente é que a temperatura influencie os processos envolvidos na cicatrização. Sendo assim, surge a interrogativa se a temperatura influencia positivamente ou negativamente o processo cicatricial, e o quanto esses processos podem interferir no cultivo do *C. yacare*.

Portanto, o objetivo desta tese é descrever macroscopicamente e microscopicamente o processo de cicatrização sob duas temperaturas diferentes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de estudo e obtenção dos animais

Todos os jacarés foram cedidos pela Cooperativa de Criação de Jacarés do Pantanal – COOCRIJAPAN, assim como a manutenção dos mesmos em experimentação foi conduzida nas instalações da mesma cooperativa. A COOCRIJAPAN é uma das poucas empresas situada em Cáceres – MT, e Cáceres é uma das cidades pertencentes ao g100, ou seja, é um dos 100 municípios com mais de oitenta mil habitantes e com as menores rendas *per capita* do Brasil (BRASIL, 2013).

Ao total, foram utilizados 20 jacarés-do-pantanal (*C. yacare*). Os jacarés possuíam de 1 ano a 1 ano e 6 meses de idade. Dentre esse total, 3 morreram por não suportar a anestesia, restando 17 jacarés considerados para a obtenção dos resultados.

#### 3.2 Procedimento experimental

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas e sob parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA do ICB USP, sob o registro nº125, folha 76, Livro 2.

Após anestesia com propofol na concentração dose de 10 mg/kg por via intravenosa caudal, o jacaré relaxava muscularmente. Posteriormente, os jacarés recebiam Cloridrato de Mepivacaína 3% como anestesia local no ponto de excisão da pele. Finalmente, cada jacaré sofria abscisão de um osteodermo na porção dorsal e ventral da cauda. Todos esses procedimentos foram acompanhados pelo médico veterinário Dr. Victor Manuel Aleixo.

Os jacarés que sofreram a retirada dos osteodermos por incisões cirúrgicas foram mantidos nos ambientes com temperaturas de  $33 \pm 2,0$  °C e  $23 \pm 2,0$  °C, mantendo 8 animais em cada tanque, restando um jacaré mantido em temperatura ambiente. Durante o período de experimentação os mesmos receberam alimento *ad libitum* uma vez ao dia com a mesma ração tradicionalmente utilizada para o cultivo, composta de miúdos bovinos (preponderantemente pulmão e baço), farinha de sangue, farinha de carne e osso, premix mineral suíno (Suigold), pó calcário e

casquinha de soja.

Os tanques em que os jacarés foram mantidos possuem área de 200 cm x 80 cm com declividade no piso para formar uma área alagada e outra seca, climatizados com a utilização de ar condicionado e aquecedor de ar dentro de uma estufa com pequena ventilação.

Todas as lesões foram fotografadas nos prazos de 0, 1, 2, 3, 7, 15 e 30 dias junto a uma escala métrica que permitiu mensurações das mesmas.

Nos prazos de 3, 7, 15 e 30 dias, 2 jacarés em cada temperatura foram abatidos para coleta das cicatrizes. Os abates foram conduzidos por dessensibilização com martelo pressurizado contendo ponta de aço INOX (CAMPOS; COUTINHO; OLIVEIRA, 2005). Esse procedimento faz parte da rotina de abate da indústria frigorífica para comercialização de carne e couro, e tal procedimento respeita as normas vigentes.

### **3.3 Coleta e processamento das amostras**

As amostras coletadas foram divididas ao meio, sendo que uma das metades foi fixada em McDowell (paraformaldeído a 4 % e glutaraldeído a 2 % em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) por 48 h em geladeira até no máximo 10 °C (MCDOWELL; TRUMP, 1976). Um quarto da lesão foi processado para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e o outro quarto foi processado em historesina (Leica Microsystems, Solms, Alemanha) para observação da morfologia sob a coloração de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

Para MET, as amostras foram pós fixadas em tetróxido de ósmio em (OsO<sub>4</sub>) 1% diluído em solução tampão Cacodilato de Sódio 0,1M. Posteriormente foram processados e inclusos em resina Spurr (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). Foram obtidos cortes semifinos com navalhas de vidro em ultramicrótomo com 1 µm de espessura que eram observados sob microscópio de luz. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante em ultramicrótomo (9LKB 500) com 60 nm de espessura e colocados em telas 200 mesh, posteriormente as telas contendo os cortes foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Depois de processados, os cortes foram observados no microscópio eletrônico de transmissão (TEM-JEOL-JEM-100 CXII) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A outra metade das amostras foi fixada em Methacarn (Metanol 60%, Clorofórmio 30% e Ac. Acético 10%) por no máximo 6 horas e posteriormente processado em paraplast para as colorações de histoquímica e imunohistoquímica.

As marcações de imunohistoquímica se deram por dois protocolos.

Protocolo 1: secções de 5 µm passam pelo desmascaramento de antígenos em solução Tampão Citrato 10 mM (pH 6.0) em panela de pressão por 15 minutos. Todas as lavagens desse protocolo foram realizadas com solução Tampão PBS-Tween (pH 7.4). Sucedeu-se as etapas de bloqueio da peroxidase com Peroxidase Block (RE-7157 Leica) por 30 minutos e bloqueio de reação inespecífica pelo Protein Block (RE7158-Leica) por 30 minutos. Foram realizadas 3 baterias de imunomarcações: anti Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (anti-PCNA monoclonal, feito em coelho, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, sc-56) para avaliação da proliferação celular; anti-Human von Willebrand Factor (polyclonal, feito em coelho, Dako, Denmark and Carpinteria, California, USA, A0082) para identificação de células endoteliais; e anti-Human VEGF-A (Polyclonal, Rabbit, Santa Cruz Biotechnology, sc-152) para verificação de uma das citocinas que influenciam a angiogenese. Os anticorpos foram diluídos em 1:100 e incubados pernoite. Por fim, a revelação foi executada por Post Primary Block (RE7159) por 30 minutos, NovoLink Polymer (RE7161-Leica) por 30 minutos e reação de precipitação com DAB por 45 segundos. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina, processadas e montadas com lamínulas. O controle negativo foi obtido pela supressão do anticorpo primário.

Protocolo 2: nesse protocolo foram utilizados anticorpos primários: anti-actina a de musculatura lisa (monoclonal, mouse, Sigma-Aldrich, 1A4) e anti-citoqueratina humana (monoclonal, mouse, Dako Biotechnology, AE1/AE3). Esse protocolo difere quanto a supressão do bloqueio pós-primário e utilização do polímero SuperPicture™ 3rd Gen IHC (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) por 30 minutos e precipitação com DAB por 5 minutos durante a revelação. O controle negativo foi obtido pela supressão do anticorpo primário.

Os mesmos blocos inclusos em paraplast foram corados pelas técnicas histoquímicas de picrossirius, para verificar a distribuição e a orientação das fibras colágenas. Lâminas com secções de 5 µm de espessura foram imersas em solução de Ácido Fosfomolibdico 2% por 1 minuto para diferenciação das fibras colágenas e coradas em solução de picrossirius por 1 hora.

Para evidenciar a região de lâmina basal foi utilizada a técnica histoquímica de coloração argéntofila para reticulina. O procedimento foi conduzido conforme protocolo de Gordon & Sweets, posteriormente a desparafinização e hidratação, se inicia o protocolo: solução de permanganato de potássio com ácido sulfúrico por 5 minutos, ácido oxálico 2 minutos, solução de sulfato de ferro III amoniacal 2 minutos, solução de nitrato de prata 2 minutos, solução de formaldeído 2 minutos, solução de cloreto de ouro 2 minutos, solução de tiosulfato de sódio 2 minutos. Esse protocolo inclui lavagem em água destilada entre as etapas (10 segundos), assim como posterior contracoloração por fast red 0,1% por 2 minutos.

Para evidenciar regiões ricas em polissacarídeos foi utilizada a técnica de PAS. Lâminas foram imersas em ácido periódico por 15 minutos, lavadas em água destilada e imersas novamente em reativo de Schiff por 30 minutos (mantendo ao abrigo da luz), lavadas em água destilada até a retirada do excesso de corante.

Para evidenciar fibras elásticas foi utilizada a técnica histoquímica de orceína acética. Lâminas foram imersas em solução de Orceínas a 1% diluída em álcool 70 % por 30 minutos. Após lavagens em água destilada, as lâminas foram diferenciadas em uma solução de álcool-ácido (1 ml de ácido clorídrico e 99 ml de álcool 70%) durante 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris.

### **3.4 Análise dos resultados**

As análises de imagens foram executadas com auxílio do freeware Image J versão 1,45c (NIH – National Institutes of Health). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa Statistica 7.0 (StatSoft).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Procedimento**

Inicialmente, após a anestesia com propofol 10 mg/Kg de peso vivo, foi observado ainda reflexo palpebral residual. A fim de tornar a anestesia mais profunda, foram adicionadas mais 2 mg de propofol/Kg de peso vivo. O acréscimo na dosagem original não permitiu o retorno do jacaré para vigília. Nesse sentido, foi constatado que a dose letal é muito próxima da dose de 10 mg de propofol/Kg de peso, tornando inviável crescer qualquer outra concentração desse mesmo anestésico. Sendo assim, sob coordenação do Médico Veterinário Dr. Victor Manuel Aleixo, foi acrescido 0,1 mL de anestésico local 2 mg de Mepivacaína na região da cirurgia. Administrado por via subcutânea, o anestésico local inibiu totalmente os reflexos do animal referentes ao procedimento cirúrgico de excisão de um único osteodermo dorsal e um único osteodermo ventral. No total, foram efetuadas 20 cirurgias, havendo 3 óbitos por overdose com propofol na fase de padronização da técnica de anestesia. Após o estabelecimento da dose máxima de 10 mg de propofol/Kg de peso vivo, consorciado com anestesia local, foram realizadas mais 17 cirurgias com viabilidade total, sendo que os jacarés se mantiveram saudáveis até o final do experimento.

Ao longo da manutenção dos jacarés nos tanques, foi observado que o apetite, e presença de fezes nos tanques, foram menores nos tanques onde os jacarés eram mantidos em  $23 \pm 2,0$  °C, enquanto esses mesmos parâmetros eram notoriamente maiores nos tanques em que os jacarés foram mantidos em  $33 \pm 2,0$  °C. Mesmo assim, todos os 17 animais se mantiveram saudáveis durante todo o experimento.

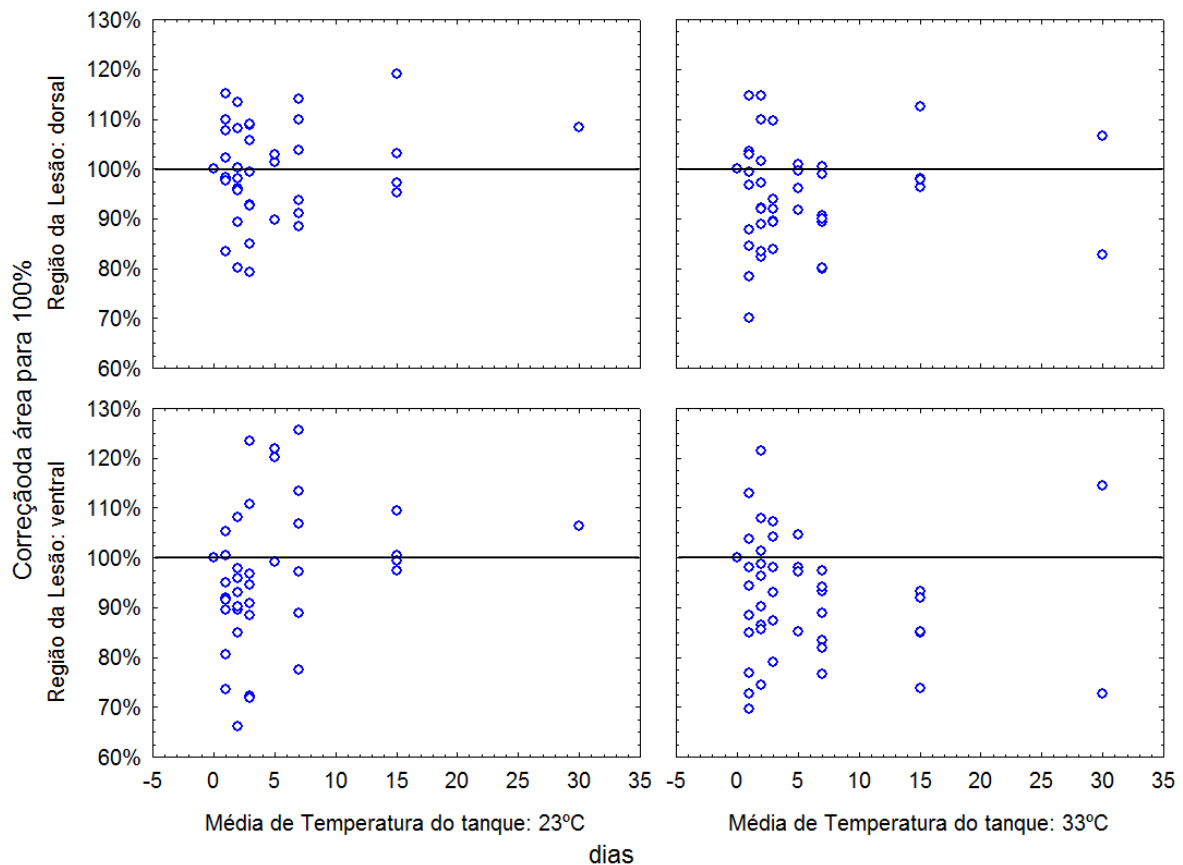
Em virtude das dificuldades em cortar cirurgicamente o osteodermo presente na derme dos jacarés, foi optado a retirada de apenas um osteodermo no dorso e no ventre dos jacarés, havendo apenas a necessidade de contornar esse osteodermo.

### **4.2 Área e perímetro da lesão**

Como a unidade utilizada na cirurgia era um osteodermo, havia uma variação quanto ao tamanho da lesão cirúrgica, o que foi corrigido pela conversão do

tamanho das lesões por valores percentuais. Todas as áreas mensuradas das lesões recém-confeccionadas (0 hora) foram transformadas em 100%, e as oscilações do tamanho das áreas das lesões foram caracterizadas conforme o tamanho inicial da lesão. Portanto, se a lesão inicial possuía 80 mm<sup>2</sup> (equivale a 100%), e após 1 dia de cicatrização essa lesão diminuiu a 60 mm<sup>2</sup>, a equivalência em relação a 80 mm<sup>2</sup> é de 75% do tamanho original. Após a adequação dos resultados para as porcentagens, foi caracterizado que o bordo das lesões, após 1 dia de cicatrização, retrai em alguns animais e dilata em outros (Figura 2). Não havendo padrão quanto ao fenômeno caracterizado.

Figura 2 – Gráficos de dispersão que correlaciona o tamanho relativo da lesão (Y) com os dias em que as medições foram executadas (X).

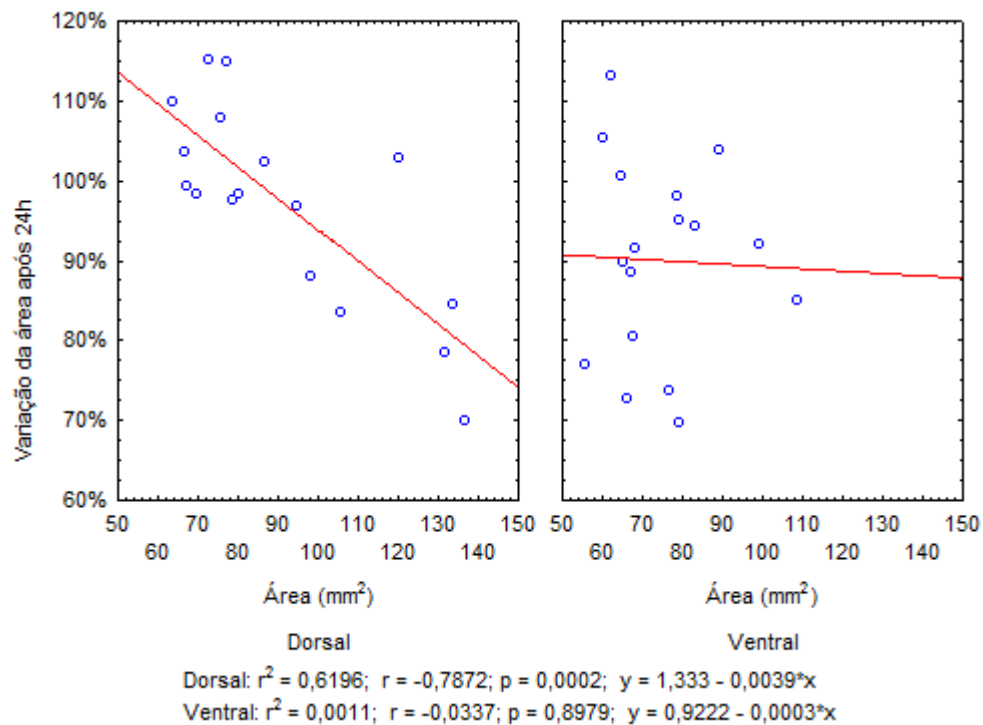


Os gráficos situados na parte superior da figura se refere as cicatrizes dorsais enquanto os gráficos situados na parte inferior da figura se refere as cicatrizes ventrais. Os gráficos situados do lado esquerdo se refere as cicatrizes mantidas em 23 °C, enquanto que a direita 33 °C. A linha horizontal refere-se ao tamanho original da lesão de 100%.

Em virtude da variação da área da lesão nas primeiras 24 horas, foram construídos gráficos de dispersão onde tamanho original da lesão fica plotado no eixo “X” enquanto que a variação da lesão nas primeiras 24 horas foi plotada no eixo “Y”. O gráfico permite observar que a lesão dorsal varia nas primeiras 24 horas de

acordo com o tamanho original da lesão, ou seja, se a lesão original é “grande” ela retrai, se a lesão é “pequena” ela se expande. Esse mesmo tipo de observação não pôde ser atribuído à variação da lesão ventral (Figura 3).

Figura 3 – Gráfico de dispersão correlacionando o tamanho relativo da lesão (Y) após 24 horas com o tamanho absoluto da lesão (X) em ambas as temperaturas.



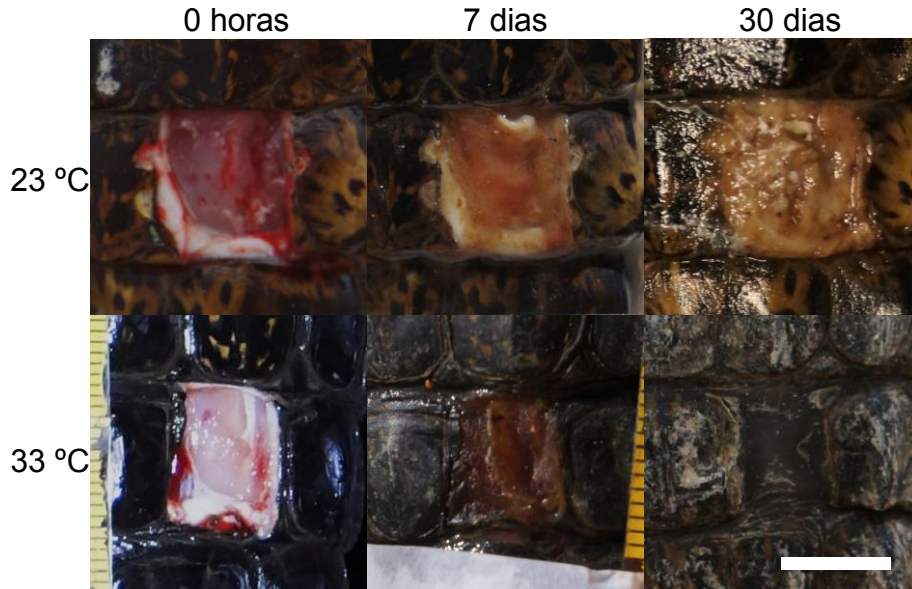
Valores de correlação, determinação e significância da regressão linear estão abaixo do gráfico.

### 4.3 Análises macroscópicas da lesão

As análises macroscópicas das lesões revelaram que tanto as cicatrizes dorsais quanto as cicatrizes ventrais evoluíram mais rapidamente em jacarés mantidos em temperatura média de 33 °C comparados com os de 23 °C (Figura 4 e Figura 5). Os jacarés mantidos em maiores temperaturas variavam quanto a escolha do habitat, permanecendo tanto nas áreas secas quanto nas áreas úmidas dos tanques, enquanto que os jacarés mantidos em temperaturas menores permaneciam invariavelmente com seus corpos imersos, mantendo apenas as narinas e olhos para o lado de fora da lâmina d'água.

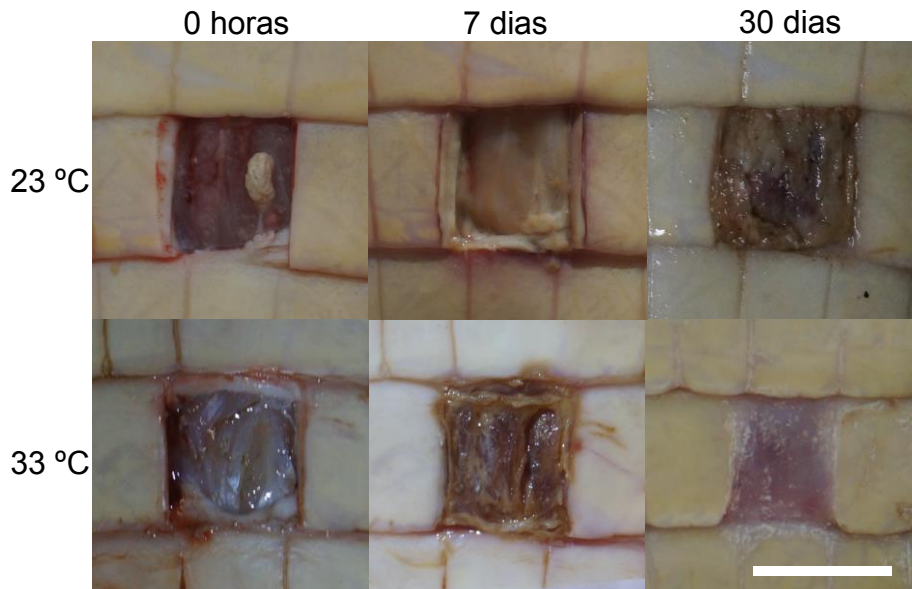


Figura 4 - Prancha contendo duas séries de fotografias do processo cicatricial no dorso do jacaré em 0 hora, 7 dias e 30 dias.



As três fotografias da linha superior referem-se a um processo cicatricial de um jacaré mantido em 23 °C e na linha inferior as cicatrizes em 33 °C. (barra de escala = 1 cm). Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013)

Figura 5 - Prancha contendo duas séries de fotografias do processo cicatricial no ventre do jacaré em 0 hora, 7 dias e 30 dias.



As três fotografias da linha superior referem-se a um processo cicatricial de um jacaré mantido em 23 °C e na linha inferior a cicatriz mantida a 33 °C. (barra de escala = 1 cm). Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013)

O último jacaré ainda está sendo mantido vivo para aferir se haverá regeneração do osteodermo. Até o momento de depósito dessa tese, com 100 dias de cicatrização em temperaturas iguais à do ambiente natural, não foi verificado a

formação osteodermo mineralizado ao toque da lesão, havendo apenas a restituição da morfologia topográfica da pele acompanhada de hiperpigmentação da lesão dorsal (Figura 6).

Figura 6 - Lesão com 100 dias de cicatrização no dorso e no ventre do jacaré respectivamente.



#### 4.4 Morfologia microscópica geral do processo cicatricial

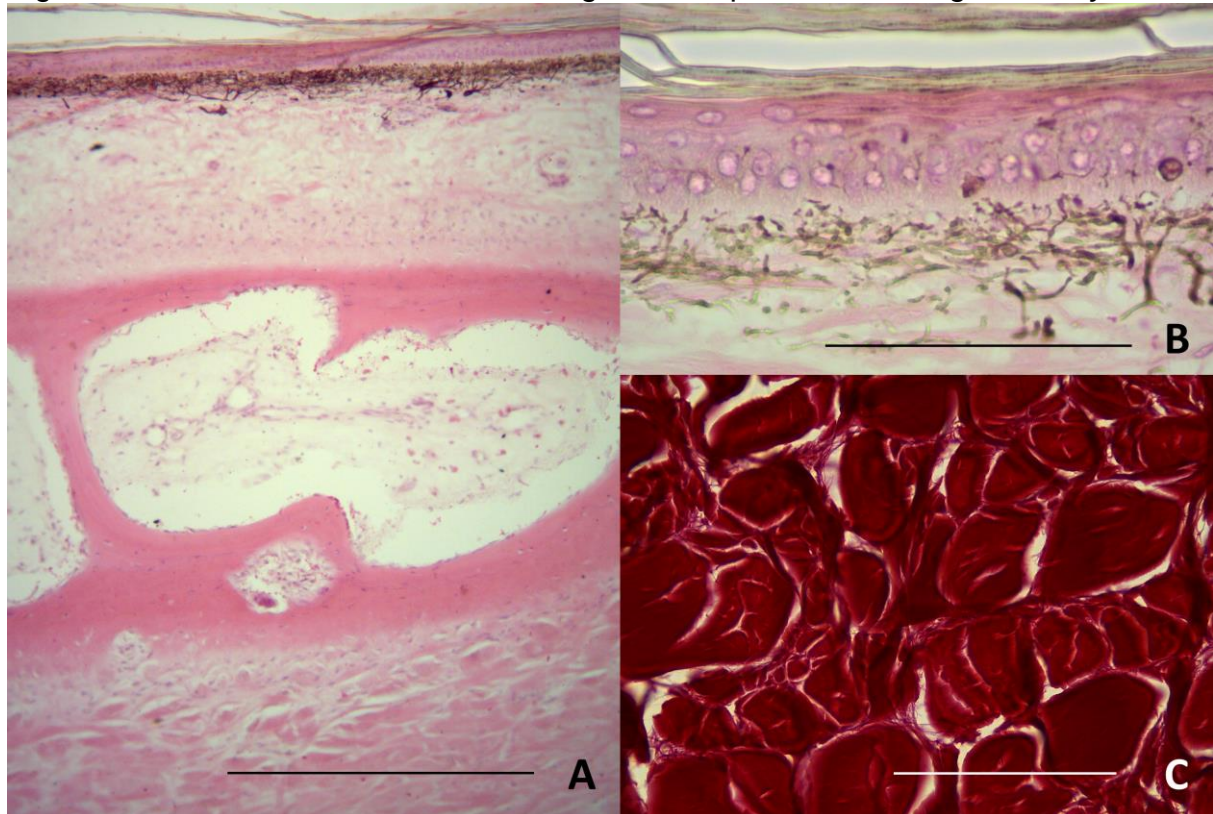
Em virtude da enorme semelhança entre as cicatrizações dorsais e ventrais, e a fim de evitar redundâncias, serão descritas as cicatrizes dorsais, sendo que as morfologias aqui descritas podem ser atribuídas para as cicatrizes ventrais. Havendo necessidade de destacar que nas cicatrizes ventrais a pigmentação é mais clara, com menor número de melanócitos. Outrossim, não foi detectado nenhuma marcação em todos os controles negativos das imunohistoquímicas realizadas.

##### 4.4.1 *Pele dorsal íntegra*

A pele íntegra do *C. yacare* apresenta epiderme com aproximadamente 5 camadas de queratinócitos. A camada basal da epiderme possui estriações junto a região da lâmina basal. Os melanócitos se alinham, formando uma camada pigmentar abaixo da lâmina basal, mesmo assim, há diversos prolongamentos citoplasmáticos de melanócitos identificados entre os queratinócitos da epiderme. A derme é composta por um estrato lúcido constituído por tecido conjuntivo frouxo e um estrato compacto constituído por densas fibras colágenas que obedecem uma disposição regular como uma trama tridimensional. Entre o estrato lúcido e estrato compacto há o osteodermo, matriz óssea com periósteo pouco definido e endósteo bem definido. Dentro da região equivalente a medula do osteodermo é visualizado

diversas células pouco diferenciadas, vasos e nervos, e a matriz dessa região é pouco fibrosa (Figura 7).

Figura 7 - Prancha contendo 3 fotomicrografias de pele dorsal íntegra de *C. yacare*.



(A) secção da pele de *C. yacare* íntegra em menor aumento, são observadas as camadas de epiderme, camada pigmentar de melanócitos, estrato lúcido da derme, osteodermo, estrato compacto da derme (barra de escala = 500  $\mu\text{m}$ ). (B) epiderme com 4 camadas de queratinócitos, estriações da camada basal da epiderme e camada de melanócitos (barra de escala = 120  $\mu\text{m}$ ). (C) detalhe da organização do estrato compacto da derme, em que fibras maiores horizontais são entrecruzadas por fibras menores verticais (barra de escala = 120  $\mu\text{m}$ ). Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013)

#### 4.4.2 Lesão dorsal após 3 dias a 33 °C

A região da lesão está coberta por uma massa de células acidófilas oriunda da coagulação de eritrócitos. Nessa massa acidófila há diversos núcleos imersos. Doravante, tal massa será chamada de coágulo. A porção superior do coágulo é menos acidófila, possui menos núcleos e muitas bactérias infiltradas. Nas porções mais basais do coágulo há o aumento no número de núcleos e secções transversais de fibras musculares imersas, e na base do coágulo, existem células granulocíticas acidófilas (Figura 8), com grânulos em formato de bastão, tais células foram visualizadas sob MET e caracterizadas como heterófilos. Abaixo do coágulo são observáveis grânulos acidófilos dispersos, heterófilos, bactérias que infectam o local

da lesão e células mononucleares agranulocíticas. As células mononucleares podem apresentar núcleos com predomínio de heterocromatina, heterocromatina em meia lua, e predomínio eucromático. As células que apresentavam heterocromatina em meia lua e eucromática frequentemente possuíam fagossomos preenchidos por bactérias, grânulos ou células inteiras. Ainda nessa região, há a formação de células multinucleadas contendo fagossomos evidentes ou não. Essas células multinucleadas possuíam predomínio de núcleos eucromáticos. Ao se aprofundar na derme são verificados grande quantidade de matriz amorfa, secções de fibras musculares com perdas morfológicas em relação ao tecido íntegro, abundância de heterófilos, células mononucleares com muito citoplasma, vasos congestionados, nervos inflamados e infiltrados por heterófilos. A perda morfológica do tecido muscular inclui endomísio afastado das células musculares, células musculares infiltradas por heterófilos, células musculares sem contorno definido com afastamento entre as miofibrilas, e, no estroma do tecido inflamado, são observáveis células com abundantes grânulos basofílicos, confirmados por MET como sendo mastócitos. Na porção periférica da lesão, é observada a frente de migração epitelial sem as típicas estriações basais.

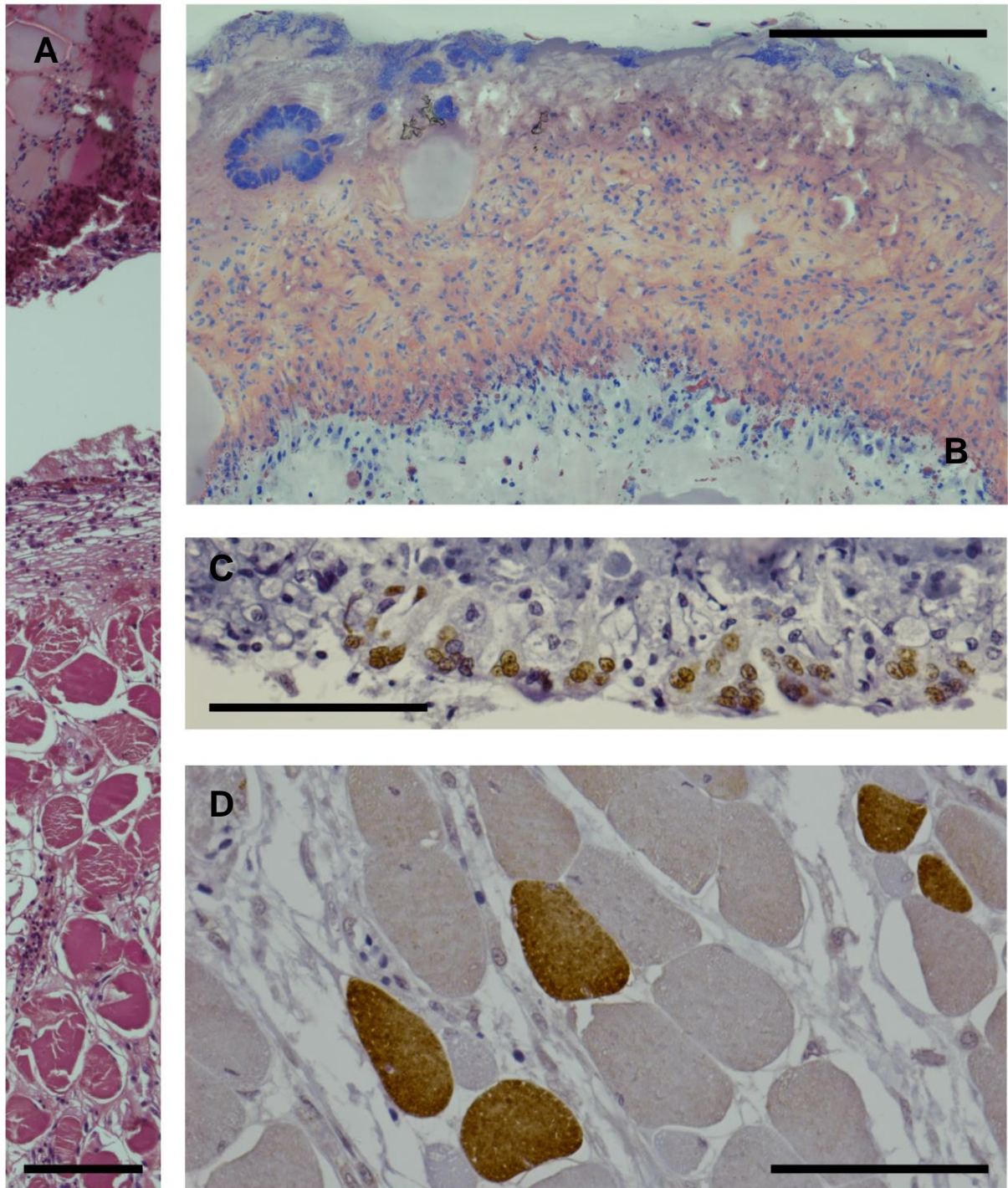
Sob a coloração argentófila para reticulina se observa grande quantidade de fibras imersas no coágulo. Abaixo do coágulo, são escassas as fibras entre as células inflamatórias infiltradas, ou mesmo permeando a matriz amorfa. As fibras argentófilas voltam a ser observadas em camadas mais profundas da lesão, junto ao endomísio, sendo que elas estão afastadas das secções transversais da musculatura, aparentando edema intercelular. Na porção periférica da lesão, a lâmina basal da frente de migração epitelial apresenta baixa concentração de fibras comparado a lâmina basal do epitélio íntegro. Sob a coloração de picrossírius é possível destacar fibras colágenas imersas no coágulo, e o endomísio afastado das secções transversais da musculatura. Sob a coloração de PAS, cabe destacar a reação positiva da região da lâmina basal do epitélio íntegro, das secções transversais das células musculares com perda morfológica, e da matriz amorfa localizada abaixo do coágulo. Sob a coloração de orceína acética, é evidenciada a presença de fibras elásticas fora da região lesionada, imersa entre as fibras no tecido conjuntivo frouxo íntegro do estrato lúcido da derme.

A imunomarcção para citoqueratina se revelou uma técnica bastante útil para evidenciar a frente de epiderme ainda no início da migração. As secções

transversais de fibras musculares eram VEGF-A positivas (Figura 8), principalmente as secções com a perda morfológica presentes no foco da injúria. A epiderme em migração e células multinucleadas abaixo do coágulo também eram intensamente VEGF-A positivas. A marcação pelo anti-vWF apenas evidenciou vasos dilatados e congestos nas porções mais distais da lesão. A camada basal da epiderme, células gigantes (Figura 8) e células do tecido de granulação presente na derme inflamada eram PCNA positivas.



Figura 8 - Prancha com 4 fotomicrografias da cicatriz dorsal após 3 dias de cicatrização sob temperatura média de 33 °C



(A) camadas da pele em processo de cicatrização, de cima para baixo são observados coágulo desprendido com fibras musculares aprisionadas, uma camada de células e fibras achatadas sem morfologia definida chamada doravante de matriz amorfa, abaixo dessa matriz há o tecido muscular com perda morfológica (barra de escala = 125  $\mu\text{m}$ ). (B) coágulo aprisionando fibras musculares sob a coloração de Rosenfeld, acima desse coágulo há diversas bactérias identificadas pela pigmentação azul intensa, abaixo do coágulo há o enfileiramento de células gigantes, doravante chamada camada de células gigantes (barra de escala = 150  $\mu\text{m}$ ). (C) células gigantes com seus núcleos PCNA positivos (barra de escala = 60  $\mu\text{m}$ ). (D) camada muscular com algumas secções musculares VEGF-A positivas (barra de escala = 60  $\mu\text{m}$ ).

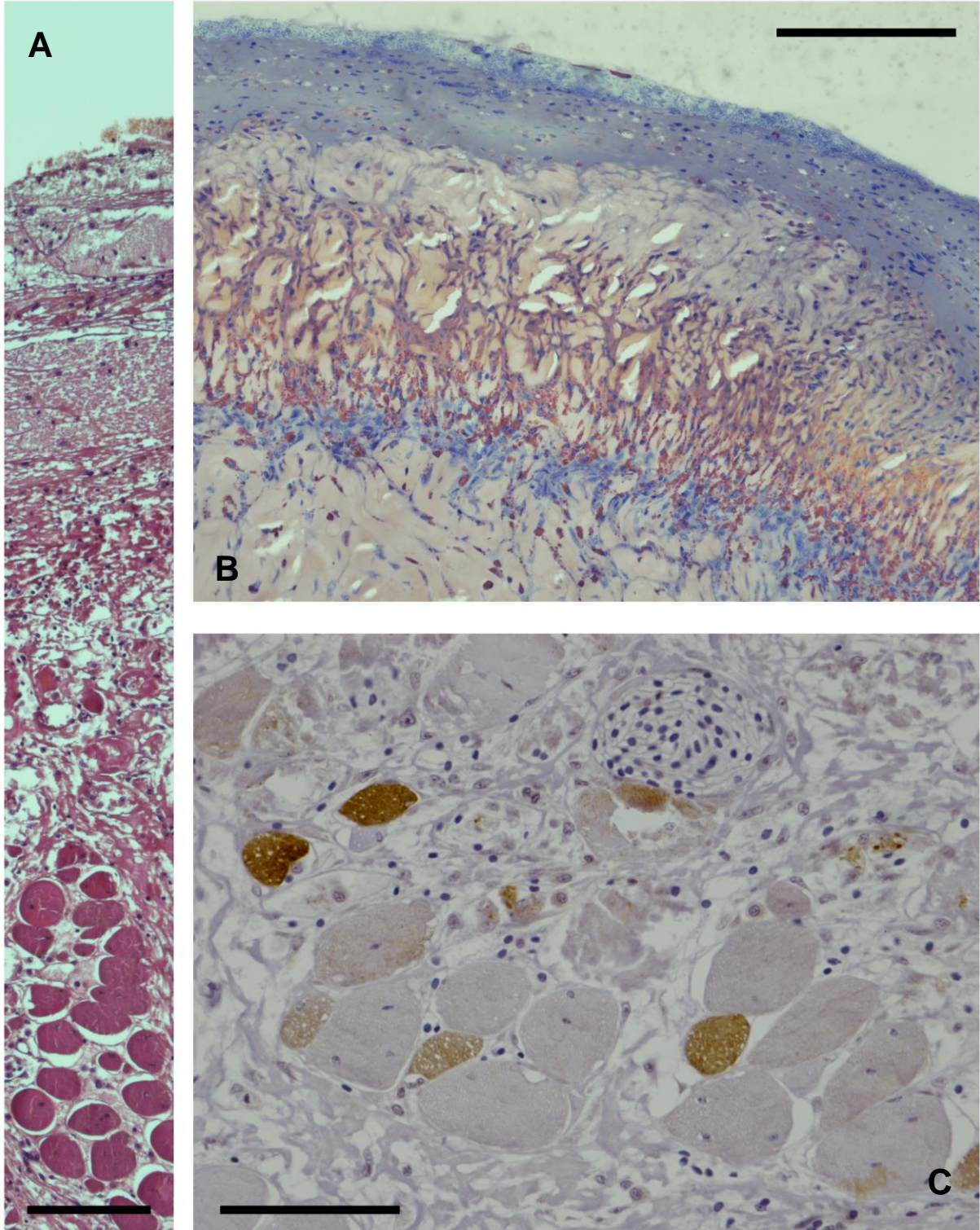
#### **4.4.3 Lesão dorsal após 7 dias a 33 °C**

O aspecto é basicamente o mesmo. O coágulo é mantido. As estruturas abaixo do coágulo se repetem. Cabe destacar o aumento de matriz amorfa abaixo do coágulo, e aumento de eritrócitos dispersos nessa matriz (Figura 9). Há densificação das células gigantes multinucleadas que se alinham abaixo do coágulo, intercaladas por heterófilos, doravante chamada de camada de células gigantes. O perfil de células infiltradas é basicamente o mesmo. O tecido muscular permanece edemaciado, e as células musculares mais próximas ao foco da injúria apresentam perdas morfológicas. As colorações histoquímicas mantiveram os mesmos padrões de marcação que em 3 dias, cabendo destacar a ausência da marcação de reticulina na região da lâmina basal da epiderme migratória.

A marcação por anti VEGF-A mantém a mesma intensidade e padrão que em 3 dias (Figura 9). Há maior migração da epiderme evidenciada pela marcação para citoqueratina. Houve aumento na quantidade de vasos com paredes delgadas vWF positivas, e por vezes esses vasos estão repletos de eritrócitos, ou mesmo o contorno não é completo. A marcação por anti-PCNA é o mesmo padrão que em 3 dias.



Figura 9 - Prancha com 3 fotomicrografias da lesão após 7 dias de cicatrização sob temperatura de 33 °C.



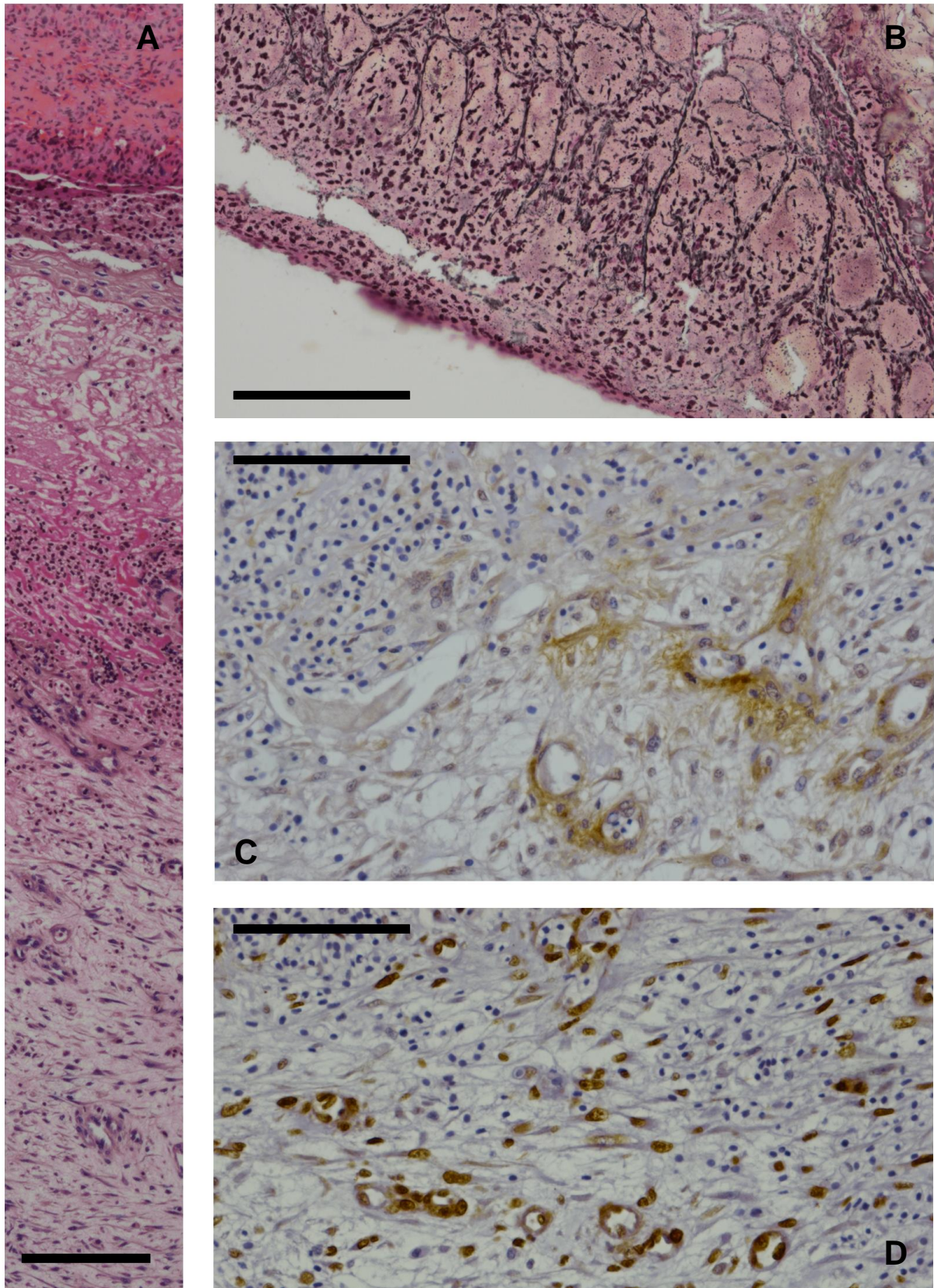
(A) camadas da lesão: o coágulo foi perdido ao longo do processamento. De cima para baixo são evidenciados uma camada de matriz amorfa, abaixo há camada de secções musculares com perda morfológica (barra de escala = 125  $\mu$ m). (B) coágulo sob a coloração de Rosenfeld, para o qual cabe destacar fibras colágenas imersas entre as células coaguladas (barra de escala = 140  $\mu$ m). (C) secções musculares VEGF-A positivas (barra de escala = 70  $\mu$ m).



#### **4.4.4 Lesão dorsal após 15 dias a 33 °C**

No coágulo, ainda se observa secções transversais de células musculares. A epiderme recobre quase toda a lesão (Figura 10), confirmado sob a marcação de citoqueratina. Essa nova epiderme pode possuir multicamadas de células, ou mesmo ser mais delgada, constituída por queratinócitos achatados sobrepostos em aproximadamente 5 camadas, principalmente nas regiões adjacentes a lesão ainda sem cobertura, sendo que a epiderme varia gradualmente de epiderme espessa, mais antiga, para epiderme delgada, frente de migração. Poucos heterófilos estão infiltrados na derme, havendo também alguns poucos heterófilos que permeiam a epiderme. Há melanócitos infiltrados na epiderme. Na derme há alguns poucos eritrócitos imersos na matriz, e abundância de vasos vWF positivos formados no sentido muscular epidérmico, perpendiculares à epiderme (Figura 10). Ainda na derme há grande quantidade de miofibroblastos actina- $\alpha$  positivos formando o tecido de granulação. As células gigantes da derme se restringem a circundar e isolar pequenos fragmentos de coágulo. Dentre as células da derme, é observado grande número de mononucleares agranulocíticos pequenos e heterocromáticos. Há restituição parcial da derme, confirmado pela histoquímica de picrossirius. As células gigantes multinucleadas e frente de migração da epiderme são VEGF-A positivas. O edemaciamento no tecido muscular sob o tecido de granulação é visualmente mais discreto. Sob a técnica de orceína, permeando o tecido de granulação, se observa poucas fibras elásticas delgadas e curtas. A camada basal da epiderme, células gigantes, células endoteliais, miofibroblastos do tecido de granulação e linfócitos são PCNA positivas (Figura 10). Ainda não há marcação de reticulina na região de lâmina basal da epiderme regenerada. A marcação por PAS se restringe basicamente a matriz amorfa residual das camadas subepiteliais.

Figura 10 - Prancha com 4 fotomicrografias da lesão após 15 dias de cicatrização sob 33 °C.



(A) camadas da região em cicatrização, de cima para baixo são caracterizados as camadas coágulo, epiderme delgada, matriz amorfa residual e derme recém regenerada (barra de escala = 125  $\mu$ m). (B) reticulina do estroma muscular aprisionada em meio ao coágulo (barra

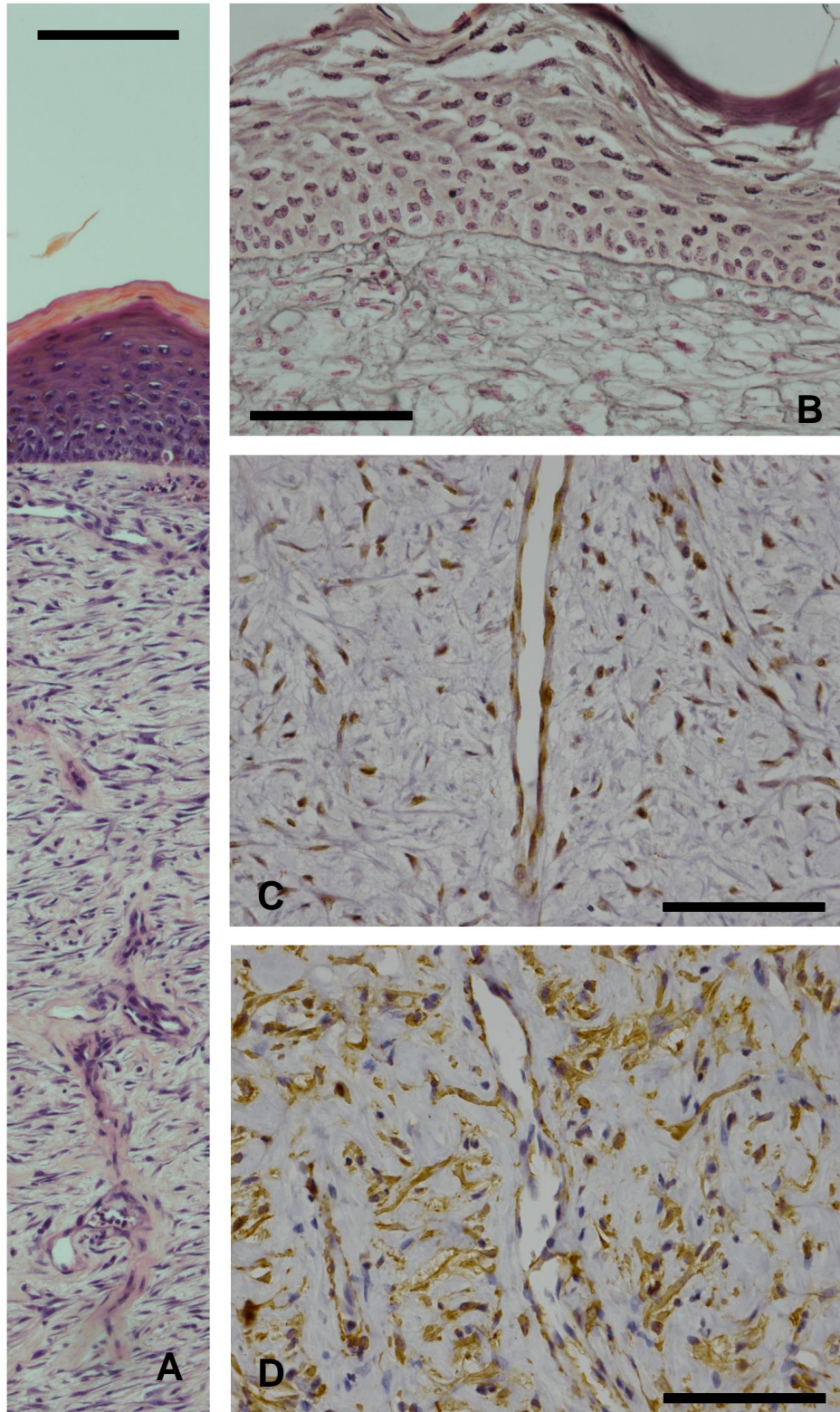
de escala = 120  $\mu\text{m}$ ). (C) vasos com endotélio vWF positivos, além dos vasos há eritrócitos dispersos na matriz (barra de escala = 70  $\mu\text{m}$ ). (D) miofibroblastos e células endoteliais na derme reconstituída PCNA positivos (barra de escala = 70  $\mu\text{m}$ ).

#### **4.4.5 Lesão dorsal após 30 dias a 33 °C**

Sob a marcação da citoqueratina é possível observar que a epiderme recobre toda a lesão, essa epiderme é mais espessa, com aproximadamente 10 camadas de células (Figura 11 e Figura 12), enquanto que a epiderme original possui aproximadamente 5 camadas de células. Poucos melanócitos ainda estão infiltrados na epiderme. Existem ainda poucos heterófilos infiltrados na derme reconstituída (Figura 12), células gigantes multinucleadas circundando fragmentos de coágulos imersos a derme. Sob a coloração de picrossirius, é possível verificar que a densidade de fibras colágenas aumentou em relação ao prazo anterior, havendo relativamente menos miofibroblastos. A imunomarcação da actina- $\alpha$  confirma a persistência de miofibroblastos na matriz da lesão (Figura 11). São identificáveis frequentes vasos vWF positivos, sem estarem congestionados, com diâmetros menores e dispostos perpendicularmente no sentido epiderme músculo (Figura 11). No entorno das células gigantes e de alguns vasos existem muitos aglomerados leucocitários com predomínio de linfócitos e macrófagos. Os núcleos dos queratinócitos basais ainda são PCNA positivos, havendo uma diminuição sensível da marcação dos miofibroblastos e células endoteliais (Figura 11). A marcação por anti-PCNA foi bastante forte nos linfócitos adjacente a alguns vasos. Sob a coloração para reticulina, observa-se aumento da densidade das fibras reticulares em relação ao prazo anterior (Figura 11). Não houve identificação de fibras elásticas na derme reconstituída sob a coloração de orceína acética. Apenas raras secções musculares nas camadas profundas ou periferia da lesão são VEGF-A positivas.

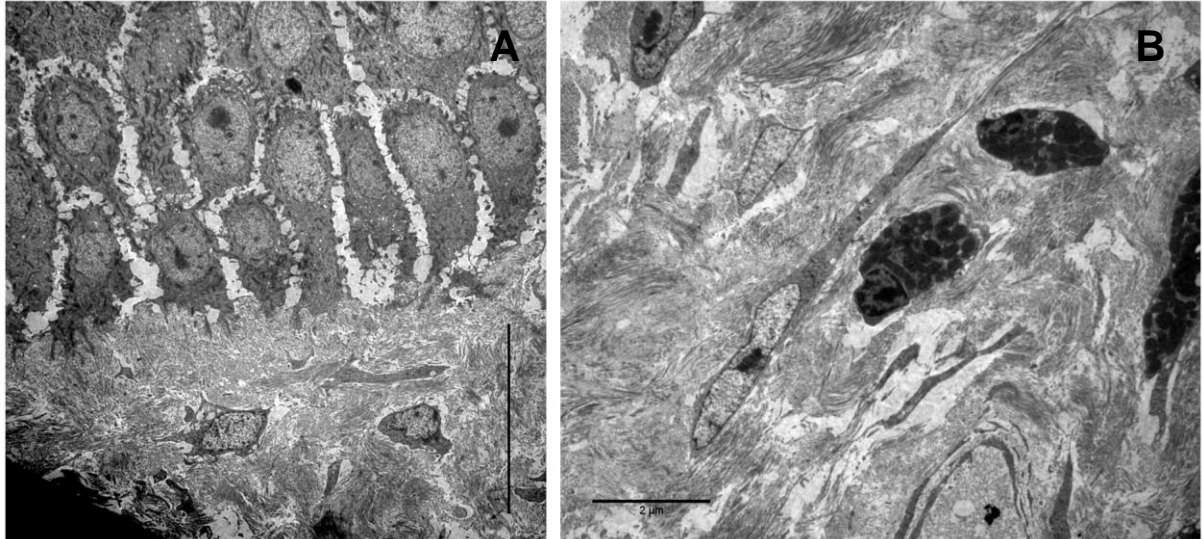


Figura 11 - Prancha com 4 fotomicrografias da lesão com 30 dias de cicatrização sob 33 °C.



(A) camadas da cicatriz após 30 dias de cicatrização, sendo a camada superior a epiderme espessa e a camada subepidérmica constituída por derme recém reconstituída (barra de escala = 125  $\mu\text{m}$ ). (B) nova epiderme espessa com multicamadas e reticulina na região de lâmina basal (barra de escala = 85  $\mu\text{m}$ ). (C) vasos perpendiculares entre a epiderme e tecido muscular, evidenciado pelo endotélio vWF positivo (barra de escala = 85  $\mu\text{m}$ ). (D) miofibroblastos actina- $\alpha$  positivos na derme em restituição (barra de escala = 85  $\mu\text{m}$ ).

Figura 12 - Prancha com 2 eletromicrografias da cicatriz após 30 dias sob 33 °C.



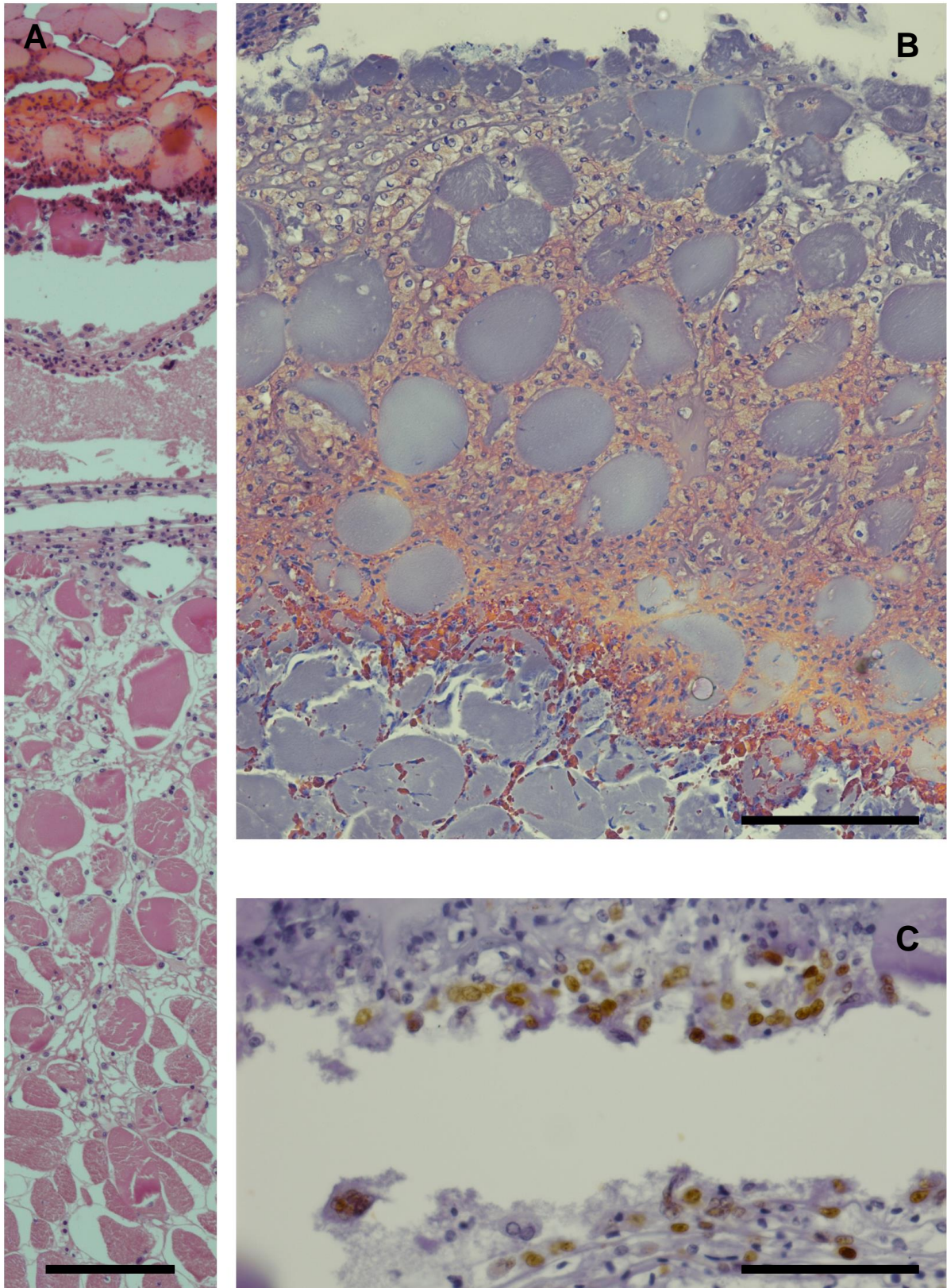
(A) epiderme recém reconstituída, mostrando que as estriações da camada basal voltaram a ser evidenciados. Abaixo da epiderme há fibras e dois miofibroblastos (barra de escala = 5  $\mu$ m). (B) heterófilos ainda residentes na derme em restituição e um fibroblasto fusiforme imerso entre as fibras (barra de escala = 2  $\mu$ m).

#### 4.4.6 Lesão dorsal após 3 dias a 23 °C

Existem diversas congruências entre as cicatrizes de 3 dias a 33 °C e 23 °C. Alguns pontos de destaque são: o coágulo se forma em camadas mais profundas da musculatura, havendo o aprisionamento e “descarte” de maior número de secções musculares (Figura 13), fibras colágenas e reticulares. Os vasos destacados pela imunomarcacão do vWF estão dispostos principalmente nos conjuntivos das regiões periféricas a lesão. A imunomarcacão do VEGF-A é positiva em maior número de secções transversais musculares (Figura 14), assim como é positivo na frente de migração da epiderme. Sob a coloraçã de picrossirius e para reticulina, as secções de fibras musculares abaixo do coágulo apresentavam discreto edema. A coloraçã de PAS é mais intensa nas secções transversais de células musculares com perdas morfológicas ou edemaciadas. Os infiltrados leucocitários abaixo do coágulo possuem basicamente a mesma constituicão que em 33 °C (Figura 14). A imunomarcacão por PCNA foi positiva para a camada basal da epiderme, leucócitos infiltrados e células gigantes alinhadas abaixo do coágulo (Figura 13).



Figura 13 - Prancha com 3 fotomicrografias da lesão com 3 dias de cicatrização sob 23 °C.

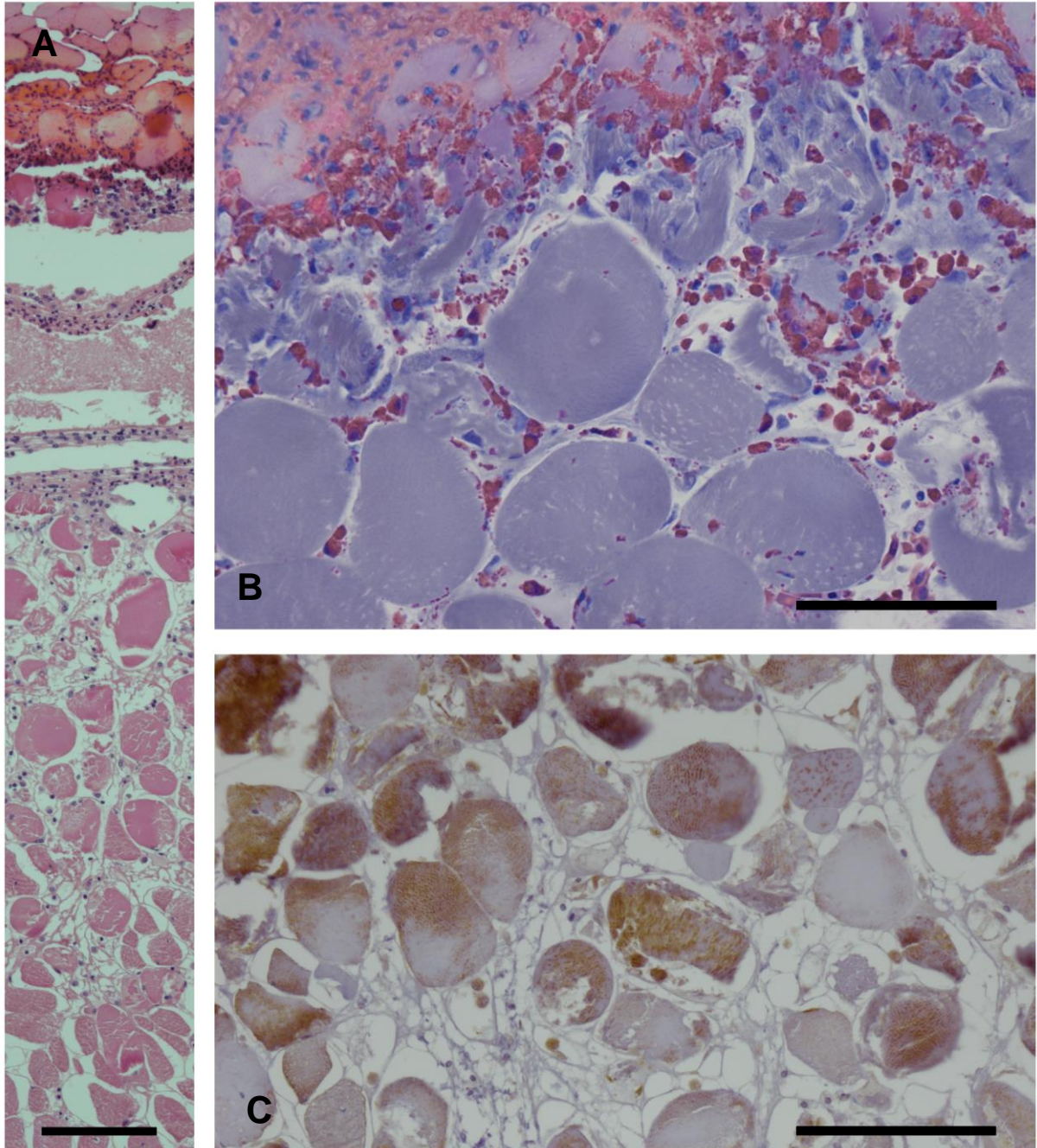


(A) camadas da lesão, sendo de cima para baixo coágulo, matriz amorfa e camada muscular com perda morfológica (barra de escala = 125  $\mu\text{m}$ ). (B) inúmeras secções de fibras musculares aprisionadas no coágulo, sendo a porção mais basal do coágulo constituído predominantemente por heterófilos (barra de escala = 120  $\mu\text{m}$ ). (C) camada de células



gigantes PCNA positivas na base do coágulo que se desprende da matriz amorfa com células mononucleares também positivas (barra de escala = 80  $\mu\text{m}$ ).

Figura 14 - Segunda prancha com 3 fotomicrografias da lesão com 3 dias de cicatrização sob 23 °C.



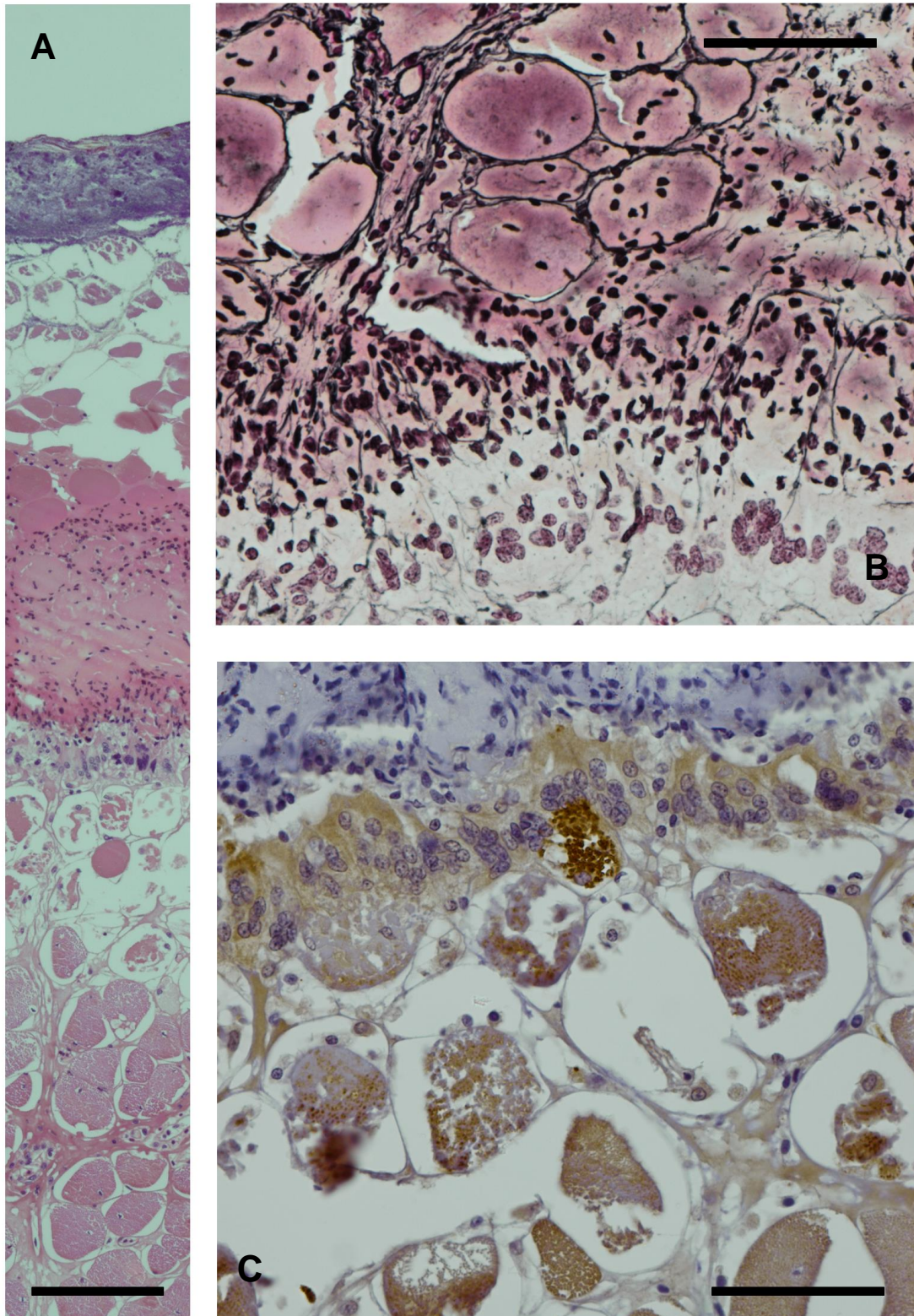
(A) camadas da lesão, sendo de cima para baixo coágulo, matriz amorfa e camada muscular com perda morfológica (barra de escala = 125  $\mu\text{m}$ ). (B) camada de células gigantes e o predomínio de heterófilos infiltrados nas camadas inferiores ao coágulo, cabe destacar que a perda morfológica das secções transversais de fibras musculares são menos frequentes nessa temperatura (barra de escala = 75  $\mu\text{m}$ ). (C) células musculares com perda morfológica VEGF-A positivas (barra de escala = 115  $\mu\text{m}$ ).

#### **4.4.7 Lesão dorsal após 7 dias a 23 °C**

Há basicamente a mesma morfologia descrita anteriormente. Cabe destacar: perceptível aumento da quantidade de bactérias sobre o coágulo; e a densificação de células gigantes alinhadas sob o coágulo (Figura 15). O perfil de leucócitos infiltrados abaixo do coágulo é o mesmo que em 33 °C só que em menor frequência. A marcação por PAS foi mais intensa no coágulo que no restante do tecido. Abaixo do coágulo não há matriz amorfa ou tecido de granulação. A imunomarcação por citoqueratina revela uma discreta migração epidérmica comparado a 33 °C. A quantidade de secções transversais de células musculares com perda morfológica é menor. A imunomarcação do VEGF-A revela positividade nas secções transversais da musculatura e nas células gigantes (Figura 15). Não foi verificada fibras elásticas sob a coloração de orceína acética. A imunomarcação do vWF revelou a existência de poucos vasos na região da injúria permeando o endomísio. Além disso, as secções musculares e as células gigantes foram marcadas positivamente para vWF. A imunomarcação por PCNA mantém o mesmo padrão de marcação que o prazo anterior.



Figura 15 – Prancha com 3 fotomicrografias da lesão com 7 dias de cicatrização sob 23 °C.



(A) camadas da lesão, sendo de cima para baixo uma camada de bactérias fortemente basófilas, camada de coágulo com muitas fibras musculares aprisionadas, camada de células gigantes, camada muscular com perda morfológica e camada muscular (barra de escala = 125  $\mu$ m). (B) coágulo com diversas secções transversais de fibras musculares, de coloração negra são observadas as fibras de reticulina do estroma muscular também aprisionado no coágulo, abaixo há a camada

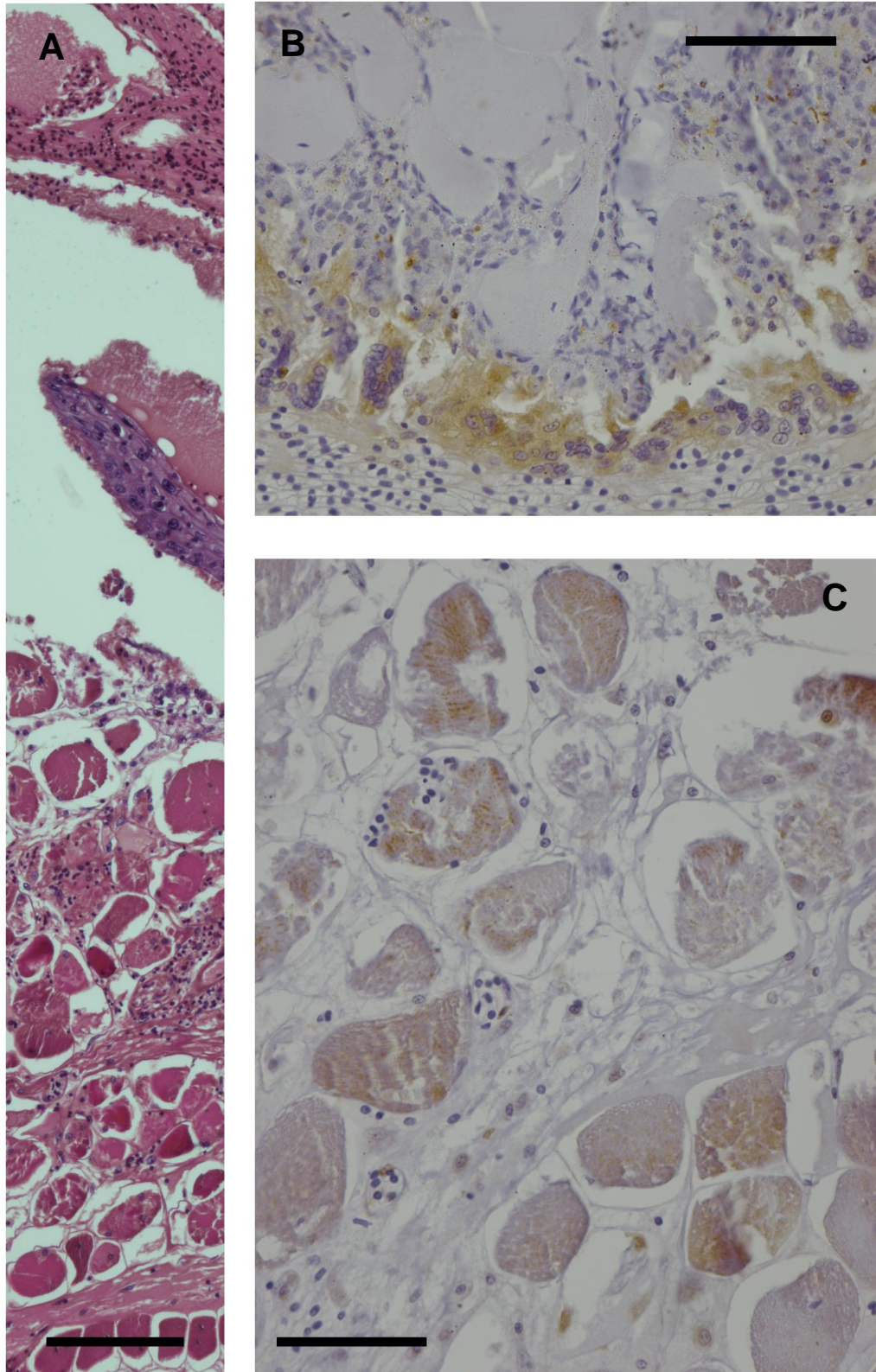
de células gigantes (barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ). (C) camada de células gigantes abaixo do coágulo, continuadas por secções de fibras musculares, ambas VEGF-A positivas (barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ).

#### **4.4.8 Lesão dorsal após 15 dias a 23 °C**

Pouco difere da lesão do prazo anterior. O coágulo ainda está presente, cabendo destacar que ainda são visíveis, na parte superior do coágulo, as secções de células musculares aprisionadas. A camada de células gigantes abaixo do coágulo permanece evidente e densa (Figura 16). Sob microscopia eletrônica de transmissão foram identificados dois tipos de células gigantes, a célula gigante eletrondensa, com núcleos predominantemente heterocromáticos, citoplasma contendo inúmeros filopódios e vesícula contendo gotículas de lipídeos; e a célula gigante eletrolucente, com núcleos esféricos predominantemente eucromáticos e contorno sem filopódios (Figura 17). A imunomarcação da citoqueratina evidenciou que a epiderme migrou pouco. Existem heterófilos e células mononucleares permeando o endomísio ainda edemaciado, cabendo mencionar o surgimento de um primórdio de tecido de granulação. A imunomarcação do VEGF-A manteve o mesmo padrão de marcação destacando algumas secções musculares, células gigantes e a frente de migração da epiderme (Figura 16). A marcação por PAS foi positiva para secções musculares com perdas morfológicas. A imunomarcação por vWF foi positiva para as células gigantes, células endoteliais e secções musculares. Além disso, cabe destacar que foram evidenciados eritrócitos imersos numa matriz amorfa, e esses eritrócitos não estavam envoltos por células endoteliais. A imunomarcação por PCNA mantém o mesmo padrão de marcação que o prazo anterior.

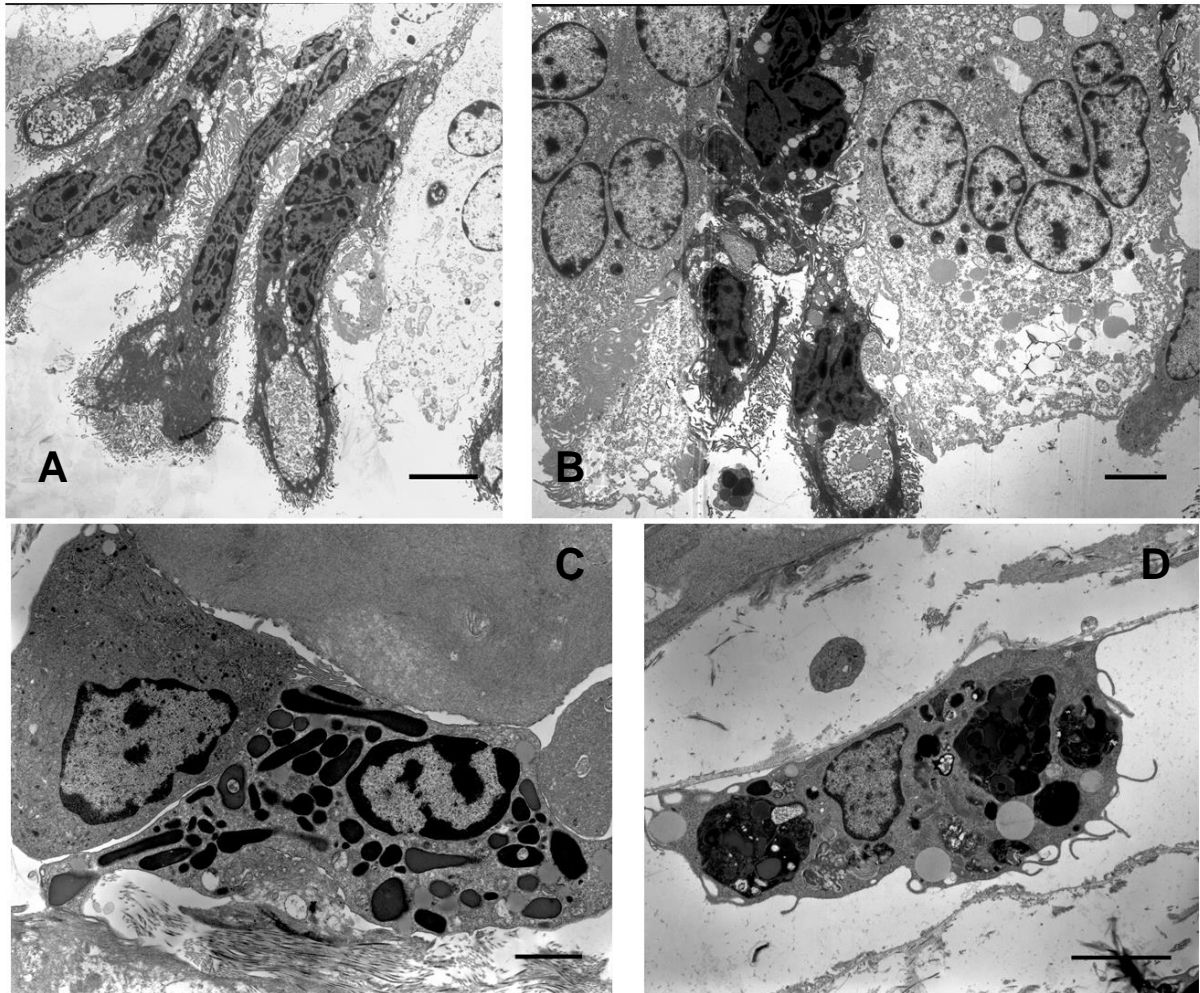


Figura 16 - Prancha com 3 fotomicrografias da lesão após 15 dias de cicatrização sob 23 °C.



(A) camadas da lesão, sendo de cima para baixo, coágulo, frente de migração da epiderme, tecido muscular com perda morfológica (barra de escala = 125  $\mu\text{m}$ ). (B) coágulo com secções musculares aprisionadas e camada de células gigantes abaixo do coágulo VEGF-A positivo (barra de escala = 60  $\mu\text{m}$ ). (C) musculatura abaixo do coágulo com perda morfológica VEGF-A positivas (barra de escala = 60  $\mu\text{m}$ ).

Figura 17 - Prancha com 4 eletromicrografias da lesão após 15 dias de cicatrização sob 23 °C.



(A) célula gigante eletrondensa localizada abaixo do coágulo, são observáveis inúmeros filopódios e núcleos com predomínio de heterocromatina e grandes vesículas repletas de material amorfo e gotículas lipídicas (barra de escala = 6  $\mu\text{m}$ ). (B) células gigantes eletrolucentes e eletrondensas, a célula eletrolucente possui citoplasma claro com núcleos bastante esféricos e predomínio de heterocromatina, existe ainda grânulos com textura heterogênea e gotículas lipídicas imersas no citoplasma (barra de escala = 4  $\mu\text{m}$ ). (C) macrófago e um heterófilo adjacentes localizados abaixo do coágulo (barra de escala = 2  $\mu\text{m}$ ). (D) macrófago com figuras de mielina, gotículas lipídicas citoplasmáticas e vesículas repletas de material eletrondenso amorfo localizado abaixo do coágulo (barra de escala = 4  $\mu\text{m}$ ). Fonte de A e B: (PRESSINOTTI et al., 2013)

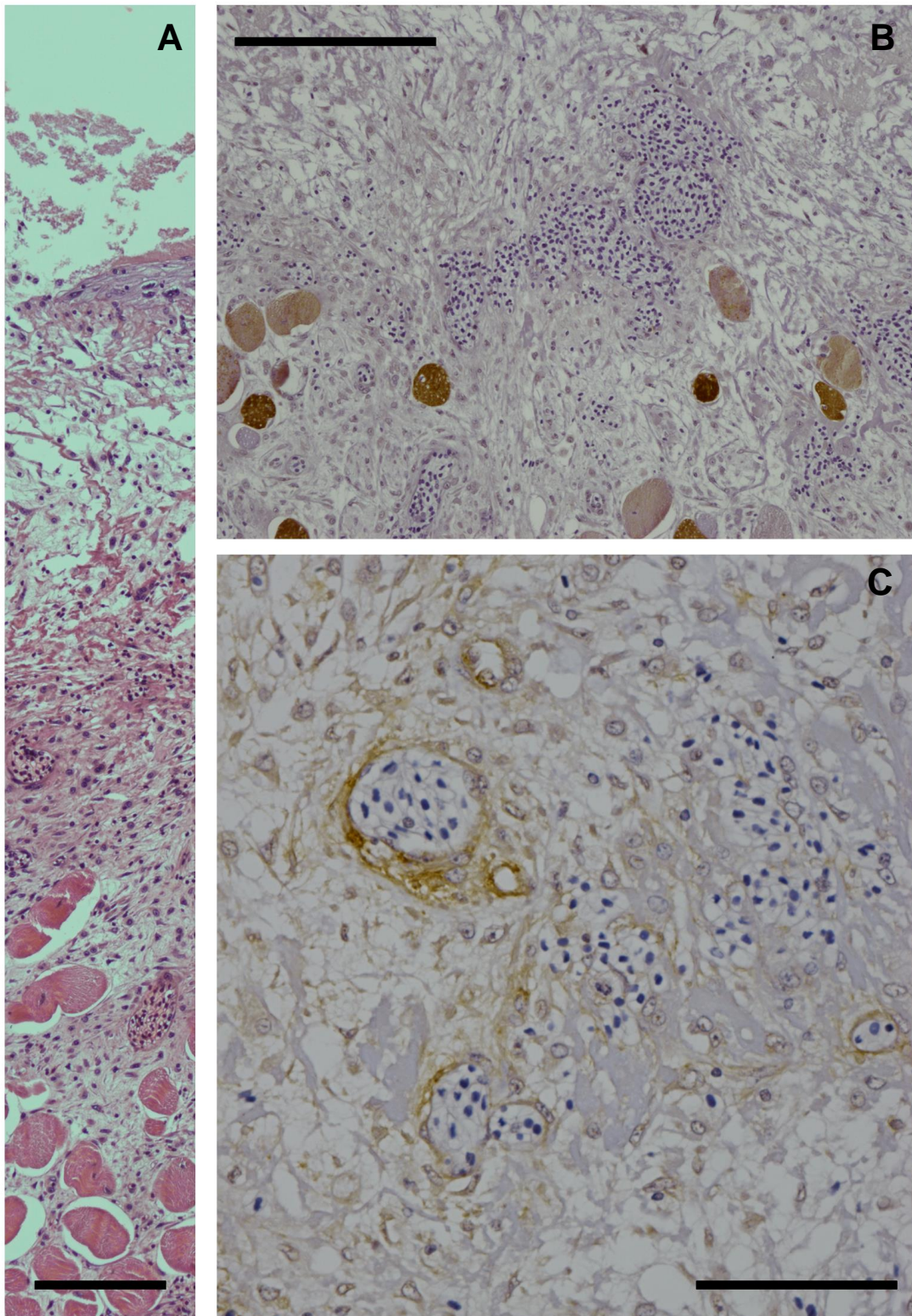
#### 4.4.9 Lesão dorsal após 30 dias a 23 °C

A epiderme, destacada pela imunomarcação por citoqueratina, ainda não recobre toda a lesão, sendo ela mais espessa no bordo da lesão e mais delgada nas porções centrais. O coágulo ainda está presente. Há diminuição drástica no infiltrado leucocitário, constituído predominantemente por linfócitos, macrófagos e miofibroblastos. A imunomarcação da actina- $\alpha$  confirma a existência de

miofibroblastos na matriz da lesão. Abaixo do coágulo surge uma pequena matriz amorfa. A imunomarcação do vWF revelou vasos de maiores diâmetros imersos na matriz e congestionados por eritrócitos (Figura 18). A imunomarcação do VEGF-A foi positiva para a epiderme, células gigantes e secções musculares (Figura 18). A marcação para PAS foi positiva para matriz amorfa recém sintetizada e coágulo. Foi identificado uma densa trama de reticulina nessa matriz amorfa (Figura 19). A imunomarcação por PCNA mantém o mesmo padrão de marcação, cabendo acrescentar positividade para células endoteliais, miofibroblastos, e raros aglomerados de linfócitos (Figura 19).



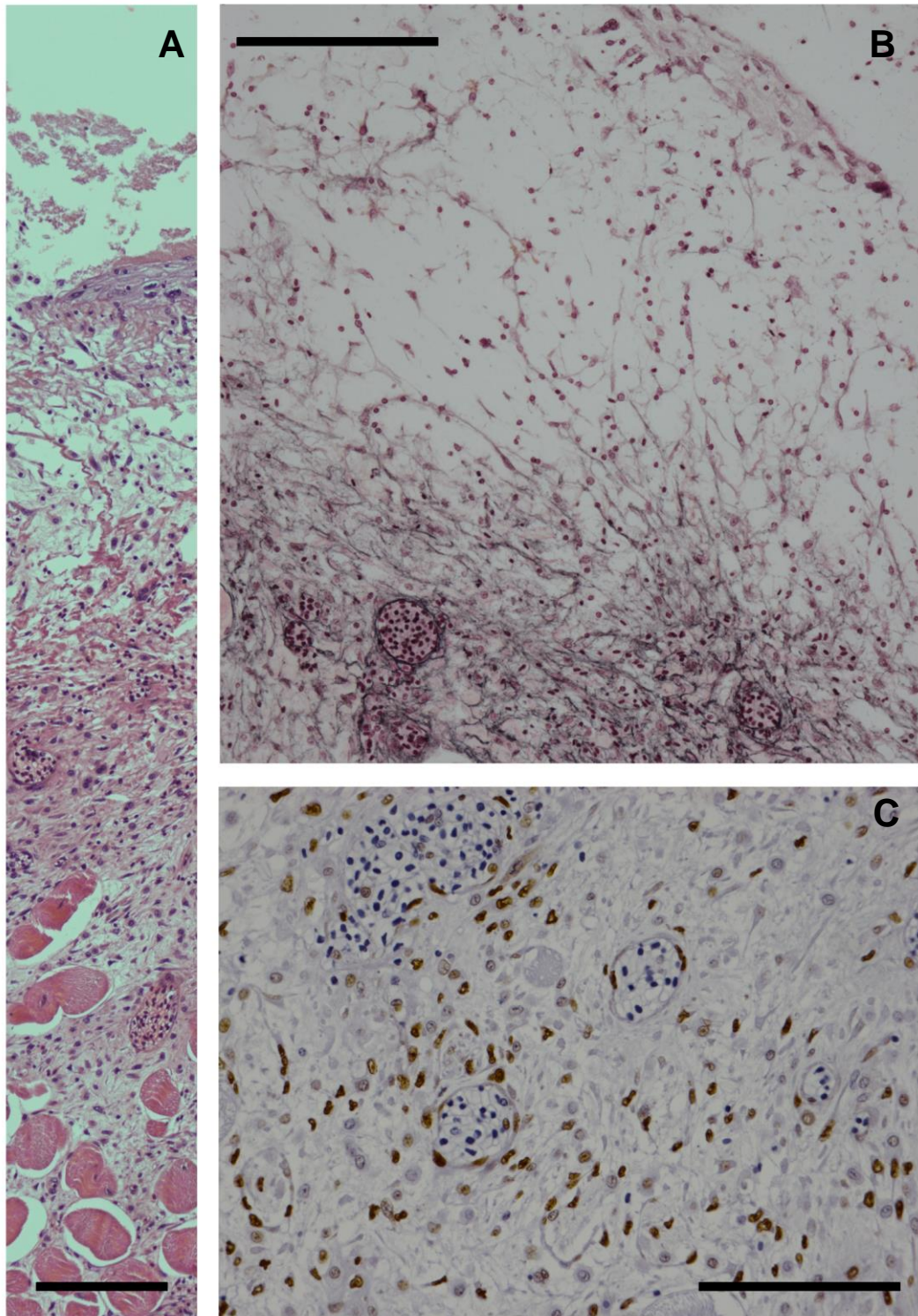
Figura 18 - Prancha com 3 fotomicrografias da região da lesão após 30 dias de cicatrização sob 23 °C.



(A) camadas da lesão, de cima para baixo, frente de migração da epiderme, matriz amorfa, derme em restituição e musculatura (barra de escala = 125  $\mu$ m). (B) secções musculares VEGF-A positivas e eritrócitos imersos na derme em restituição (barra de escala = 165  $\mu$ m). (C) vasos imersos na derme em restituição evidenciados pelo endotélio vWF positivos e alguns eritrócitos imersos nessa nova matriz. Os vasos evidenciados eram circulares, sem a sugestão de um direcionamento (barra de escala = 65  $\mu$ m).



Figura 19 – Segunda prancha com 3 fotomicrografias da região da lesão após 30 dias de cicatrização sob 23 °C.

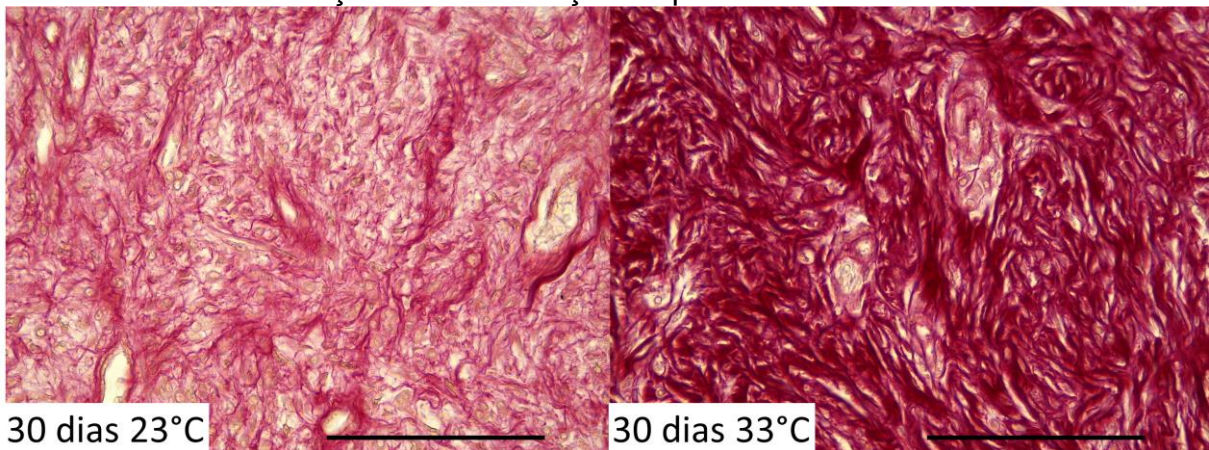


(A) camadas da lesão, de cima para baixo, frente de migração da epiderme, matriz amorfa, derme em restituição e musculatura (barra de escala = 125  $\mu$ m). (B) presença de reticulina na derme em restituição, sendo que as fibras diminuem de densidade ao se aproximar da epiderme, por fim, não foi observado reticulina na região de lâmina basal dessa nova epiderme (barra de escala = 125  $\mu$ m). (C) células endoteliais e do tecido de granulação são PCNA positivas (barra de escala = 85  $\mu$ m).

#### 4.5 Comparação entre as fibras da derme entre as temperaturas no prazo de 30 dias

Após 30 dias de cicatrização, não houve restauração da estrutura de estrato lúcido e compacto da derme em nenhuma das temperaturas, havendo apenas deposição de fibras colágenas desorientadas e passíveis de serem quantificadas (Figura 20).

Figura 20 - Prancha com duas fotomicrografias da derme de *C. yacare* após 30 dias de cicatrização sob a coloração de picrossirius.



A fotomicrografia da derme sob 23 °C apresentou uma menor densidade de fibras colágenas quando comparado com a fotomicrografia da derme mantida sob 33 °C (barra de escala = 120 µm). Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013).

Comparativamente a derme da cicatriz do animal mantido a 33 °C possui maior densidade de fibras colágenas por área quando comparado a 23 °C (Tabela 1).

Tabela 1 - Tabela destacando as mensurações das fibras colágenas coradas pelo picrossirius das cicatrizes dos animais mantidos nas duas temperaturas por 30 dias.

Tratamento	Número de imagens analisadas	% da área corada em vermelho (equivalente a % de colágeno na área amostrada)	Média da intensidade de vermelho do pixel na área amostrada (0-255)
30 dias a 23 °C	10	54.89 ± 22.43% <sup>a</sup>	131.44 ± 3.98 <sup>a</sup>
30 dias a 33 °C	10	97.32 ± 2.39% <sup>b</sup>	115.89 ± 6.60 <sup>b</sup>
Pele íntegra	10	98.58 ± 1.50% <sup>b</sup>	97.87 ± 9.43 <sup>c</sup>

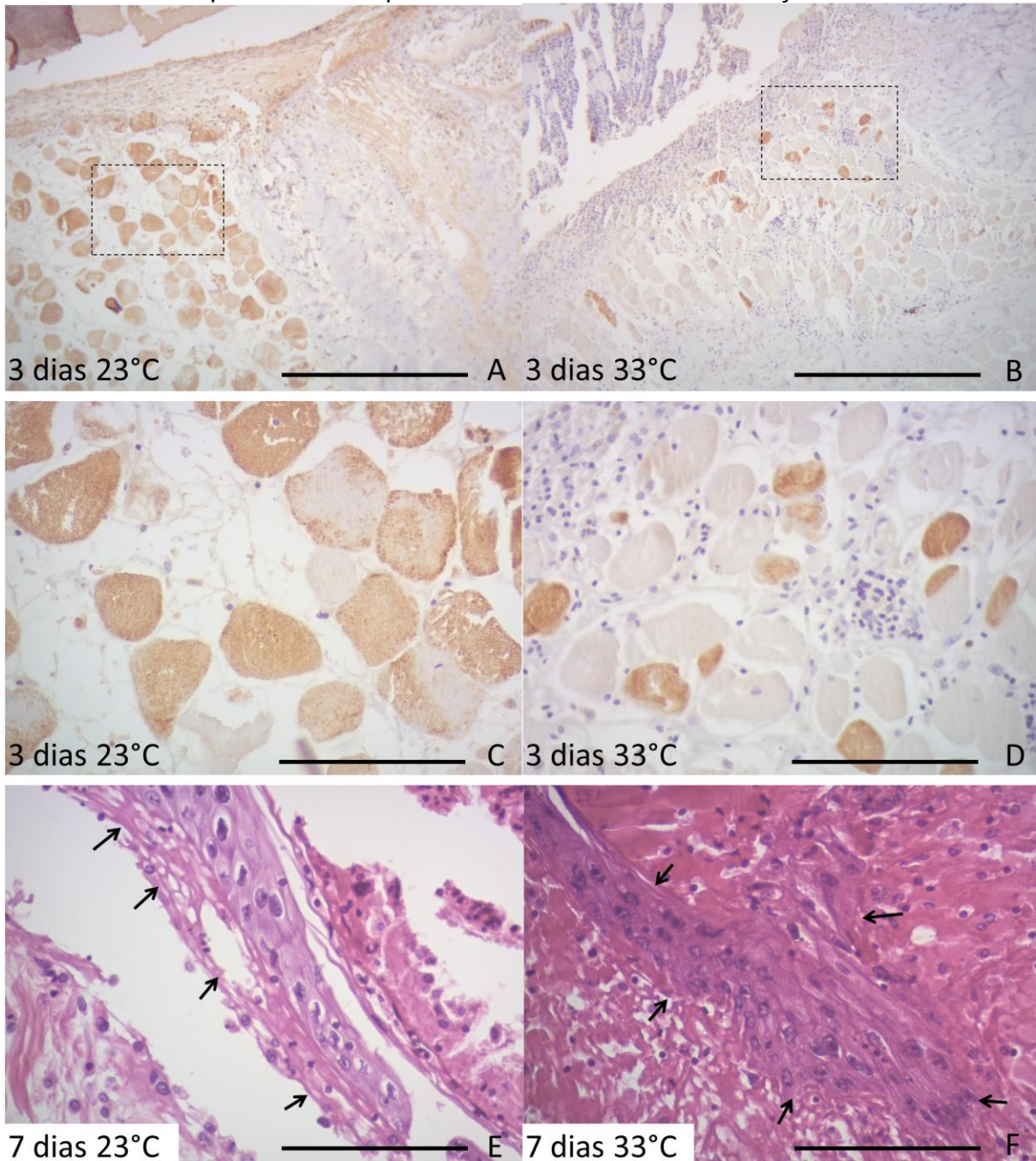
Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.01$ . Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013).



#### **4.6 Comparação das cicatrizações entre as temperaturas**

Aos 3 dias, os animais mantidos a 23 °C apresentam maior desprendimento de fibras musculares que ficam aprisionadas em meio ao coágulo. A imunomarcagem de VEGF é mais intensa na frente de migração epidérmica e mais frequente nas secções musculares quando comparado às lesões dos animais mantidos a 33 °C (Figura 21). Aos 7 dias, são evidenciados pontos de descontinuidade das fibras da derme sob 23 °C, evidenciado pelo frequente desprendimento da epiderme com a derme, enquanto que a epiderme permanece aderida a derme sob 33 °C (Figura 21).

Figura 21 - Prancha contendo 6 fotomicrografias comparando as lesões entre as temperaturas nos prazos de 3 e 7 dias de cicatrização.



(A e B) Fotomicrografias com secções musculares VEGF-A positivas nas quais é notório a maior marcação sob 23 °C (barra de escala = 500 µm). (C e D) detalhes das áreas em destaque das imagens A e B (barra de escala = 120 µm). (E e F) fotomicrografias que destacam a epiderme desprendida da derme sob 23 °C enquanto ela fica aderida sob 33 °C (barra de escala = 120 µm). Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013).

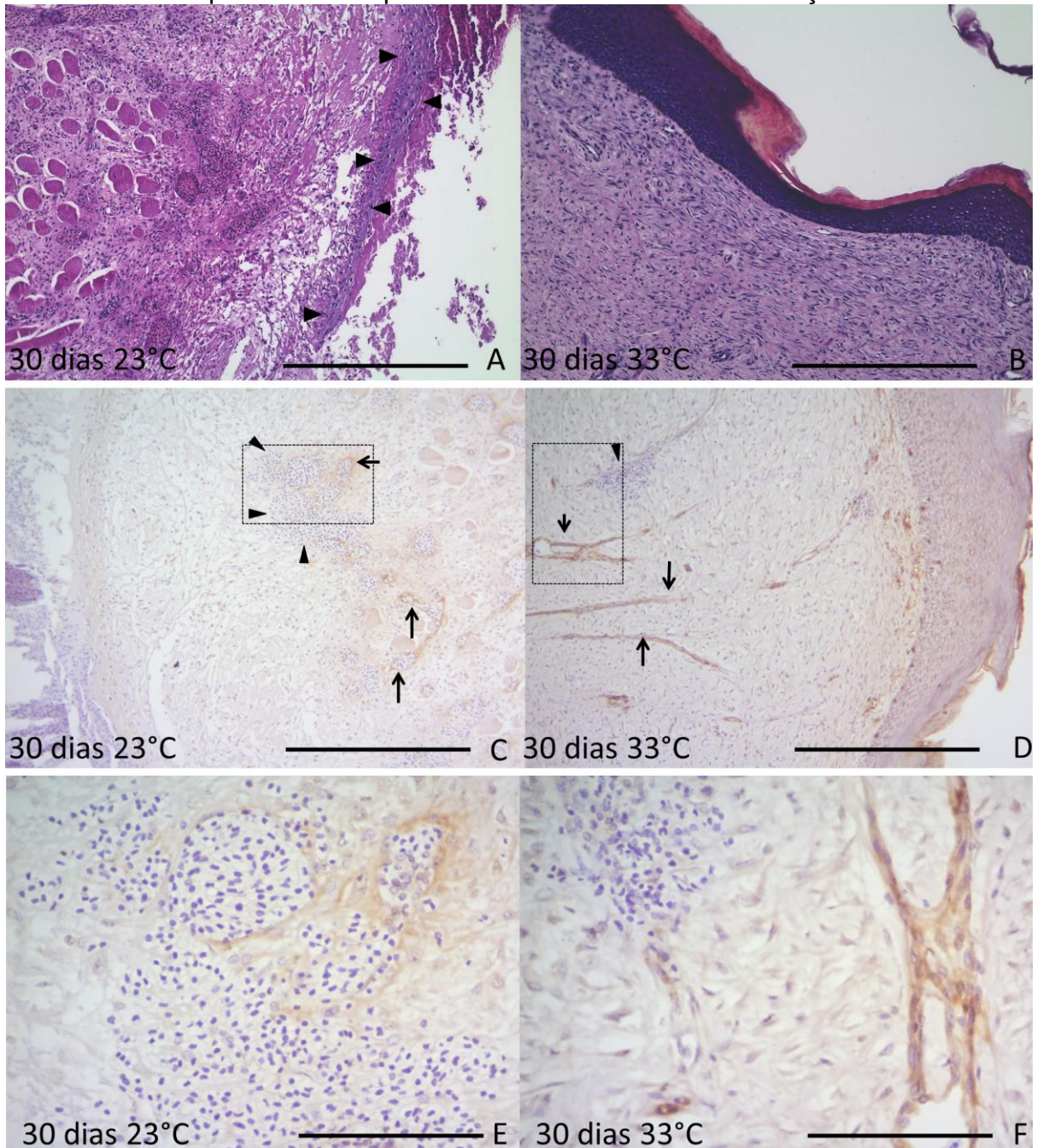
Aos 15 dias sob 33 °C, a derme possuía deposição de fibras colágenas, presença de fibroblastos e vasos, enquanto sob 23 °C permanecia com abundância de matriz amorfa, edema no tecido muscular e infiltrado inflamatório. A marcação de vWF revelou vasos neoformados na derme sob 33 °C, e a maioria desses vasos

estava congestionado por eritrócitos. Havia também acúmulos de eritrócitos imersos na matriz, não envolvidos por células endoteliais. Sob 23 °C a marcação de vWF foi positiva nas secções transversais de fibras musculares.

Aos 30 dias sob 33 °C, a derme encontra-se reconstituída, havendo diminuição no número de vasos congestionados por eritrócitos, densificação das fibras colágenas, enquanto que, sob 23 °C, a epiderme ainda não recobre a lesão, mantendo a matriz amorfa e tecido muscular com perda morfológica (Figura 22). A marcação de vWF sob 33 °C mostra que os vasos na derme estão perpendiculares entre os tecidos muscular e epidérmico, enquanto que essa mesma marcação sob 23 °C caracteriza formação de vasos na derme em início de restituição, sendo que esses vasos são frequentemente congestionados por eritrócitos, havendo também acúmulos de eritrócitos imersos na derme não envolvidos por células endoteliais (Figura 22). A marcação por VEGF foi maior em secções transversais musculares e frente de migração epidérmica sob 23 °C, enquanto não há mais marcação epidérmica sob 33 °C.



Figura 22 - Prancha contendo 6 fotomicrografias comparando as lesões entre as temperaturas nos prazos de 15 e 30 dias de cicatrização.



(A) frente de migração da epiderme sob 23 °C (cabeças de setas) que não recobre toda a lesão (barra de escala = 500 µm). (B) cobertura epidérmica concluída sob 33 °C (barra de escala = 500 µm). (C e D) células endoteliais vWF positivas revelando a existência de vasos neoformados na derme em restituição (barra de escala = 500 µm). (C) vasos redondos e eventualmente incompletos (setas), além de eritrócitos imersos na matriz (cabeça de setas) (barra de escala = 500 µm). (D) vasos alongados orientados perpendicularmente entre a epiderme e camada muscular (setas) (barra de escala = 120 µm). (E e F) detalhes das imagens em destaque em C e D (barra de escala = 120 µm). Fonte: (PRESSINOTTI et al., 2013).

Nas cicatrizes mantidas sob 33 °C, frequentemente eram observados agrupamentos de linfócitos PCNA positivos nos prazos de 15 e 30 dias, sendo esses agrupamentos raros sob 23 °C.

A marcação por reticulina revelou restituição da região de lâmina basal da epiderme regenerada após 30 dias, sob 33 °C. Por fim, o tecido muscular com perda morfológica frequentemente era PAS positivo em todos os tratamentos, sendo assim, a marcação desse tecido perdurou até o prazo de 30 dias sob 23 °C.

## 5 DISCUSSÃO

Estudar a cicatrização em crocodilianos pode ser promissor para compreender os componentes que contribuem para a tolerância desses animais a mutilações abruptas (SALCIDO, 2008). Além disso, os répteis são os únicos amniotos ectotérmicos, ocupando posição estratégica para elucidação do efeito da temperatura sobre seu sistema imunológico (ZIMMERMAN; VOGEL; BOWDEN, 2010) e na regeneração (ALIBARDI, 2014). Sendo assim, os resultados apresentados descrevem as diferenças nas características histológicas da cicatrização de *C. yacare* mantidos sob 23 e 33 °C, revelando os componentes que atuam durante a cicatrização e a diminuição da capacidade cicatricial frente à baixa temperatura.

Quanto aos resultados do procedimento cirúrgico, sempre houve a orientação de que o propofol é um bom anestésico sedativo para répteis, para o qual há um rápido retorno do paciente sem efeitos residuais (BENNETT, 1998; MOSLEY, 2005). No entanto a literatura recente já coloca o propofol como um anestésico preterido, que induz a uma sedação leve em répteis (SLADKY; MANS, 2012). Mais recentemente foi verificado sedação leve do propofol em *C. crocodilus*, havendo como principal efeito adverso a indução de apneia (JÚNIOR, 2013). Nesse sentido, é mais recomendado o uso de cetamina conjugado com midazolan que causou sedação profunda no *C. crocodilus*, havendo como principal contratempo a demora de retorno do paciente (HIRANO, 2011). Cabe destacar que os contratempos inerentes ao procedimento são oriundos de uma literatura ainda em discussão, e que todos os procedimentos foram acompanhados pelo médico veterinário Dr. Víctor Manuel Aleixo, que sugeriu o uso de uma anestesia local junto a sedação por propofol para garantir a segurança do procedimento. Nesse sentido, fica eleito para todos os futuros procedimentos cetamina com midazolan.

Macroscopicamente, o principal resultado é o evidente atraso no processo de restituição tecidual sob 23 °C, constatado pela demora na queda da massa coagulada que sela a lesão. Esse resultado está de acordo com o atraso na regeneração de cauda de lagartos *A. carolinensis* (MADERSON; LICHT, 1968), *Podarcis sicula*, *Podarcis muralis*, *Lampropholis delicata*, *Leiolopisma nigriplantare* e *Hoplodactylus maculatum* (ALIBARDI, 2010), e atraso da cicatrização em serpentes *Thamnophis sirtalis* (SMITH; BARKER; ALLEN, 1988) mantidos em diferentes

temperaturas, sendo que, quanto menor a temperatura, mais lenta é a regeneração. Além disso, foi verificada uma correlação inusitada, em que quanto maior for a área da lesão, mais ela retrai nas 24 horas seguintes, e quanto menor for a área da lesão, mais ela dilata nas 24 horas seguintes. Apesar da significância do resultado expresso na Figura 3, acreditamos tratar-se de um artefato oriundo da contração e relaxamento da musculatura da cauda. Portanto, a área da lesão deve permanecer constante ao longo da cicatrização. Esse resultado difere da cicatrização em *Notothenia cooriceps* que apresentou um padrão bastante organizado de dilatação por edemaciamento da lesão e retração por ação de miofibroblastos da derme (SILVA et al., 2004).

A primeira das etapas do processo de cicatrização é a inflamação (GURTNER et al., 2008). Nesse sentido, para entender o efeito da temperatura no processo de cicatrização é pertinente mencionar que os crocodilianos são animais ectotermos e que termorregulam comportamentalmente, por exemplo: *A. mississippiensis* desafiados com LPS assumem comportamento de procura por microambientes que garantam temperaturas corporais maiores (MERCHANT et al., 2007), modificando provisoriamente a zona de temperatura preferencial do organismo.

Cabe destacar que a zona de temperatura preferencial varia não apenas em relação ao estado de saúde do animal, mas também frente à espécie e temperatura de aclimatação dos animais (LI et al., 2009), portanto, os resultados obtidos para animais de uma determinada latitude pode não equivaler ao de outras latitudes. No entanto, os *C. yacare* possuem distribuição restrita, e apesar de haver na literatura mapas que apontam sua dispersão até porção sul da bacia do prata, o *C. yacare* é animal endêmico do bioma pantanal e possui preferencia térmica em torno de 32 e 34 °C (PINHEIRO; ANDREOTTI E SILVA; SANTOS, 2001). Existe o registro de temperaturas corporais de até 16,9 °C em *C. yacare* em ambiente natural (CAMPOS; COUTINHO; MAGNUSSON, 2005), abaixo da temperatura fria mantida nos tanques ( $23 \pm 2$  °C), sendo assim, a faixa de temperatura investigada abrange o nicho ecológico do *C. yacare* e está próxima a temperatura mínima crítica.

Microscopicamente é evidenciado o atraso na migração da epiderme sob 23 °C, fenômeno já relatado para queratinócitos de peixes desafiados por diferentes temperaturas (REAM; THERIOT; SOMERO, 2003). O atraso na migração da epiderme sob 23 °C justifica a manutenção do coágulo sobre a lesão mesmo após 30 dias.

O retardo para a formação de uma nova epiderme permite um ambiente propício para infecções. Associado a isso, cabe destacar que a estrutura dos tanques, e a manutenção dos jacarés com uma troca de água a cada 24 horas, não é suficiente para a manutenção de uma água isenta de restos de alimento ou dejetos, sendo esse um ambiente propício para proliferação bacteriana. Além disso, é sabido que diversos mecanismos do sistema imunológico inato de crocodilianos diminuem sua eficiência frente à diminuição de temperatura (MERCHANT; BRITTON, 2006; MERCHANT; HEARD; MONROE, 2009; MERCHANT et al., 2004, 2003, 2005; SIROSKI et al., 2011). Sendo assim, em baixas temperaturas, o ferimento fica exposto por períodos maiores, isso somado as dificuldades do manejo em manter água totalmente limpa, e ainda a diminuição da atividade do sistema imunológico. Todos esses componentes representam uma combinação perigosa para condições de cultivo, uma vez que são favorecidas infecções e é diminuída a capacidade de reação por parte da defesa imunológica do animal. Porém, pouco se conhece sobre as variações do sistema imunológico de *C. yacare* frente à variação da temperatura (MERCHANT et al., 2006b; SIROSKI et al., 2011).

Os heterófilos atuam na fagocitose para reabsorção de restos e debris celulares além de defesa (MONTALI, 1988) e são os leucócitos mais frequentes frente a desafios inflamatórios (MERCHANT et al., 2006a). Inclusive, os heterófilos se aglomeram pela presença de patógenos extracelulares, formando um granuloma heterofílico (MONTALI, 1988), portanto, o coágulo com predomínio de heterófilos pode ser também chamado de granuloma heterofílico. Há a possibilidade do granuloma heterofílico/coágulo contribuir com a ação microbicida (ALIBARDI, 2010), afirmação essa corroborada pela detecção de ação bactericida promovida por extrato peptídicos de leucócitos de *A. mississippiensis* (MERCHANT et al., 2006c), e o peptídeo bactericida “Iecrocina” isolado de extratos leucocitários de *Crocodylus siamensis* (PATA et al., 2011). Nesse sentido, torna-se compreensível a habilidade do *C. yacare* tolerar uma solução de continuidade por até 30 dias sob 23 °C, sem cobertura epidérmica. Possivelmente o coágulo/granuloma heterofílico apresenta potencial de barrar a solução de continuidade e atribui propriedades bactericidas à estrutura.

O granuloma heterofílico frequentemente é envolto por células gigantes multinucleares (MONTALI, 1988), como verificado também em nossos resultados desde os 3 dias de cicatrização, em que são evidenciadas as camadas paliçádicas



de células gigantes multinucleadas, e também de acordo com os achados para *A. mississippiensis* desafiados com turpentine (MATEO; ROBERTS; ENRIGHT, 1984). A coloração de Rosenfeld permitiu reconhecer os pigmentos visualizados nos vacúolos dos macrófagos, como restos de heterófilos (pigmentos eosinofílicos), e pigmentos de melanina de coloração castanho escuros, principalmente nas lesões dorsais, onde há maior número de células pigmentadas, além de fagossomos repletos de debris. Portanto, essa camada paliçádica de células gigantes, assim como os macrófagos, atuam também na faxina do tecido amorfo abaixo do coágulo.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) faz parte de uma família de citocinas que atua de forma parácrina, permitindo a angiogênese saudável e restituição das funções teciduais, enquanto que seu desbalanço pode resultar na formação de tecido de granulação e desregulação da regeneração (WERNER; GROSE, 2003). A maior imunodeteção do VEGF observada nas secções de fibras musculares e na frente de migração da epiderme, sob 23 °C, estão relacionadas com a persistência do quadro inflamatório/proliferativo, portanto, a camada muscular continua a secretar VEGF mesmo após 30 dias. Além disso, peixes ectotermos tendem a promover a angiogênese no tecido muscular quando aclimatados ao frio como forma de compensar o débito de difusão de oxigênio no tecido (EGGINTON, 2002).

O não fechamento da epiderme, além de perpetuar o quadro inflamatório, inviabiliza o direcionamento dos novos vasos, pois, não havendo epiderme, a formação de um gradiente de concentração de VEGF fica prejudicado (EILKEN; ADAMS, 2010). Ao contrario do que foi observado aos 15 e 30 dias sob 33 °C, em que houve restituição da epiderme e formação de vasos com trajeto entre tecido muscular até próximo a epiderme.

Estudos em lagartos *Eublepharis macularius* não foram conclusivos quanto a necessidade *sine qua non* da angiogênese para a restituição tecidual, apesar do forte indicio da necessidade de novos vasos para uma regeneração mais rápida (PAYNE, 2012). Independente da necessidade de novos vasos para que ocorra a regeneração, o presente estudo sugere que a ausência da epiderme compromete o direcionamento de novos vasos.

A falta de adesão da epiderme sob 23 °C, relatada para os prazos de 7 e 15 dias, sugere problemas quanto a restituição da derme. Essas observações são corroboradas pelos achados com a coloração de picrossirius, que cora as fibras

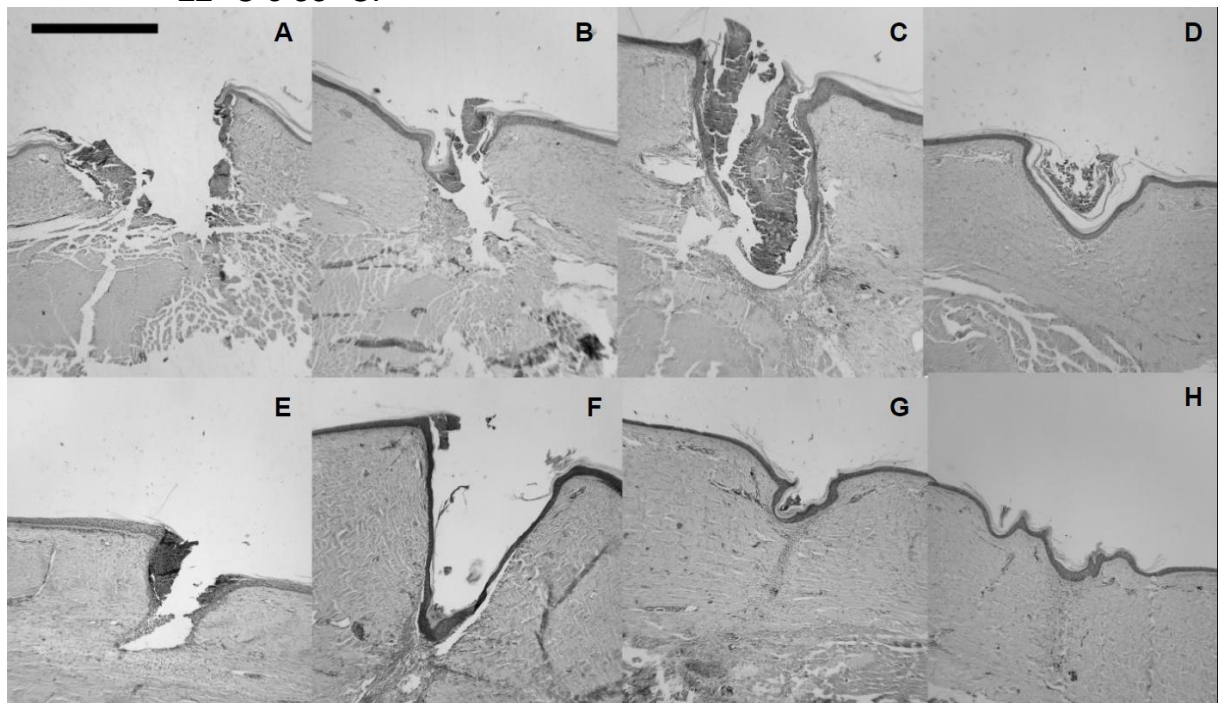
colágenas da derme em vermelho, e a coloração argentófila para reticulina, que revelou baixa densidade dessas fibras na derme sob 23 °C. A coloração de picrossirius mostra que apenas aos 30 dias sob 23 °C foi verificada a reposição de fibras colágenas na derme, enquanto que sob 33 °C é verificada a reposição de fibras colágenas desde os 15 dias. Além disso, as fibras da derme restituída sob 23 °C não correspondem ao mesmo tipo de fibra colágena do tecido original, ou mesmo restituído sob 33 °C. As diferenças foram mais bem evidenciadas pela tabela 1, onde a densidade de colágeno mostrou-se significativamente diferente nos 3 tratamentos observados, sendo que as cicatrizes com 30 dias sob 23 °C apresentou menor intensidade de coloração dos pixels vermelhos, aumentando significativamente sob 33 °C e pele íntegra. Portanto a temperatura, não apenas impediu o fechamento da lesão, como também alterou a densidade da derme.

Para que ocorra angiogênese, entre diversas etapas, há a necessidade de formação de matriz extracelular e migração de células endoteliais (EILKEN; ADAMS, 2010). A dificuldade em formar novos vasos sob 23 °C, também está relacionada com a escassez de matriz extracelular, como evidenciado pela coloração de picrossirius. Portanto, a temperatura influencia os componentes da matriz extracelular e na ação das células do blastema. Cabe destacar que a marcação por actina- $\alpha$  sugere que a quantidade de miofibroblastos presentes na derme sob 33 °C aos 30 dias é maior que sob 23 °C, o que justifica as diferenças na deposição de fibras supracitadas.

Sob 33 °C, a partir dos 15 dias, foram evidenciados agrupamentos de linfócitos infiltrados na derme, sempre associados a vasos sanguíneos. Estudos, em tartarugas *Mauremys caspica*, demonstraram maior capacidade de proliferação de linfócitos na primavera, ou seja, há influência da sazonalidade na proliferação dos linfócitos (MUÑOZ; DE LA FUENTE, 2013). Além disso, mensurações na proliferação de tímócitos de ratos foram utilizados para inferir quanto a produção de IL-1 em *H. flaviviridis* desafiados por LPS sob diferentes temperaturas, e foi constatada a temperatura ótima de 25 °C, havendo diminuição da proliferação dos tímócitos em temperaturas acima e abaixo (MONDAL; RAI, 2001). Os resultados de efeito sazonal sobre a proliferação de linfócitos em *M. caspica* podem estar relacionados a temperatura média ótima durante a primavera. Além dos estudos em répteis já mencionados, há também o relato da diminuição da capacidade proliferativa dos linfócitos do anfíbio *R. pipiens* quando mantidas a 5 °C (MANIERO;

CAREY, 1997). Nesse sentido, cabe destacar que o aumento da população de linfócitos correlaciona com a ausência de regeneração em caudas de lagartos (ALIBARDI, 2014). Se considerarmos a ultima etapa da cicatrização, o remodelamento tecidual, etapa equivalente a regeneração da integridade da pele, poderia supor que a presença dos linfócitos sob 33 °C podem ser prejudiciais ao remodelamento da derme, enquanto que cicatrizes sob 23 °C podem remodelar de forma mais eficaz. Resultados promissores foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisas quando verificada a cicatrização de uma lesão incisiva sob as temperaturas de 22 °C e 33 °C, no qual foi verificado remodelamento das fibras da derme sob 22 °C (Figura 23), no entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa relação entre temperatura e remodelamento.

Figura 23 - Fotomicrografias da cicatrizações de incisões em diferentes prazos sob 22 °C e 33 °C.



(A) cicatriz após 3 dias sob 22 °C. (B) cicatriz após 7 dias sob 22 °C. (C) cicatriz após 15 dias sob 22 °C. (D) cicatriz após 30 dias sob 22 °C, é possível verificar a persistência do coágulo e que existem fibras contínuas de um lado ao outro da derme. (E) cicatriz após 3 dias sob 33 °C. (F) cicatriz após 7 dias sob 33 °C. (G) cicatriz após 15 dias sob 33 °C. (H) cicatriz após 30 dias sob 33 °C, é possível verificar a imperfeição da derme justamente no foco da injúria (barra de escala = 1000 µm). Fonte: (LIMA, 2011)

A ausência de reticulina na região da lâmina basal antes de 30 dias sob 33°C, abaixo da epiderme regenerada, é sugestiva de que a barreira entre epiderme e derme não esteja completa, permitindo maior troca de citocinas, como o VEGF, no

sentido epiderme-derme. Resultado corroborado pelos achados de descontinuidade da lâmina basal de *A. carolinensis* visualizados sob MET (ALIBARDI, 2010).

Cabe destacar a importância da camada paliçádica de células gigantes multinucleadas, fibras musculares e epiderme para a regeneração, uma vez que todas essas células marcaram positivamente para vWF, VEGF e PCNA, além disso, houve também a marcação por PAS na matriz amorfa e nas fibras musculares edemaciadas ou com perda da integridade morfológica. Portanto, a plasticidade e participação desses tecidos merecem maiores estudos.

A perpetuação de agrupamentos de eritrócitos imersos na derme aos 30 dias sob 23 °C, assim como o atraso na angiogênese sob 23 °C, pode estar relacionada a alterações cardio respiratórias decorrentes da baixa temperatura. Tal afirmação pode ser corroborada pelas observações em serpentes *Thamnophis sirtalis*, que tendem a diminuir a circulação caudal e aumentar a circulação cefálica quando mantidas em baixa temperatura (AMIEL et al., 2011). Assim como as alterações no consumo de  $VO_2$  em *Crocodylus porosus* (CAMPBELL et al., 2013). Sendo assim, a baixa temperatura pode comprometer não apenas a velocidade das reações, mas também o aporte de células e moléculas necessárias para restituição tecidual, assim como a drenagem vascular da cauda.

A temperatura de 23 °C compromete não apenas o conjunto de atividades necessárias para a restituição tecidual, diminuindo também o apetite do organismo, como observado informalmente em nossos experimentos e relatado em estudos com serpentes (SMITH; BARKER; ALLEN, 1988).

Por vezes a discussão sobre o efeito da baixa temperatura na cicatrização em ectotermos é considerado um assunto esgotado, em que a cicatrização, como um todo sincrônico, tem suas reações todas deprimidas (ALIBARDI, 2014). No entanto, relegar essa discussão pode negligenciar os potenciais efeitos contraditórios da temperatura em partes dos processos participantes da cicatrização, como por exemplo a angiogênese em peixes temperados aclimatados ao frio em condições fisiológicas (EGGINTON, 2002). Ou o potencial melhor remodelamento da derme mantida em baixa temperatura durante uma cicatrização de uma incisão, como descrito acima.

Diante dos resultados obtidos, é necessário mencionar que para fins comerciais da criação de *C. yacare*, no que diz respeito à manutenção da integridade da pele, recomenda-se que jacarés lesionados sejam mantidos a 33 °C,

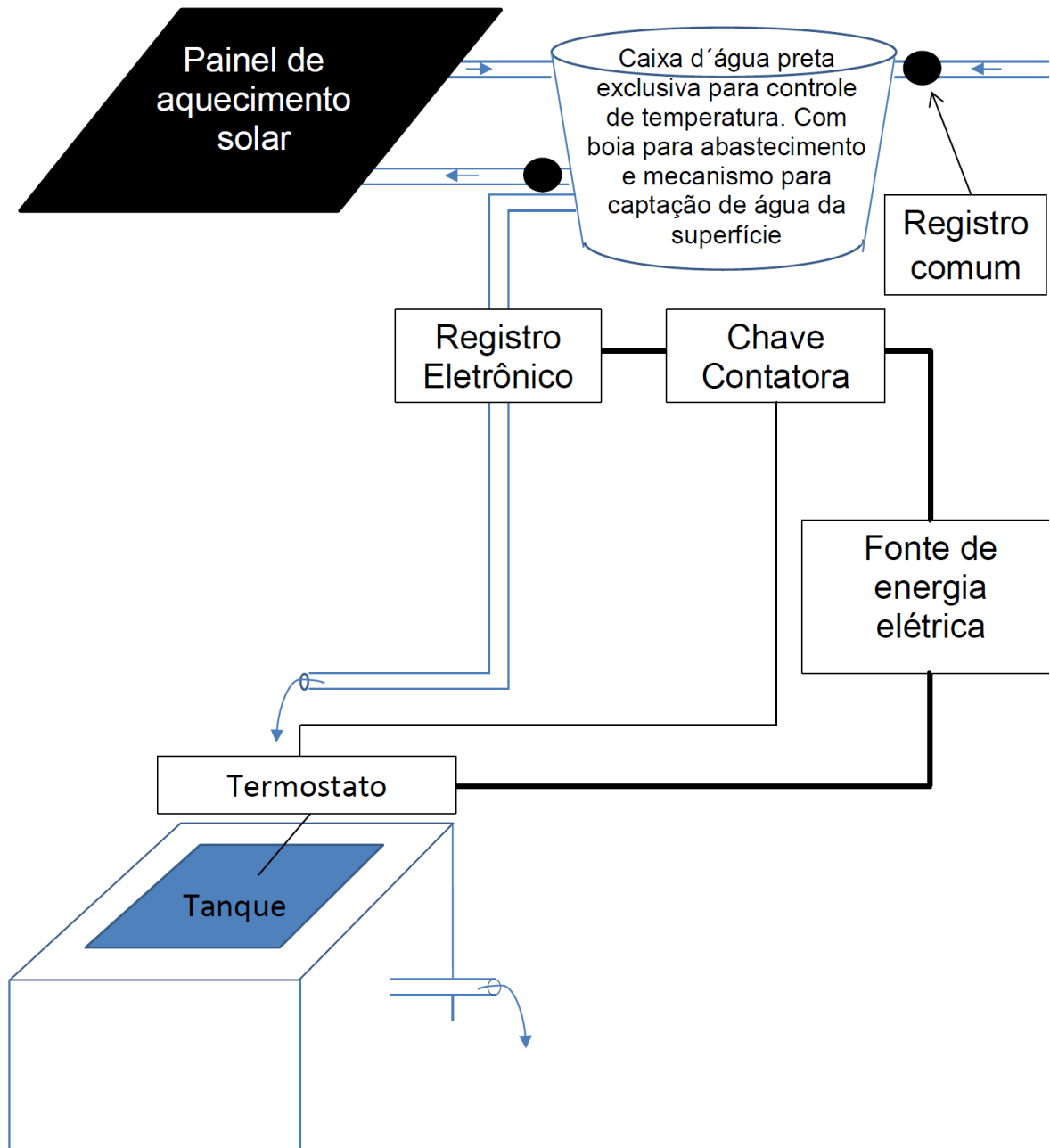
principalmente se os tanques estiverem frios, permitindo o fechamento mais ágil da epiderme e melhor desempenho do sistema imunológico (MITCHELL; DIAZ-FIGUEROA, 2004). Não foram evidenciados primórdios de osteodermos, e, além disso, a derme, mesmo restituída sob 33 °C, apresenta padrão de fibras significativamente diferente em relação à pele íntegra, ou seja, o *C. yacare*, forma uma cicatriz que pode inviabilizar o aproveitamento da pele como couro, mesmo assim, a cicatrização sob 33 °C é recomendável em termos de densidade de fibras na derme.

A relação entre temperatura e história natural do *C. yacare* é alvo de muitas pesquisas. Foi verificado que filhotes de *C. yacare* têm desenvolvimento mais rápido dentro do ovo e crescimento pós-nascimento melhor em temperaturas de 31,2 a 31,8 °C, sendo que o perímetro abdominal fica maior em temperaturas próximas a 30,0 °C (MIRANDA et al., 2002). Nos meses frios, já foi registrado uma média mensal de temperatura corporal de 23,8 °C (CAMPOS; COUTINHO; MAGNUSSON, 2005), e mesmo não havendo uma correlação entre crescimento de *C. yacare* silvestre com as médias de temperaturas ambientais (CAMPOS et al., 2014), é pertinente sugerir o controle de temperaturas para os meses frios, principalmente para os filhotes recém-coletados, que possuem uma relação superfície corporal e volume desfavorável para retenção de temperatura, como aferido nas diferenças de temperatura entre porção central do corpo e apêndices (SANTOS, 2006).

Nesse sentido, cabe mencionar que as estruturas de cultivo de *C. yacare* não obedecem nenhum padrão, sendo as mesmas oriundas de um empirismo não registrado na literatura formal. Sendo assim, se almeja iniciar as discussões quanto a possibilidade de aprimorar as arquiteturas vigentes pela proposta de um sistema de controle de temperatura da água por energia solar (Figura 24). Porém, faz se necessário mencionar que essa é uma proposta que precisa ser testada em termos de manejo para avaliar sua viabilidade.



Figura 24 - Esquema ilustrativo de proposta de controle de temperatura por aquecimento solar para os momentos em que as temperaturas são frias.



Proposta de controle de temperatura dos tanques à partir da energia solar. Nessa proposta, um termostato eletrônico afere constantemente a temperatura da água. Quando a água diminuir a temperatura até o mínimo crítico, esse termostato aciona uma chave contatora que abre um registro eletrônico. A água quente que foi armazenada na caixa d'água à partir do aquecimento feito pelo painel solar "chove" sobre o tanque, até que se atinja temperaturas acima do mínimo crítico, à fim de evitar temperaturas extremas para o nicho ecológico do jacaré.

Cabe mencionar ainda que o *C. yacare* é uma das espécies com a população mais vigorosa do mundo dentre os crocodilianos (FARIAS et al., 2013). O que

permite a exploração comercial da espécie no Brasil pelo sistema “Ranching” que abrange coleta de ovos na natureza e é autorizado pela portaria nº126 (BRASIL, 1990). Portanto, a oportunidade de ingresso de agentes infecciosos, dos organismos silvestres, no cultivo, é potencializada a cada coleta de ovos e/ou filhotes na natureza. Nesse sentido, há a necessidade de garantir condições ideais para que os organismos tolerem o ingresso desses microrganismos no criadouro a cada período de coleta de ovos.

Esse trabalho elucidou pela primeira vez o efeito da temperatura na capacidade cicatricial de *C. yacare*, e permite inferir que a temperatura de 33 °C, temperatura ótima preferencial, é melhor para a cicatrização. Tais achados devem ser inclusos nas discussões quanto ao manejo da espécie, além de elucidar aspectos histológicos do processo de restituição tecidual em crocodilianos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O anestésico eleito para futuros procedimentos em *C. yacare* é cetamina conjugado com midazolan, ou propofol para relaxamento muscular e anestesia local para procedimento.
- *C. yacare* diminui alimentação em 23 °C.
- *C. yacare* não possui padrão de dilatação ou retração do bordo da lesão.
- A epiderme recobre toda a lesão sob 33 °C aos 30 dias, não havendo mais coágulo sobre a lesão.
- O coágulo se mantém sobre a lesão sob 23 °C mesmo após 30 dias.
- Foi verificada a efetividade da reação cruzada entre anticorpos voltados para outras espécies com as proteínas de *C. yacare*.
- A matriz amorfa evidenciada pela coloração de PAS é menor sob 23 °C.
- Há menor concentração de linfócitos infiltrados na derme sob 23 °C.
- Os miofibroblastos são visualizados em grandes concentrações sob 33 °C a partir de 15 dias.
- Mesmo sem o fechamento da epiderme há como evidenciar poucos miofibroblastos na região da derme a partir de 30 dias.
- Mesmo sob 33 °C as fibras colágenas não remodelaram de forma a restituir a organização original do tecido.
- Novos vasos perpendiculares a epiderme são visualizados sob 33 °C a partir dos 15 dias, enquanto sob 23 °C, há apenas alguns vasos sem orientação após 30 dias.
- É recomendável cuidados com a temperatura para filhotes de *C. yacare* lesionados durante os meses frios.

## REFERÊNCIAS\*

- ALFÖLDI, J. et al. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 587–591, 2011.
- ALIBARDI, L. **Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb Regeneration in Lizards – A model system with implications for tissue regeneration in mammals**. 1<sup>th</sup> Edition, Springer, v. 207, p. 112, 2010.
- ALIBARDI, L. Histochemical, Biochemical and Cell Biological aspects of tail regeneration in lizard, an amniote model for studies on tissue regeneration. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 143–244, 2014.
- ALIBARDI, L.; LOVICU, F. J. Immunolocalization of FGF1 and FGF2 in the regenerating tail of the lizard *Lampropholis guichenoti*: implications for FGFs as trophic factors in lizard tail regeneration. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 5, p. 459–473, 2010.
- ALIBARDI, L.; TONI, M. Wound keratins in the regenerating epidermis of lizard suggest that the wound reaction is similar in the tail and limb. **Journal of Experimental Zoology Part A**, v. 860, p. 845–860, 2005.
- ALONSO, M. et al. Effect of induced triploid on fin regeneration of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, p. 493–502, 2000.
- ALVES, R. R. N.; OLIVEIRA, T. P. R.; ROSA, I. L. Wild animals used as food medicine in Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 12, 2013.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Trade of Animals Used in Brazilian Traditional Medicine: Trends and Implications for Conservation. **Human Ecology**, v. 38, n. 5, p. 691–704, 2010.
- AMIEL, J. J. et al. Temperature-dependent regulation of blood distribution in snakes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. Pt 9, p. 1458–1462, 2011.
- AXELSSON, M.; FRANKLIN, C. E. From Anatomy to Angioscopy: 164 Years of Crocodylian Cardiovascular Research, Recent Advances, and Speculations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118, n. 1, p. 51–62, 1997.
- AYALASOMAYAJULA, S. et al. Potential of Alligator Fat as Source of Lipids for Biodiesel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 4, p. 2166–2169, 2012.
- BAMPI, M.; COUTINHO, M. **Policy for the Conservation and management of jacaré (*Caiman yacare*) in Brazil** (J. P. Ross, Ed.) In: International Workshop for Management and Trade of Caiman yacare International Workshop for Management and Trade of *Caiman yacare*. **Anais**. Gainesville, Florida, USA: Crocodile Specialist Group Florida, 2003 Disponível em: <<http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/2003-027.pdf#page=52>>. Acesso em: 28 fev. 2014
- BARROS, F. B. et al. Medicinal use of fauna by a traditional community in the Brazilian Amazonia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, p. 37, 2012.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BASSETTI, L. A. et al. Thermoregulation in captive broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Zoological Studies**, v. 53, n. 1, p. 9, 2014.
- BENNETT, R. A. Reptile anesthesia. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 7, n. 1, p. 30–40, 1998.
- BOLKER, J. Model organisms: There's more to life than rats and flies. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 31–33, 2012.
- BOLONHA, F. J. **Cicatrização no Curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)**. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em biologia celular e tecidual como requisito para obtenção do título de Mestre, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.
- BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 4, p. 516–559, 2009.
- BRASIL. **LEI Nº 5.197, DE 3 DE JANEIRO DE 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências.**, 1967. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l5197.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l5197.htm)>
- BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria no 126 de 13 de fevereiro de 1990**, 1990.
- BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA IBAMA 169, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2008**, 2008. Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes\\_normativas/IN\\_n\\_169\\_manejo\\_ex\\_situ.pdf](http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes_normativas/IN_n_169_manejo_ex_situ.pdf)>
- BRASIL. **g100 Municípios populosos com baixa receita per capita e alta vulnerabilidade socioeconômica**, Vitória-ES, Frente nacional dos Prefeitos, 2013.
- CAMPBELL, H. A. et al. Hatchling Crocodiles Maintain a Plateau of Thermal Independence for Activity, but at What Cost? **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 1, p. 11–14, 2013.
- CAMPOS, Z. et al. Growth of *Caiman crocodilus yacare* in the Brazilian Pantanal. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89363, 2014.
- CAMPOS, Z.; COUTINHO, M. E.; OLIVEIRA, T. M. DE. Abate humanitário de crocodilianos. **Circular Técnica 59, EMBRAPA Pantanal**, v. 59, p. 2, 2005.
- CAMPOS, Z.; COUTINHO, M.; MAGNUSSON, W. Comportamento de termorregulação do jacaré-do-pantanal, *Caiman crocodilus yacare*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 51, EMBRAPA Pantanal**, v. 51, 2003.
- CAMPOS, Z.; COUTINHO, M.; MAGNUSSON, W. Estivação de jacarés no Pantanal Sul. **Comunicado Técnico 39, EMBRAPA Pantanal**, v. 39, p. 1–3, 2004.
- CAMPOS, Z.; COUTINHO, M.; MAGNUSSON, W. E. Field body temperatures of caimans in the pantanal, Brazil. **Herpetological Journal**, v. 15, p. 97–106, 2005.
- CAMPOS, Z.; MAGNUSSON, W. Emergence behaviour of yacare caimans (*Caiman crocodilus yacare*) in the Brazilian Pantanal. **The Herpetological Journal**, v. 21, n. 1, p. 91–94, 2011.



- CAMPOS, Z.; MOURÃO, G.; COUTINHO, M. Avaliação de três modelos de manejo para o jacaré-do-Pantanal. **Comunicado Técnico 46, EMBRAPA Pantanal**, v. 46, p. 1–4, 2005.
- CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L. Influence of low environmental temperature on inflammation in bullfrog (*Rana catesbeiana*): qualitative and quantitative evaluation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, 1999.
- CLAVER, J. A.; QUAGLIA, A. I. E. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 2, p. 87–97, 2009.
- CUNHA DA SILVA, J. R. M. et al. Microscopical study of experimental wound healing in *Notothenia coriiceps* (Cabeçuda) at 0 degrees C. **Cell and Tissue Research**, v. 321, n. 3, p. 401–410, 2005.
- DE MOURA, W. L.; OLIVEIRA, L. W.; EGAMI, M. I. ASPECTOS Ultraestructurales de trombocitos, eosinofilos y heterófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 15, n. 2, 1997.
- DELORME, S. L. **Scar-free wound healing and regeneration in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*)**. Thesis presented to The University of Guelph in partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science in Biomedical Sciences, Guelph, Ontario, Canada, p. 166, 2011.
- DELORME, S. L.; LUNGU, I. M.; VICKARYOUS, M. K. Scar-free wound healing and regeneration following tail loss in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. **Anatomical record**, v. 295, n. 10, p. 1575–1595, 2012.
- EGGINTON, S. Temperature and angiogenesis: the possible role of mechanical factors in capillary growth. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 773–787, 2002.
- EILKEN, H. M.; ADAMS, R. H. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 617–625, 2010.
- FARIAS, I. P. et al. Avaliação do risco de extinção do jacaré-do-pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 21–30, 2013.
- FERNANDES, V. R. T. et al. Yacare caiman (*Caiman yacare*) trim hamburger and sausage subjected to different smoking techniques. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 94, n. 3, p. 468–472, 2014.
- FISHER, R. E. et al. A histological comparison of the original and regenerated tail in the green anole, *Anolis carolinensis*. **Anatomical Record**, v. 295, n. 10, p. 1609–1619, 2012.
- GILBERT, R. W. D. **Characterization of TGF  $\beta$  signaling during epimorphic tissue regeneration: an example using the leopard gecko (*Eublepharis macularius*) tail regeneration model**. Thesis presented to The University of Guelph in partial fulfillment of requirements for the degree of Masters of Science in Biomedical Sciences, The University of Guelph, Guelph, Canada, p. 111, 2013.
- GILBERT, R. W. D.; VICKARYOUS, M. K.; VILORIA-PETIT, A. M. Characterization of TGF $\beta$  signaling during tail regeneration in the leopard Gecko (*Eublepharis macularius*). **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 242, n. 7, p. 886–896, 2013.

- GOULARD, C. E. S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed. 1ª Edição ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2004. p. 330, 2004.
- GUERRA, R. R. et al. Healing of skin wounds in the African catfish *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 3, p. 572–583, 2008.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.
- HIRANO, L. Q. L. **Contenção farmacológica de jacaré-tinga *Caiman crocodilus* Linnaeus, 1758 com cetamina S (+) e cetamina racêmica, isolada ou em associação com o midazolam**. Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária da UFU, Universidade Federal de Uberlândia, p. 55, 2011.
- HOPKINS, B. C. et al. Like mother, like offspring: maternal and offspring wound healing correlate in snakes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. Pt 14, p. 2545–2547, 2013.
- IWASHITA, M. K. P. **Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus***. Artigo apresentado ao Programa de Pós- graduação em Aquicultura do Caunesp como requisito para obtenção do título de Mestre em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, p. 35, 2008.
- JACINTO, M. A. C. et al. **Influência do sistema de produção sobre a formação de osteodermos no couro em jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*, Daudin)**. Em 45º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia- Lavras. **Anais**. Lavras: MG – UFLA, 2008.
- JACOBSON, E. **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text**. 1. ed., Florida, CRC Press, 2007, 736p.
- JÚNIOR, O. T. S. **Contenção farmacológica de jacaré tinga *Caiman crocodilus linnaeus* (crocodylia: alligatoridae) com propofol**. Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária da UFU, Universidade Federal de Uberlândia, p.34, 2013.
- KANG, J.-H. et al. Apoptosis mechanism of human cholangiocarcinoma cells induced by bile extract from crocodile. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 942–951, 2012.
- LENTING, P. J. et al. **von Willebrand factor: the old, the new and the unknown**. **Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH**, v. 10, n. 12, p. 2428–2437, 2012.
- LI, H. et al. Temperature acclimation affects thermal preference and tolerance in three *Eremias* lizards (Lacertidae). **Current Zoology**, v. 55, n. 4, p. 258–265, 2009.
- LI, H.-L. et al. Crocodile oil enhances cutaneous burn wound healing and reduces scar formation in rats. **Academic Emergency Medicine : Official Journal of The Society for Academic Emergency Medicine**, v. 19, n. 3, p. 265–273, 2012.
- LIMA, A. P. A. DE. **Influência da temperatura na capacidade cicatricial do tipo lesão incisiva do jacaré do pantanal *Caiman yacare* (Daudin, 1802)**. Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres, MT, 2011.
- MADERSON, P. F. A.; LICHT, P. Factors influencing rates of tail regeneration in the lizard *Anolis carolinensis*. **Experientia**, v. 24, n. 10, p. 1083–1086, 1968.

- MANIERO, G. D.; CAREY, C. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 167, p. 256–263, 1997.
- MATEO, M. R.; ROBERTS, E. D.; ENRIGHT, F. M. Inflammation induced by subcutaneous turpentine inoculation of young American alligators (*Alligator mississippiensis*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 9, p. 1870–1875, 1984.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405–414, 1976.
- MCLEAN, K. E.; VICKARYOUS, M. K. A novel amniote model of epimorphic regeneration: the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. **BMC Developmental Biology**, v. 11, p. 50, 2011.
- MENDONÇA, R. J. DE. Angiogenesis in Wound Healing. In: **Tissue Regeneration – From Basic Biology to Clinical Application**. Edited by Jamie Davies, Publisher: InTech. p. 93–108. 2009.
- MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.
- MERCHANT, M. et al. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1480–1483, 2004.
- MERCHANT, M. et al. Effects of bacterial lipopolysachharide on peripheral leukocytes in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 3-4, p. 315–320, 2006a.
- MERCHANT, M. et al. Febrile response to infection in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 4, p. 921–925, 2007.
- MERCHANT, M.; BRITTON, A. Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 143, n. 4, p. 488–493, 2006.
- MERCHANT, M. E. et al. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 3, p. 505–513, 2003.
- MERCHANT, M. E. et al. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 141, n. 3, p. 281–288, 2005.
- MERCHANT, M. E. et al. Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 143, n. 2, p. 133–137, 2006b.
- MERCHANT, M. E. et al. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 221–228, 2006c.

- MERCHANT, M.; HEARD, R.; MONROE, C. Characterization of phospholipase A(2) activity in serum of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology**, v. 311, n. 9, p. 662–666, 2009.
- MIGUEL, A.; RODRÍGUEZ, M. Cocodrilos (Archosauria: Crocodylia) de la región neotropical. **Biota Colombiana**, v. 1, n. 2, p. 135–140, 2000.
- MIRANDA, M. P. et al. Thermic Variation in Incubation and Development of Pantanal Caiman (*Caiman crocodilus yacare*) (Daudin, 1802) Kept in Metabolic Box. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 333-342, 2002.
- MITCHELL, M.; DIAZ-FIGUEROA, O. Wound management in reptiles. **The Veterinary Clinics of Exotic Animal Practice**, v. 7, p. 123–140, 2004.
- MONDAL, S.; RAI, U. In vitro effect of temperature on phagocytic and cytotoxic activities of splenic phagocytes of the wall lizard , *Hemidactylus flaviridis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 129, p. 391–398, 2001.
- MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. 1, p. 1–26, jul. 1988.
- MORAES, J. R. E. et al. Suplementação alimentar com vitamina c acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Boletins do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 57 – 67, 2003.
- MORAIS, C. S. N. et al. Mortadella sausage manufactured with *Caiman yacare* (*Caiman crocodilus yacare*) meat, pork backfat, and soybean oil. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 403–411, 2013.
- MOSLEY, C. A. E. Anesthesia and Analgesia in Reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 14, n. 4, p. 243–262, 2005.
- MOURA, W. L. DE et al. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1, 1999.
- MOURA, W. DE; SANTOS, A. Aspectos morfológicos de células da série eritrocítica de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802). **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, v. 42, n. 5, p. 319–326, 2005.
- MUÑOZ, F. J.; DE LA FUENTE, M. The effect of the seasonal cycle on the splenic leukocyte functions in the turtle *Mauremys caspica*. **Physiological and Biochemical Zoology : PBZ**, v. 74, n. 5, p. 660–667, 2013.
- MUSSART, N.; FIORANELLI, S.; BARBOZA, N. Oscilaciones del eritrograma en caimanes criados por sistema ranching. **Revista Veterinaria.**, n. 3400, 2007.
- NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. The veterinary clinics of North America. **Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 1–30, 2013.
- NÓBREGA ALVES, R. R.; SILVA VIEIRA, W. L.; SANTANA, G. G. Reptiles used in traditional folk medicine: conservation implications. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n. 8, p. 2037–2049, 2008.

NOGUEIRA FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. DA C. Produção e Comercialização da Carne e de Subprodutos na Região Sudeste do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 31, n. 2, p. 188–195, 2000.

OLIVEIRA, E. S. et al. The medicinal animal markets in the metropolitan region of Natal City, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 54–60, 2010.

PATA, S. et al. Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrociclin from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 5, p. 545–553, 2011.

PAYNE, S. **Angiogenesis During Multi-tissue Regeneration Following Tail Loss in the Leopard Gecko (*Eublepharis macularius*)**. Thesis presented to The University of Guelph in partial fulfilment of requirements for the degree of Master of Science in Biomedical Sciences, University of Guelph, Guelph, Canada, p. 156, 2012.

PÉREZ-CASANOVA, J. C. et al. The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, p. 600–609, 2008.

PINHEIRO, M. S.; ANDREOTTI E SILVA, R.; SANTOS, S. A. Observations on the thermal selection of the pantanal caiman (*Caiman crocodilus yacare*) hatchlings (Crocodylia: Alligatoridae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 2, p. 323–327, 2001.

PXYTYCZ, B.; JÓZKOWICZ, A. Differential effects of temperature on macrophages of ectothermic vertebrates. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 6, p. 729–731, 1994.

RAJA, R.; GARCIA, M. S.; ISSEROFF, R. R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 8-12, p. 2849, 2007.

RAMOS, M. et al. Poxvirus dermatitis outbreak in farmed Brazilian caimans (*Caiman crocodilus yacare*). **Australian Veterinary Journal**, v. 80, n. 6, p. 371–372, 2002.

RAUCH, A. et al. On the versatility of von Willebrand factor. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. e2013046, 2013.

REAM, R. A.; THERIOT, J. A.; SOMERO, G. N. Influences of thermal acclimation and acute temperature change on the motility of epithelial wound-healing cells (keratocytes) of tropical, temperate and Antarctic fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 4539–4551, 2003.

RIEDER, A. et al. **Relações biométricas de jacarés (*Caiman crocodilus yacare*) criados em sistema de cativeiro, Cáceres, Alto Pantanal, Mato Grosso, Brasil**, IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio econômicos do pantanal. **Anais. Corumbá/MS:** 2004 Disponível em: <[http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/pdf/bioticos/640RB\\_Rieder\\_1\\_OKVisto.pdf](http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/pdf/bioticos/640RB_Rieder_1_OKVisto.pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2014

REPCILLIN. <<http://repcillinpure.co.uk/>> acessado em 13 de maio de 2014.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329–334, 1947.



- SALCIDO, R. Alligators and Wound Healing. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 21, n. 8, p. 352–353, 2008.
- SANTOS, P. R. Measurement of Sr/Ca Ratio in Bones as a Temperature Indicator. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, n. 4B, 2006.
- SARKIS-GONÇALVES, F.; CASTRO, A.; VERDADE, L. Influência da Dieta na Formação de Osteodermos em Filhotes de Jacarés-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*). In: VERDADE, L.; LARRIERA, A. (Eds.). **Conservação e Manejo de Jacarés e Crocodilianos da América Latina**. Piracicaba, SP: Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz.”, 2001. p. 145–153.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Animal physiology: adaptation and environment**. 5 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 600p.
- SELTMANN, K. et al. Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 46, p. 18507–18512, 2013.
- SILVA, A. L. Animais medicinais: conhecimento e uso entre as populações ribeirinhas do rio Negro, Amazonas, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi**, v. 3, n. 3, p. 343–357, 2008.
- SILVA, J. R. M. C. et al. Kinetics of induced wound repair at 0°C in the Antarctic fish (Cabeçuda) *Notothenia coriiceps*. **Polar Biology**, v. 27, n. 8, p. 458–465, 2004.
- SIROSKI, P. A. et al. Comparison of plasma dipeptidyl peptidase IV activity in two caiman species: *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia, Alligatoridae). **Animal Biology**, v. 61, n. 2, p. 199–210, 2011.
- SLADKY, K. K.; MANS, C. Clinical Anesthesia in Reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n. 1, p. 17–31, 2012.
- SMITH, D. A.; BARKER, I. K. Healing of Cutaneous Wounds in the Common Garter Snake (*Thamnophis sirtalis*). **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 111–119, 1988.
- SMITH, D. A.; BARKER, K.; ALLEN, B. The Effect of Ambient Temperature and Type of Wound on Healing of Cutaneous Wounds in the Common Garter Snake (*Thamnophis sirtalis*). **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 120–128, 1988.
- SONG, W. et al. Apoptosis of human cholangiocarcinoma cells induced by ESC-3 from *Crocodylus siamensis* bile. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 18, p. 704–711, 2012.
- SOUTO, W. M. S. et al. Parallels between zootherapeutic practices in ethnoveterinary and human complementary medicine in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 753–767, 2011.
- SOUZA, V. L. et al. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 533–540, 2002.
- STACY, N. I.; ALLEMAN, A. R.; SAYLER, K. A. Diagnostic hematology of reptiles. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 87–108, 2011.
- STEVENSON, R. D. Body Size and Limits to the Daily Range of Body Temperature in Terrestrial Ectotherms. **The American Naturalist**, v. 125, p. 102–117, 1985.

- SYKES, J. M.; KLAPHAKE, E. Reptile hematology. **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 481–500, 2008.
- TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. Angiogenesis in wound healing. **The Journal of Investigative Dermatology**. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research, v. 5, n. 1, p. 40–46, 2000.
- VERDADE, L. M. A exploração da fauna silvestre no Brasil: Jacarés, sistemas e recursos humanos. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2004.
- VIANA, L. A. et al. Hepatozoon caimani (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal Region, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 96, p. 83–88, 2010.
- VICENTE-NETO, J. et al. Fatty acid profiles in meat from *Caiman yacare* (*Caiman crocodilus yacare*) raised in the wild or in captivity. **Meat Science**, v. 85, n. 4, p. 752–758, 2010.
- VICKARYOUS, M. K.; HALL, B. K. Development of the dermal skeleton in *Alligator mississippiensis* (Archosauria, Crocodylia) with comments on the homology of osteoderms. **Journal of Morphology**, v. 269, n. 4, p. 398–422, 2008.
- VOIGT, K. H. Krokodilschwanz bei *Caiman crocodilus* nachgewachsen. **Elaphe**, v. 16, n. 2, p. 43, 2008.
- WALDEMAR OLIVEIRA, L. et al. Características Citoquímicas Morfológicas y Ultraestructurales de Eosinófilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). **Revista Chilena de Anatomía**, v. 16, n. 2, 1998.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835–870, 2003.
- WICKI, G.; ROSSI, F.; LUCHINI, L. Crecimiento compensatorio en. **Congreso Asociación Latinoamericana de Acuicultura**, p. 1–12, 2003.
- WOODWARD, A. R.; DAVID, D. N.; DEGNER, R. L. **The rise and fall of classic crocodilian skin prices: where do we go from here?** Presented at the Second Regional Conference of the Crocodile Specialist Group. v. 1984, n. March, p. 12–19, 1993. Disponível em: <[http://research.myfwc.com/engine/download\\_redirection\\_process.asp?file=93woodward\\_5624.pdf&objid=46645&dctype=publication](http://research.myfwc.com/engine/download_redirection_process.asp?file=93woodward_5624.pdf&objid=46645&dctype=publication)> 03 de junho de 2014.
- ZIMMERMAN, L. M.; VOGEL, L. A.; BOWDEN, R. M. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 5, p. 661–671, 2010.