UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Mecânica ventilatória, padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação em
Trachemys scripta e *Chelonoidis carbonarius* (Testudines: Cryptodira)

Pedro Henrique Trevizan Baú

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

PEDRO HENRIQUE TREVIZAN BAÚ

Mecânica ventilatória, padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação em
Trachemys scripta e *Chelonoidis carbonarius* (Testudines: Cryptodira)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Comparada.

Área de concentração: Biologia comparada

Orientador: Wilfried Klein

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Baú, Pedro Henrique Trevizan

Mecânica ventilatória, padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius* (Testudines: Cryptodira)

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Wilfried Klein

1. CUSTO METABÓLICO DA VENTILAÇÃO, VOLUME PULMONAR, COMPLACÊNCIA ESTÁTICA, COMPLACÊNCIA DINÂMICA

Nome: BAÚ, Pedro Henrique Trevizan

Título: Mecânica ventilatória, padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius* (Testudines: Cryptodira)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Comparada.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Geraldo Baú e Edilaine Trevizan, e meu
irmão, João Paulo, que estão comigo nessa minha
caminhada desde o início.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Wilfried Klein, pela atenção, paciência, ensinamentos e confiança durante esses dois anos de mestrado desenvolvido no Laboratório de Morfo-Fisiologia de Vertebrados.

Tenho também enorme gratidão aos meus pais, Edilaine Trevizan e Geraldo Baú, pelo total apoio e educação que sempre me proporcionam. Sem eles, nada disso seria possível. Ao meu irmão, João Paulo, pelo apoio, companheirismo e ensinamentos. E a minha namorada, Flávia Medeiros, companheira que conheci no final da minha graduação e hoje é uma das pessoas mais importantes da minha vida.

Aos colegas do laboratório, Diego Venturelli, Gustavo Oda, Tábata Cordeiro, Ana Paula Braga, Rafaela Volpi, Paulo de Oliveira, Yasmin Marini, Heloisa Flores, com quem pude aprender e trocar experiências profissionais. Gratidão também à técnica do laboratório, Susie Rocha, que sempre me apoiou em assuntos profissionais e pessoais.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada que tornaram possível a realização do trabalho.

Agradeço às instituições CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro e investimento no laboratório.

À Sociedade Latino-americana de Zoologia pela bolsa concedida para a participação do IV Congresso Latino-americano de Zoologia realizado na Colômbia em 2014.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Fisiologia Comparada pela organização de dois cursos nesses dois anos que foram importantes para minha formação profissional.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada que está só começando.

Resumo

Dentro da classe Reptilia, a ordem Testudines possui algumas características exclusivas, tais como a fusão das costelas e da coluna vertebral e a perda dos músculos intercostais, inviabilizando a ventilação costal. Além disso, as posições naturais que os Testudines exibem podem influenciar a mecânica ventilatória. O presente estudo teve como objetivo testar a influência do posicionamento do corpo sobre a mecânica ventilatória através da complacência estática e dinâmica e analisar através da respirometria aberta o padrão ventilatório e o custo metabólico da ventilação através da exposição em normóxia, hipóxia e hipercarbia em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius*. Os volumes pulmonares, complacência estática e dinâmica em *C. carbonarius* foram inferiores aos de *T. scripta* e outras espécies de Testudines já estudadas. Verificou-se também influência das posições sobre a mecânica ventilatória nas duas espécies, sendo a posição de membros e cabeça retraídos na carapaça apresentando os menores valores ($p < 0,05$). Hipóxia e hipercarbia estimularam o aumento da ventilação nas duas espécies estudadas ($p < 0,05$), sendo observadas maiores alterações da frequência ventilatória e volume corrente em *C. carbonarius*. Os valores de custo metabólico da ventilação foram baixos devido à uma diminuição no consumo de oxigênio em hipóxia e hipercarbia, indicando depressão metabólica em ambas as espécies ou então o método para calcular esse custo não ser ideal. Ao relacionar os dados de consumo de oxigênio com os de ventilação, verificou-se a possibilidade de *shunt* cardíaco esquerdo-direito. Será necessário calcular o trabalho mecânico da ventilação a fim de entender melhor a mecânica ventilatória nas duas espécies e posteriormente relacionar os dados de ventilação e custo metabólico da ventilação com os de trabalho mecânico.

Palavras-chave: custo metabólico da ventilação, complacência estática, complacência dinâmica, ventilação, volumes pulmonares.

Abstract

Within the class of Reptilia, the order Testudines possesses some exclusive features such as merged ribs and spine and loss of intercostal muscles, preventing costal ventilation. Furthermore, the natural positions exhibited by Testudines, should influence ventilatory mechanics. The aim of this study was to test the influence of different body positions on ventilatory mechanics by measuring static and dynamic compliance and by using open respirometry to analyze the ventilatory pattern and metabolic cost of ventilation in normoxic, hypoxic and hypercarbic exposures in *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius*. *C. carbonarius* showed the lowest values of lung volumes, static and dynamic compliance when compared to *T. scripta* as well as to other Testudines's species. Natural positions significantly influenced ventilatory mechanics in both species, with the lowest values found in animals with legs and head retracted into the shell ($p < 0.05$). Hypoxia and hypercarbia stimulated ventilation in both species, with alterations in frequency and tidal volume being greater in *C. carbonarius*. Estimated metabolic cost of ventilation was low because of a decrease in oxygen uptake during hypoxia and hypercarbia, indicating metabolic depression in both species or that the method used may not be ideal to calculate the metabolic cost of breathing. Relating oxygen uptake data with ventilation data, it may be possible that left-right cardiac shunting occurred. It will be necessary to calculate the mechanic work of breathing to better understand the ventilatory mechanics in both species and relate ventilation data and metabolic cost of ventilation with mechanical work of breathing.

Key-word: metabolic cost of ventilation, static compliance, dynamic compliance, ventilation, lung volumes.

Lista de figuras

- Figura 1 - Evolução do mecanismo de ventilação pulmonar em vertebrados. O mecanismo de bomba bucal está presente nos peixes de respiração aérea e anfíbios, enquanto que o mecanismo de aspiração está presente em todos os amniotas. Adaptado: Brainerd, 1999.....16
- Figura 2 - Modelo da curva de volume e pressão obtida em um experimento de complacência estática. A marcação em vermelho refere-se ao trecho com maior inclinação da curva de inflação, sendo que os valores de volume e pressão dos pontos inicial e final desse trecho foram utilizados para o cálculo da complacência estática... 24
- Figura 3 - Modelo da curva de volume e pressão obtida no setup do experimento de complacência dinâmica. Os círculos indicam os pontos de fluxo máximo e mínimo, em que foram extraídos os valores de volume e pressão para o cálculo da complacência dinâmica..... 25
- Figura 4 - Volume residual (a), máximo (b) e a relação entre volume residual e máximo (c) em *Trachemys scripta* nas posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, e submerso. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).....28
- Figura 5 - Volume residual (a), máximo (b) e a relação entre volume residual e máximo (c) em *Chelonoidis carbonarius* nas posições de supino, prona e membros e cabeça retraídos na carapaça. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).....28
- Figura 6 - Complacência estática com os dados brutos (a), relativo à massa corpórea (b), volume pulmonar residual (c) e volume pulmonar máximo (d) em *Trachemys scripta* nas posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, submerso, e com os pulmões livres. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way*

ANOVA seguido pelo teste *post-hoc Tukey*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) 30

Figura 7 - Complacência estática com os dados brutos (a), relativo à massa corpórea (b), volume pulmonar residual (c) e volume pulmonar máximo (d) em *Chelonoidis carbonarius* nas posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, e com os pulmões livres. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way ANOVA* seguido pelo teste *post-hoc Tukey*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) 31

Figura 8 - Complacência dinâmica relativa à massa corpórea em *Trachemys scripta* nas posições supino (a), prona (b), membros e cabeça retraídos na carapaça (c) e submerso (d) e com os pulmões livres (e). Os valores são representados pela média sendo que as barras denotando o erro padrão da média foram ocultadas para melhor visualização dos dados..... 33

Figura 9 - Complacência dinâmica relativa à massa corpórea em *Chelonoidis carbonarius* nas posições supino (a), prona (b) e membros e cabeça retraídos na carapaça (c) e pulmões (d). Os valores são representados pela média sendo que as barras denotando o erro padrão da média foram ocultadas para melhor visualização dos dados 34

Figura 10 - Esquema do aparato utilizado na respirometria aberta para *T. scripta*. 1) cilindro dos gases (O_2 , CO_2 e N_2); 2) misturador de gases; 3) espirômetro (ADInstruments); 4) Labchart 8.0; 5) analisador de gases (ADInstruments); 6) desumidificador (sílica em gel); 7) funil com o pneumotacógrafo conectado na extremidade superior; 8) aquário; 9) computador 43

Figura 11 - Espécime de *Chelonoidis carbonarius* com a máscara desenvolvida para a respirometria. A máscara é composta pelo colar de cachorro e a ponta superior de uma garrafa pet de 2 litros. Na garrafa, estão inseridos os conectores e o pneumotacógrafo.44

Figura 12 - Esquema do funil ou da garrafa contendo conectores da parte superior (1 e 2) e inferior (3, 4 e 5). 1 e 2) conectores para medição da ventilação; 3) conector que fica fechado durante o experimento mas para a calibração da ventilação e dos gases, conecta-se uma seringa para a injeção dos volumes; 4) conector onde é removido

constantemente a mistura gasosa do funil para determinação das concentrações gasosas;
 5) conector onde fornece a mistura de gases proveniente do misturador de gases; 6)
 corte transversal do pneumotacógrafo, onde ocorre o fluxo laminar de ar.
 44

Figura 13 - Esquema do protocolo experimental de respirometria aberta. O eixo X
 refere-se à duração do experimento (11 horas), indicando o início e o fim de cada
 situação (normóxia, hipóxia e hipercarbia).....45

Figura 14 - Registros de ventilação (linha vermelha), porcentagem de gás carbônico
 (linha azul) e oxigênio (linha verde) dentro da câmara respirométrica de *Trachemys*
scripta (A) e *Chelonoidis carbonarius* (B). Os répteis iniciam a ventilação expirando
 (sinal da ventilação para baixo em relação à linha de base), seguido por uma inspiração
 (sinal da ventilação para cima em relação à linha de base). Ao ventilar, a porcentagem
 de oxigênio cai e a de gás carbônico aumenta dentro da máscara47

Figura 15 - Frequência ventilatória (a, b), volume corrente (c, d) e ventilação por minuto
 (e, f) em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante
 as exposições em hipóxia e hipercarbia. Os pontos preenchidos são referentes às
 normóxias finais. * para *T. scripta* e + para *C. carbonarius* se referem aos valores
 significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores de normóxia. # normóxia final
 diferente ($p \leq 0,05$) da inicial50

Figura 16 - Frequência ventilatória durante episódios ventilatórios (a, b), duração do
 período não-ventilatório (c, d) e frequência de episódios ventilatórios (e, f) em
Trachemys scripta (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante as
 exposições em hipóxia e hipercarbia. Os pontos preenchidos são referentes às
 normóxias finais. * para *T. scripta* e + para *C. carbonarius* se referem aos valores
 significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores de normóxia..... 51

Figura 17 - Duração da inspiração (a, b), duração da expiração (c, d) e duração de um
 ciclo ventilatório (e, f) em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius*
 (triângulo) durante as exposições em hipóxia e hipercarbia. Os pontos preenchidos são
 referentes às normóxias finais. * para *T. scripta* e + para *C. carbonarius* se referem aos
 valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores de normóxia52

Figura 18 - Consumo de oxigênio em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante as exposições à hipóxia (a) e hipercarbia (b). Os pontos preenchidos são referentes às normóxias finais. * para *T. scripta* se refere ao valor em normóxia significativamente diferente dos valores em hipóxia53

Figura 19 - Dados de ventilação plotados contra o consumo de oxigênio em *Trachemys scripta* (A) e *Chelonoidis carbonarius* (B) durante exposições de hipóxia (quadrado) e hipercarbia (triângulo). Os pontos nos gráficos representam valores de V_E e VO_2 de cada indivíduo durante exposições de normóxia, hipóxia e hipercarbia. Foi calculada a regressão linear para hipóxia e hipercarbia separadamente54

Lista de tabelas

Tabela 1 - Valores de complacência estática do sistema respiratório (C_T) e dos pulmões (C_L) de Testudines relativizados pela massa corpórea.....	31
Tabela 2 - Efeito das combinações de volume e frequência para cada posição em <i>Trachemys scripta</i>	35
Tabela 3 - Efeito das combinações de volume e frequência entre as posições em <i>Trachemys scripta</i>	36
Tabela 4 - Efeito das combinações de volume e frequência para cada posição em <i>Chelonoidis carbonarius</i>	37
Tabela 5 - Efeito das combinações de volume e frequência entre as posições em <i>Chelonoidis carbonarius</i>	38
Tabela 6 - Valores de frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_T), ventilação total (V_E) e consumo de oxigênio de Testudines relativizados pela massa corpórea	54
Tabela 7 - Custo metabólico da ventilação em <i>Trachemys scripta</i> e <i>Chelonoidis carbonarius</i> calculado através do método de regressão linear dos valores de hipóxia e hipercarbia plotados individualmente	55
Tabela 8 - Consumo de oxigênio, volume de ar para remover 1 ml de oxigênio, volume de ar para remover 1 ml de gás carbônico e razão de troca respiratória em <i>Trachemys scripta</i> e <i>Chelonoidis carbonarius</i> em normóxia, hipóxia 3% e hipercarbia 6%	58

Lista de símbolos e abreviações

Volume pulmonar residual	V_{LR}
Volume pulmonar máximo	V_{LM}
Porcentagem de volume pulmonar residual.....	V_{LR} / V_{LM}
Complacência estática	C_{EST}
Complacência dinâmica	C_{DIN}
Frequência respiratória.....	f_R
Volume corrente	V_C
Ventilação por minuto	$\dot{V}_E$
Frequência de episódios ventilatórios.....	f_E
Frequência ventilatória por episódio	$f_{\text{Repisódio}}$
Período não-ventilatório.....	T_{PNV}
Duração da inspiração.....	T_{INSP}
Duração da expiração.....	T_{EXP}
Duração de um ciclo ventilatório.....	T_{VENT}
Consumo de oxigênio.....	$\dot{V}O_2$
Produção de gás carbônico.....	$\dot{V}CO_2$
Volume de ar para absorver 1 ml de oxigênio.....	$\dot{V}_E / \dot{V}O_2$
Volume de ar para remover 1 ml de gás carbônico.....	$\dot{V}_E / \dot{V}CO_2$
Razão de troca respiratória	RER

Sumário

1. Fisiologia respiratória em répteis – Aspectos gerais	16
1.1. Introdução	16
1.2. Justificativa do trabalho	19
Capítulo I - Efeito das posições naturais (supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, e submerso na água) e dos pulmões sobre a mecânica ventilatória em <i>Trachemys scripta</i> e <i>Chelonoidis carbonarius</i>	20
1. Efeito das posições naturais sobre a mecânica ventilatória	21
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Material e métodos.....	22
3.1. Animais	22
3.2. Determinação da complacência estática e dinâmica do sistema respiratório...	23
3.3. Complacência estática	24
3.4. Complacência dinâmica	25
3.5. Tratamento estatístico	26
4. Resultados	27
4.1. Volumes pulmonares.....	27
4.2. Complacência estática	28
4.3. Complacência dinâmica	31
5. Discussão	38
5.1. Volumes pulmonares e complacência estática	38
5.1.1. <i>Trachemys scripta</i>	38
5.1.2. <i>Chelonoidis carbonarius</i>	39
5.2. Complacência dinâmica	40
6. Conclusões	41
Capítulo II - Padrões ventilatórios e trocas gasosas em <i>Trachemys scripta</i> e <i>Chelonoidis carbonarius</i>	42
1. Padrões ventilatórios e trocas gasosas	43
2. Objetivos	44
2.1. Objetivo geral.....	44
2.2. Objetivos específicos.....	45

3. Material e métodos	45
3.1. Animais	45
3.2. Determinação do mecanismo de ventilação e do custo metabólico da ventilação	45
3.3. Tratamento estatístico	49
4. Resultados	49
4.1. Resposta ventilatória	50
4.2. Consumo de oxigênio e custo metabólico da ventilação.....	55
5. Discussão	58
5.1. Ventilação.....	58
6. Conclusões	61
Considerações finais.....	62
Referências bibliográficas	63
Apêndices	69
Apêndice A - Fórmulas utilizadas para o cálculo das variáveis analisadas no experimento de mecânica respiratória.	69
Apêndice B - Regressão linear feita para a calibração do sistema em relação ao volume corrente (A), consumo de oxigênio (B) e liberação de gás carbônico (C) de <i>Trachemys scripta</i>	70
Apêndice C - Regressão linear feita para a calibração do sistema em relação ao volume corrente (A), consumo de oxigênio (B) e liberação de gás carbônico (C) de <i>Chelonoidis carbonarius</i>	71
Apêndice D - Fórmulas utilizadas para o cálculo das variáveis do experimento de padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação.	72

1. Fisiologia respiratória em répteis – Aspectos gerais

1.1. Introdução

Répteis, aves e mamíferos apresentam a aspiração como mecanismo de ventilação pulmonar, representando uma inovação evolutiva nos amniotas (figura 1). Esse mecanismo faz com que ocorra uma diminuição de pressão na cavidade pleuroperitoneal, expandindo os pulmões, resultando na inspiração (Brainerd, 1999). Por outro lado, peixes de respiração aérea e anfíbios preenchem os pulmões a partir de uma bomba bucal (Brainerd, 1999). Apesar de todos os répteis apresentarem o mecanismo de aspiração, a classe Reptilia é caracterizada pela diversidade do sistema respiratório, tanto em relação à morfologia dos pulmões como à mecânica respiratória (Klein e Codd, 2010).

Figura 1. Evolução do mecanismo de ventilação pulmonar em vertebrados. O mecanismo de bomba bucal está presente nos peixes de respiração aérea e anfíbios, enquanto que o mecanismo de aspiração está presente em todos amniotas. Adaptado: Brainerd, 1999.

A diversidade morfológica dos pulmões dos répteis influencia a mecânica respiratória e o custo metabólico de ventilar os pulmões (Perry, 1983), o que, por sua vez, pode resultar em diferentes padrões de respiração (Pages, 1990). Em relação à morfologia, os pulmões dos répteis podem ser do tipo unicameral, paucicameral (ou transicional) ou multicameral. O tipo unicameral é encontrado em serpentes e alguns

lagartos, paucicameral em iguanas e multicameral em testudines, crocodilos e Anguimorpha (Perry, 1998). Lambertz e colaboradores (2014) observaram dados anatômicos e embriológicos dos pulmões de vários representantes de répteis e concluíram que o tipo multicameral teria sido o tipo ancestral de pulmão presente nesses animais, caracterizando-se como a condição plesiomórfica do grupo. Além dos diferentes tipos de pulmões, o epitélio respiratório pode ser do tipo faveolar, edicular ou trabecular, distribuído de forma homogênea ou heterogênea nos pulmões, e os brônquios podem estar presentes ou ausentes (Perry, 1998).

O padrão ventilatório dos répteis caracteriza-se como intermitente, na qual episódios de uma única ventilação são separados por períodos não-ventilatórios, ou então episódios com mais de uma ventilação são separados também por períodos não-ventilatórios (Vitalis e Milsom, 1986a; Milsom e Vitalis, 1984). Segundo Vitalis e Milsom (1986a) esse padrão periódico de ventilação apresentado pelos répteis representa um mecanismo adaptativo que diminui o custo metabólico de ventilar os pulmões. Além disso, foi observado em uma espécie de cágado, *T. scripta*, e em uma lagartixa, *Gekko gecko*, que esses animais ventilam em uma combinação de frequência ventilatória e volume corrente que minimiza o trabalho mecânico da ventilação (Milsom e Vitalis, 1984; Vitalis e Milsom, 1986a).

Dentro da classe Reptilia, a ordem Testudines possui algumas características exclusivas que a torna um objeto de estudo interessante para investigações sobre o sistema respiratório. Primeiramente, a parede corpórea é representada por um casco rígido. Esse casco é formado dorsalmente pela fusão das costelas e da coluna vertebral juntamente com uma ossificação dermal (osteodermos) (Lyson et al., 2013), o que, somado à perda dos músculos intercostais durante o desenvolvimento embrionário, inviabiliza a ventilação costal (Lyson et al., 2014). O casco rígido exerce restrição ao aumento do volume da cavidade pleuroperitoneal, sendo o local em que os membros estão inseridos que permite alguma mudança de volume da cavidade (Jackson, 1971a).

Apesar de não ter função na ventilação pulmonar, as costelas dos testudines auxiliam na estabilização do tronco durante a locomoção, enquanto que a ventilação dos pulmões é realizada a partir da ação de músculos hipaxiais associados aos membros (Gans e Hughes, 1967; Landberg et al., 2003; Landberg et al., 2009, Lyson et al. 2014). Durante a expiração, ocorre a contração do músculo *transversus abdominis* fazendo

com que as vísceras sejam movidas para a região dorsal, exercendo, dessa maneira, pressão sobre os pulmões e resultando na saída do ar. Posteriormente, segue-se a inspiração, na qual ocorre o relaxamento do músculo *transversus* e a contração do músculo *obliquus abdominis*, que, ao contrair, o volume da cavidade pleuroperitoneal aumenta, fazendo com que os pulmões expandam e o ar entre (Gans e Hughes, 1967; Gaunt e Gans, 1969).

Em relação à morfologia interna dos pulmões, os Testudines possuem pulmões multicamerais, com um brônquio intrapulmonar reforçado por cartilagem e não ramificado (Perry, 1998), e existe um septo pós-pulmonar (SPP) localizado ventralmente em relação aos pulmões (Duncker, 1978). Este septo, que surge durante o desenvolvimento embrionário, separa a cavidade pleural da peritoneal, restringindo os pulmões à cavidade pleural, preso dorsalmente na carapaça com mesopneumonios dorsais (Lambertz et al., 2010). Mesmo todos Testudines possuindo pulmões multicamerais, ainda assim existe diversidade em relação à morfologia interna dos pulmões, tais como o número de câmaras laterais, mediais, ventrais e dorsais, bem como à extensão do septo pós-pulmonar aderido aos pulmões (Lambertz, 2010). Em algumas espécies, o septo cobre totalmente os pulmões e em outras, parcialmente, o que pode, por sua vez, influenciar a mecânica ventilatória do sistema respiratório desses animais.

A ordem Testudines é representada por aproximadamente 300 espécies distribuídas em 14 famílias, sendo três famílias pertencentes à subordem Pleurodira e as demais, à subordem Cryptodira (Uetz, 2015). Os Pleurodira retraem a cabeça curvando o pescoço horizontalmente, enquanto que os Cryptodira retraem a cabeça para dentro do casco curvando o pescoço na forma de um S vertical (Pough, 2008). As espécies que foram estudadas neste projeto foram *Trachemys scripta*, pertencente à família Emydidae e *Chelonoidis carbonaria*, da família Testudinidae, ambas representantes da subordem Cryptodira.

A família Emydidae inclui espécies aquáticas e terrestres (Orenstein, 2012). A Tartaruga-de-ouvido-vermelho, como é conhecida popularmente *Trachemys scripta*, é uma espécie lacustre que possui ampla distribuição na América do Norte. Nativa da região sudeste dos Estados Unidos da América, mais especificamente da bacia do rio Mississippi, atualmente é encontrada em vários lugares do mundo devido ao comércio pet (Ernst e Lovich, 2002). Já as espécies da família Testudinidae são terrestres e vivem

ou são provenientes de ambientes terrestres secos, apesar de atualmente encontrar muitas dessas espécies em florestas tropicais (Orenstein, 2012). Os representantes dessa família são amplamente distribuídos, sendo encontrados em todos os continentes subpolares, exceto a Austrália (Le et al., 2006). *Chelonoidis carbonarius*, conhecido popularmente como Jabuti-piranga, é uma espécie de habitat terrestre e está distribuída por toda a América do Sul (Bisby et al., 2012).

Segundo Pages e colaboradores (1990), os estudos relacionados à mecânica ventilatória tem se restringido principalmente aos mamíferos, havendo poucos em relação aos répteis (Klein et al., 2003; Milson e Vitalis, 1984; Pages et al., 1990; Perry e Dunker, 1978, 1980; Vitalis e Milson, 1986A). Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi investigar aspectos da fisiologia do sistema respiratório de *T. scripta* e *C. carbonarius* e, para isso, foram analisados os seguintes parâmetros: 1) padrão da ventilação; 2) custo metabólico da ventilação; e 3) complacência estática e dinâmica do sistema respiratório e dos pulmões livres.

1.2. Justificativa do trabalho

Esta primeira parte do trabalho discute aspectos gerais da fisiologia do sistema respiratório da classe Reptilia, tendo enfoque final na ordem Testudines. Em seguida, são discutidos aspectos da mecânica ventilatória em Testudines (capítulo I). Pelo fato desses animais apresentarem as costelas fusionadas à carapaça, sendo as regiões onde os membros estão inseridos os únicos locais que permitem aumento da cavidade pleuroperitoneal, discute-se a influência das posições naturais exibidas pelos Testudines, tais como, membros e cabeça retraídos na carapaça e/ou submerso na água, na mecânica ventilatória. E por último (capítulo II), discute-se o padrão ventilatório e o custo metabólico de ventilar os pulmões nas duas espécies trabalhadas neste projeto. Apesar de *T. scripta* ser bastante conhecida em relação à fisiologia do sistema respiratório, não existem trabalhos com a espécie de jabuti sul-americana, *C. carbonarius*. Sendo assim, este trabalho apresenta dados inéditos a respeito da fisiologia respiratória de uma espécie de jabuti, bem como contribui para o entendimento das posições naturais apresentadas pelos Testudines sobre a mecânica ventilatória.

Capítulo I

Efeito das posições naturais (supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, e submerso na água) e dos pulmões sobre a mecânica ventilatória em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius*

1. Efeito das posições naturais sobre a mecânica ventilatória

Devido à associação dos músculos ventilatórios com os membros locomotores, foi estudada a influência da locomoção na fisiologia respiratória em algumas espécies. Apesar de não ser observada influência da locomoção na fisiologia respiratória em *Terrapene carolina* (Landberg et al., 2003), foi visto que na espécie marinha *Chelonia mydas*, conhecida popularmente como tartaruga-verde, existe uma interrupção da ventilação quando o animal está se locomovendo em ambiente terrestre (Jackson e Prange, 1979). Também foi observada a influência da locomoção na ventilação em *T. scripta*, porém nesta espécie ocorreu apenas a diminuição do volume corrente (Landberg et al., 2009).

Além da locomoção, que é uma atividade natural que pode influenciar a fisiologia respiratória nesses animais, os Testudines apresentam algumas posições, tais como submerso na água e membros e cabeça retraídos na carapaça, que poderiam influenciar a mecânica ventilatória. Ao retrain os membros e a cabeça, o volume da cavidade pleuroperitoneal estaria diminuído, já que onde os membros estão inseridos é o local que possibilita a expansão da cavidade (Jackson, 1971a). Sendo assim, pode ser que haja influência dessa posição na mecânica ventilatória por causa da diminuição do volume da cavidade, o que diminuiria também a capacidade de expansão do volume pulmonar. Já quando o animal está submerso na água, possivelmente a pressão hidrostática exerce força contrária à expansão da cavidade pleuroperitoneal, influenciando também a mecânica ventilatória. Adicionalmente, estudos de mecânica ventilatória colocam o animal geralmente em decúbito dorsal (supino) para efetuar as medições, o que no caso de Testudines pode influenciar os dados obtidos, uma vez que nessa posição, as vísceras repousam sobre os pulmões, possivelmente alterando a mecânica ventilatória em comparação ao animal em decúbito ventral (prona).

Ambas as espécies utilizadas nesse estudo retraem os membros e a cabeça para dentro da carapaça, porém *C. carbonarius*, por ser uma espécie terrestre, não fica dentro da água. Sendo assim, a posição em que o animal fica submerso não foi testada nessa espécie. Já os animais de *T. scripta*, cágados que também vivem na água, foram submetidos a essa posição. Além dessas posições, os animais também foram colocados nas posições de supino e prona, permitindo assim uma ampla comparação com os dados da literatura e, posteriormente, o experimento foi realizado com os animais abertos,

estando os pulmões livres, e não havendo influência das vísceras sobre a mecânica pulmonar.

Nesse estudo, testou-se a hipótese de que as posições pelas quais os animais são submetidos influenciam a mecânica ventilatória em *T. scripta* e *C. carbonarius*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Para testar se existe a influência das posições na mecânica ventilatória, foram realizados experimentos de complacência estática e dinâmica. Complacência é entendida como a distensibilidade do sistema respiratório e com esse experimento, é possível entender a mecânica ventilatória do sistema respiratório (Klein et al., 2003).

2.2. Objetivos específicos

Através desse experimento, determinar os volumes pulmonares, bem como os valores de complacência estática e dinâmica de *T. scripta* e *C. carbonarius* submetidos às posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, submerso, e só dos pulmões.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados oito espécimes de *T. scripta* e seis de *C. carbonarius*, todos adultos e de ambos os sexos. Os animais foram obtidos do Jacarezário da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), em Rio Claro, em novembro de 2014 e fevereiro de 2015. Após o transporte, todos os animais foram mantidos de duas semanas à três meses no Biotério de Tetrápodes Silvestres do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (Licença SISBIO: Número: 35221-1 e Protocolo Número: 12.1.1541.53.0 CEUA USP-Campus de Ribeirão Preto).

Os espécimes de *T. scripta* tinham média e desvio padrão de massa corpórea de $1,018 \pm 0,11$ kg e foram mantidos em caixas que continham água. As caixas dos cágados ficavam inclinadas para que em uma parte não tivesse água, possibilitando,

assim, que os animais ficassem tanto na parte com água como na parte seca. Esses animais eram alimentados três vezes por semana com ração para peixes carnívoros devido a maior quantidade de proteínas.

Já os espécimes de *C. carbonarius* tinham média e desvio padrão de massa corpórea de $3,884 \pm 0,48$ kg e ficavam em caixas secas e com maravalha. Esses animais eram alimentados três vezes por semana com diversos tipos de vegetais (laranja, alface, couve e melão). Na alimentação das duas espécies era adicionado um reforço vitamínico e não havia limite para disponibilidade de água. Havia ciclo de luz (12h claro/escuro) e temperatura controlada (25°C) no ambiente do biotério e as caixas em que se mantinham os animais eram limpas uma vez por semana.

3.2. Determinação da complacência estática e dinâmica do sistema respiratório

Os animais receberam uma dose do anestésico tiopental sódico (Thiopentax[®], 100 mg.kg⁻¹, Cristália, Brasil) juntamente com o anestésico local Cloridrato de Lidocaína e Fenilefrina (S. S. White 100, S. S. White, Brasil) a partir de uma injeção no plexo cefálico. Assim, a respiração cessou, enquanto que o coração continuou a bater por horas (Klein et al. 2003; Perry; Duncker, 1978, 1980).

Para a determinação dos volumes pulmonares e da complacência estática e dinâmica, um cateter intratraqueal foi colocado no animal para a medição das pressões internas do sistema respiratório (total) e dos pulmões livres (Perry e Duncker, 1978; Milsom e Vitalis, 1984; Vitalis & Milsom, 1986b; Klein et al., 2003). O cateter foi conectado a uma seringa e a uma cânula preenchida com água, a qual era conectada a um medidor de pressão DELTRAN. Os sinais de pressão gerados eram enviados para um amplificador (AECAD 04P, AVS Projetos, São Carlos - Brasil) e, em seguida, para o sistema de aquisição de dados (Labchart 8.0). Antes de iniciar o experimento com os animais, era realizada a calibração do sistema, através do posicionamento de uma coluna de água em duas ou mais alturas. Caso não houvesse bolhas de ar na coluna de água, iniciava-se o experimento.

Os volumes pulmonares e as complacências estática e dinâmica foram aferidos com os animais nas seguintes posições: supino (decúbito dorsal), prona (decúbito ventral), membros e cabeça retraídos na carapaça e animal submerso na água. Além disso, as complacências também foram aferidas com os pulmões livres, na qual, com o

auxílio de uma serra, retirou-se o plastrão e removeram-se as vísceras que ficam sobre os pulmões, não havendo qualquer resistência mecânica sobre eles. Prona, membros retraídos na carapaça e submerso são posições naturais que esses animais podem apresentar. No entanto, em *C. carbonarius*, por ser um animal totalmente terrestre, não foi realizado o experimento com o animal na posição submerso na água.

3.3. Complacência estática

O animal foi conectado ao aparato experimental, e com uma seringa foram injetados volumes de ar até a pressão de +20 cmH₂O. A partir desse valor de pressão, o mínimo volume de ar que se injeta aumenta a pressão intrapulmonar drasticamente correndo o risco de estourar os pulmões. Em seguida, o sistema respiratório foi desinflado até a pressão de -10 cmH₂O. O volume retirado a partir da pressão zero até -10 cmH₂O, é o volume residual do sistema respiratório (V_{LR}). Na pressão de -10 cmH₂O, considera-se que os pulmões já estão colabados. Por fim, o sistema respiratório foi inflado novamente até retornar a pressão de 0 cmH₂O. Considerou-se que o volume pulmonar máximo (V_{LM}) é o volume de ar injetado no sistema respiratório a partir da pressão de -10 até +20 cmH₂O. Todos esses passos de injeção e retirada de volumes de ar foram feitos em intervalos de volumes apropriados as duas espécie, baseado na literatura, e para o tamanho do animal.

Após esse ciclo de injeção, retirada e novamente injeção de ar, o sistema era aberto, e os mesmos procedimentos eram realizados pelo menos três vezes com o animal em cada posição. Para garantir que os pulmões não estivessem colabados para as próximas repetições, injetava-se o volume máximo de ar e abria-se o sistema para que o ar saísse passivamente dos pulmões e os mesmos retornassem ao volume residual entre cada ciclo de inflação-deflação.

Os cálculos das complacências estática e dinâmica seguiram o método de Vitalis e Milsom (1986b). A partir das curvas de volume e pressão (Figura 2) que foram construídas para cada animal em todas as posições na complacência estática, foi selecionada a parte mais inclinada da curva de inflação de ar e os dados de pressão e volume dos pontos inicial e final desse trecho foram utilizados para o cálculo da complacência estática.

Figura 2. Modelo da curva de volume e pressão obtida em um experimento de complacência estática. A marcação em vermelho refere-se ao trecho com maior inclinação da curva de inflação, sendo que os valores de volume e pressão dos pontos inicial e final desse trecho foram utilizados para o cálculo da complacência estática.

3.4. Complacência dinâmica

Sabendo que a ventilação é um processo ativo, ao invés de estático (Vitalis e Milson, 1986b), as análises seriam limitadas caso fosse feita apenas a complacência estática. Sendo assim, é importante que se realize também a determinação da complacência dinâmica a fim de entender melhor a mecânica da ventilação.

O aparato experimental foi conectado a um ventilador (Inspira, *Harvard Apparatus*) para a injeção de volumes previamente determinados em diferentes frequências, gerando curvas a partir das combinações de volume e frequência. Essas combinações de volumes e frequências dependem do tamanho do animal, sendo que nesse estudo foram utilizados volumes de 5, 10, 15, 20, 25, e 30 ml e frequências de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 respirações por minuto. Essas combinações de volume e frequência foram consideradas estar dentro da faixa fisiológica do animal, visto que ambas as espécies apresentaram frequência ventilatória e volume corrente compreendidos dentro desses valores quando mediu-se os animais ventilando ativamente.

Para o cálculo da complacência dinâmica, foram coletados os dados de pressão e volume referentes aos fluxos mínimo e máximo (Figura 3) das curvas escolhidas em cada combinação de volume e frequência.

Figura 3. Modelo da curva de volume e pressão obtida no setup do experimento de complacência dinâmica. Os círculos indicam os pontos de fluxo máximo e mínimo, em foram extraídos os valores de volume e pressão para o cálculo da complacência dinâmica.

Os dados extraídos dos experimentos de complacência estática e dinâmica foram os seguintes: Volume pulmonar residual (V_{LR}), volume pulmonar máximo (V_{LM}), complacência estática (C_{EST}) e complacência dinâmica (C_{DIN}). Posteriormente, foi calculada a porcentagem do V_{LR} dos pulmões, que é resultado da razão V_{LM} / V_{LR} .

3.5. Tratamento estatístico

O software *GraphPad Prism 6.0* para *Windows* foi utilizado para a construção das figuras e análises estatísticas, na qual foi aplicado o teste ANOVA seguido pelo

teste *post-hoc* teste *Tukey*. Para a complacência estática, compararam-se os valores encontrados das diferentes posições e dos pulmões. Para a complacência dinâmica, além de comparar as posições e pulmões, foi feita a comparação entre as diferentes combinações de volume e frequência dentro de cada posição. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4. Resultados

4.1. Volumes pulmonares

As posições naturais pelas quais os animais foram submetidos exerceram efeitos significativos sobre os volumes pulmonares (Figura 4 e 5). Em *T. scripta* foi observado V_{LR} significativamente menor em duas posições em relação à posição prona ($98,0 \pm 10,14 \text{ ml.kg}^{-1}$): membros e cabeça retraídos na carapaça ($44,05 \pm 3,87 \text{ ml.kg}^{-1}$) e submerso na água ($46,19 \pm 6,18 \text{ ml.kg}^{-1}$). A posição de membros e cabeça retraídos na carapaça também apresentou o V_{LM} significativamente menor que supino e prona nessa posição ($73,99 \pm 6,75 \text{ ml.kg}^{-1}$), o que refletiu também em diferença na complacência estática quando comparado a supino (figura 6). Já V_{LM} da posição submerso na água ($229,6 \pm 15,26 \text{ ml.kg}^{-1}$) foi estatisticamente maior que as posições de membros e cabeça retraídos na carapaça e prona. Ao expandir ainda mais essa cavidade, tanto o V_{LM} como a complacência estática ($31,39 \pm 3,56 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}$) foram significativamente maiores (Figura 6). O V_{LR} da posição supino de *T. scripta* não foi diferente estatisticamente do V_{LR} das posições submerso e membros e cabeça retraídos na carapaça e o V_{LM} da posição supino nessa espécie não foi diferente estatisticamente do V_{LM} de submerso (Figura 4),

Os dados de V_{LR} foram divididos pelos de V_{LM} (V_{LR}/V_{LM}) e multiplicados por cem, indicando informações sobre as porcentagens dos volumes de reserva inspiratória e expiratória. Em *T. scripta*, os animais apresentaram significativamente o menor valor na posição submerso ($19,94 \pm 1,80\%$), já que o V_{LR} foi baixo e o V_{LM} alto. Prona ($52,89 \pm 3,23\%$) e membros e cabeça retraídos na carapaça ($60,15 \pm 3,01\%$) tiveram significativamente os maiores valores comparados às outras posições. Supino apresentou valor intermediário ($36,30 \pm 3,59$), sendo maior que a posição submerso, porém menor que prona e membros e cabeça retraídos na carapaça.

Em *C. carbonarius*, o V_{LR} da posição membros e cabeça retraídos ($23,39 \pm 4,85$ ml.kg⁻¹) foi inferior, mas não significativamente diferente de supino ($30,89 \pm 7,30$ ml.kg⁻¹) e prona ($42,40 \pm 5,65$ ml.kg⁻¹) (figura 5). Em relação ao V_{LM} , a posição supino ($95,09 \pm 12,80$ ml.kg⁻¹) foi significativamente maior que prona ($59,08 \pm 6,11$ ml.kg⁻¹) e membros e cabeça retraídos na carapaça ($31,60 \pm 5,83$ ml.kg⁻¹). A razão V_{LR}/V_{LM} dos animais em supino ($30,69 \pm 3,05$ %) foi estatisticamente menor que as outras duas posições nessa espécie ($70,76 \pm 2,29$ % em prona; $72,65 \pm 2,28$ % em membros e cabeça retraídos na carapaça) (Figura 5). Dessa maneira, assim como em *T. scripta*, a capacidade inspiratória dos pulmões é maior em supino.

Volumes pulmonares - *Trachemys scripta*

Figura 4. Volume residual (a), máximo (b) e a relação entre volume residual e máximo (c) em *Trachemys scripta* nas posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, e submerso. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Volumes pulmonares - *Chelonoidis carbonarius*

Figura 5. Volume residual (a), máximo (b) e a relação entre volume residual e máximo (c) em *Chelonoidis carbonarius* nas posições de supino, prona e membros e cabeça retraídos na carapaça. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.2. Complacência estática

As figuras 6 e 7 mostram que os valores de complacência estática seguiram o mesmo padrão para todas as posições e nas duas espécies, sendo *C. carbonarius* sempre

apresentando os menores valores, independente da variável que foi utilizada para relativizar (massa corpórea, V_{LM} ou V_{LR}). Em *T. scripta*, a complacência dos pulmões relativo à massa corpórea foi de $54,23 \pm 5,68 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ e em *C. carbonarius* foi de $15,22 \pm 2,99 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Em relação ao V_{LM} , os pulmões de *T. scripta* apresentaram o valor de $0,29 \pm 0,04 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{ml}^{-1}$ e *C. carbonarius* $0,13 \pm 0,02 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{ml}^{-1}$. Em relação ao V_{LR} , os pulmões de *T. scripta* apresentaram o valor de $0,89 \pm 0,19 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{ml}^{-1}$ e *C. carbonarius* de $0,53 \pm 0,07 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{ml}^{-1}$. Visto que *C. carbonarius* apresentou menores valores em relação à *T. scripta* independente da variável que foi utilizada na relativização, a discussão desses dados foi pautada com relação à massa corpórea para ambas as espécies.

Na posição submerso em *T. scripta*, a complacência do sistema respiratório foi de $31,39 \pm 3,56 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, valor este significativamente maior que as demais posições. Membros e cabeça retraídos na carapaça apresentou o valor de $2,47 \pm 0,53 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$, sendo significativamente menor que supino ($16,87 \pm 1,92 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), submerso na água e pulmões livres ($54,23 \pm 5,68 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). Em prona ($7,43 \pm 0,77 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$), não houve diferença significativa em relação à supino e membros e cabeça retraídos na carapaça.

Por outro lado, *C. carbonarius* não apresentou diferença significativa na complacência estática das três posições em que foi submetida (supino: $4,25 \pm 0,60 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$; prona: $0,74 \pm 0,05 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$; membros e cabeça retraídos na carapaça: $0,36 \pm 0,05 \text{ ml.cmH}_2\text{O}^{-1}.\text{kg}^{-1}$). *C. carbonarius* apresentou o sistema respiratório menos complacente que *T. scripta* e outras espécies de Testudines, como mostra a tabela 1 e, além disso, não apresentou diferença entre as posições em que foi submetida.

Figura 6. Complacência estática relativa à massa corpórea (A), volume pulmonar residual (B) e volume pulmonar máximo (C) em *Trachemys scripta* nas posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos

na carapaça e submerso e com os pulmões livres. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figura 7. Complacência estática relativa à massa corpórea (A), volume pulmonar residual (B) e volume pulmonar máximo (C) em *Chelonoidis carbonarius* nas posições de supino, prona, membros e cabeça retraídos na carapaça, e com os pulmões livres. Os valores são representados pela média com as barras denotando o erro padrão da média. Os valores foram comparados pelo teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores de complacência estática do sistema respiratório (C_T) e dos pulmões (C_L) de testudines relativizados pela massa corpórea.

Espécie	C_T (ml.cmH ₂ O ⁻¹ .kg ⁻¹)	C_L (ml.cmH ₂ O ⁻¹ .kg ⁻¹)	Referência
<i>Caretta caretta</i>	10,7	41,7	Lutcavage et al. (1989)
<i>Chelonoidis carbonarius</i>	4,3	15,2	Este estudo
<i>Trachemys scripta</i>	10,0	170,0	Jackson (1971)
<i>Trachemys scripta</i>	8,4	35,1	Vitalis e Milsom (1986b)
<i>Trachemys scripta</i>	16,9	54,2	Este estudo

4.3. Complacência dinâmica

As figuras 8 e 9 mostram os dados de complacência dinâmica para as duas espécies em todas as posições e os pulmões. Nelas, verifica-se que conforme aumentou a frequência ventilatória, os valores de complacência dinâmica do sistema respiratório em todas as posições e dos pulmões para as duas espécies foram menores. As combinações de volume e frequência que foram estatisticamente diferentes para cada posição e os pulmões estão listadas nas tabelas 2 a 4. Outro efeito observado foi que as posições pelas quais os animais foram submetidos exerceu influência sobre a mecânica ventilatória (Figuras 8 e 9; Tabelas 3 e 5). Em *T. scripta*, as posições supino, prona e membros e cabeça retraídos na carapaça foram estatisticamente diferentes dos valores de pulmões ($p < 0,05$), sendo que prona e membros retraídos apresentaram diferenças estatísticas para quase todos os volumes na frequência de 5 respirações por minuto e a posição supino apresentou diferença estatística apenas para o volume de 5 ml. Membros e cabeça retraídos na carapaça foi estatisticamente diferente de submerso em 30 ml, 5 respirações por minuto. *C. carbonarius* também apresentou diferença estatística de supino, prona e membros e cabeça retraídos na carapaça em relação aos pulmões ($P < 0,05$). Essa diferença foi em todos os volumes e em quase todas as frequências ventilatórias. Membros e cabeça retraídos foi significativamente diferente das posições supino e prona, sendo que comparada à supino, essas diferenças foram em quase todas

as combinações de volume e frequências baixas e em relação à prona, apenas em 5 ml, 5 respirações por minuto.

Figura 8. Complacência dinâmica relativa à massa corpórea em *Trachemys scripta* nas posições supino (a), prona (b), membros e cabeça retraídos na carapaça (c) e submerso (d) e com os pulmões livres (e). Os valores são representados pela média sendo que as barras denotando o erro padrão da média foram ocultadas para melhor visualização dos dados.

Figura 9. Complacência dinâmica relativa à massa corpórea em *Chelonoidis carbonarius* nas posições supino (a), prona (b) e membros e cabeça retraídos na carapaça (c) e pulmões (d). Os valores são representados pela média sendo que as barras denotando o erro padrão da média foram ocultadas para melhor visualização dos dados.

Tabela 2. Efeito das combinações de volume e frequência para cada posição em *Trachemys scripta*.

Supino		Prona	Membros e cabeça retraídos	Submerso	Pulmões
10/5 vs 10/40*	5/5 vs 5/30**	15/10 vs 15/30***	5/5 vs 5/30*	15/5 vs 15/40*	5/5 vs 5/20**
15/5 vs 15/30*	5/5 vs 5/40***	15/10 vs 15/40***	5/5 vs 5/40**	30/5 vs 30/20*	5/5 vs 5/30***
15/5 vs 15/40***	5/10 vs 5/40**	15/15 vs 15/30**	15/5 vs 15/40*		5/5 vs 5/40***
20/5 vs 20/30***	10/5 vs 10/20***	15/15 vs 15/40***			10/5 vs 10/20**
20/10 vs 20/30*	10/5 vs 10/30***	20/5 vs 20/20***			10/5 vs 10/30***
25/5 vs 25/20**	10/5 vs 10/40***	20/5 vs 20/30***			10/5 vs 10/40***
30/5 vs 30/20**	10/10 vs 10/30***	20/10 vs 20/20**			20/5 vs 20/20*
	10/10 vs 10/40***	20/10 vs 20/30***			20/5 vs 20/30**
	10/15 vs 10/30*	25/5 vs 25/15***			25/5 vs 25/15*
	10/15 vs 10/40***	25/5 vs 25/20***			25/5 vs 25/20***
	15/5 vs 15/20***	25/10 vs 25/20***			30/5 vs 30/15**
	15/5 vs 15/30***	30/5 vs 30/15***			30/5 vs 30/20***
	15/5 vs 15/40***				

Os dados são apresentados pelo volume / frequência.

* $p \leq 0,05$ comparando duas combinações para uma determinada posição; ** $p < 0,01$ comparando duas combinações para uma determinada posição; *** $p < 0,001$ comparando duas combinações para uma determinada posição.

Tabela 3. Efeito das combinações de volume e frequência entre as posições em *Trachemys scripta*.

Supino vs Pulmões	Prona vs Pulmões	Membros e cabeça retraídos vs Pulmões	Membros e cabeça retraídos vs Submerso
5/5*	5/5***		
	10/5**	10/5**	
	15/5*	15/5**	
	20/5*	20/5**	
	25/5**	25/5***	
	30/5***	30/5***	30/5**

Os dados são apresentados pelo volume / frequência.

* $p \leq 0,05$ comparando uma combinação para duas posições; ** $p < 0,01$ comparando uma combinação para duas posições; *** $p < 0,001$ comparando uma combinação para duas posições.

Tabela 4. Efeito das combinações de volume e frequência para cada posição em *Chelonoidis carbonarius*.

Supino	Prona	Membros e cabeça retraídos	Pulmões
5/5 vs 5/20*	5/5 vs 5/15*		5/5 vs 5/15*
5/5 vs 5/30***	5/5 vs 5/20**		5/5 vs 5/20**
5/5 vs 5/40***	5/5 vs 5/30***		5/5 vs 5/30***
5/10 vs 5/40*	5/5 vs 5/40***		5/5 vs 5/40***
10/5 vs 10/20**	15/5 vs 15/40*		5/10 vs 5/40*
10/5 vs 10/30***			10/5 vs 10/20**
10/5 vs 10/40***			10/5 vs 10/30***
10/10 vs 10/30*			10/5 vs 10/40***
10/10 vs 10/40***			10/10 vs 10/40**
10/15 vs 10/40**			15/5 vs 15/20**
10/30 vs 20/10***			15/5 vs 15/30***
15/5 vs 15/15*			15/5 vs 15/40***
15/5 vs 15/20***			15/10 vs 15/30*
15/5 vs 15/30***			15/10 vs 15/40**
15/5 vs 15/40***			25/5 vs 25/15***
15/10 vs 15/30***			25/5 vs 25/20***
15/10 vs 15/40***			30/5 vs 30/10*
15/15 vs 15/40*			30/5 vs 30/15***
20/5 vs 20/15***			30/5 vs 30/20***
20/5 vs 20/20***			
20/5 vs 20/30***			
20/10 vs 20/30***			
25/5 vs 25/15**			
30/5 vs 30/15***			
30/5 vs 30/20***			
30/10 vs 30/20***			

Os dados são apresentados pelo volume / frequência.

* $p \leq 0,05$ comparando duas combinações para uma determinada posição; ** $p < 0,01$ comparando duas combinações para uma determinada posição; *** $p < 0,001$ comparando duas combinações para uma determinada posição.

Tabela 5. Efeito das combinações de volume e frequência entre as posições em *Chelonoidis carbonarius*.

Supino vs Pulmões	Prona vs Pulmões	Membros e cabeça retraídos vs Pulmões	Supino vs Membros e cabeça retraídos	Prona vs Membros e cabeça retraídos
5/5***	5/5***	5/5***	5/5 ***	5/5*
5/10***	5/10***	5/10***		
5/15***	5/15***	5/15***		
	5/20*			
10/5***	10/5***	10/5***	10/5***	
10/10***	10/10***	10/10***	10/10*	
	10/15***			
	10/20***	10/20***		
15/5***	15/5***	15/5***	15/15***	
15/10***	15/10***	15/10***	15/10**	
15/15***	15/15***	15/15***		
15/20*	15/20***	15/20***		
		15/30*		
	20/5***	20/5***	20/5***	
	20/10**	20/10***		
	20/15*	20/15**		
25/5***	25/5***	25/5***		
25/10***	25/10***	25/10***		
25/15***	25/15***			
	30/5***			
30/10***	30/10***			
30/15**	30/15***			
	30/20**			

Os dados são apresentados pelo volume / frequência.

* $p \leq 0,05$ comparando uma combinação para duas posições; ** $p < 0,01$ comparando uma combinação para duas posições; *** $p < 0,001$ comparando uma combinação para duas posições.

5. Discussão

5.1. Volumes pulmonares e complacência estática

5.1.1. *Trachemys scripta*

As diversas posições em que *T. scripta* foi submetida exerceram efeitos sobre os volumes pulmonares e a complacência do sistema respiratório em ambas as espécies. Ao submeter à posição de supino, não existe atrito dos membros do animal com o solo, já que a parte dorsal do animal fica apoiada sobre a bancada e os membros ficam caídos para fora, puxando as vísceras para fora, resultando no aumento da cavidade pleuroperitoneal e consequentemente nos volumes pulmonares.

Devido à pressão hidrostática exercida sobre o animal quando está submerso na água, as vísceras sofrem maior pressão no interior da carapaça, refletindo, em menor V_{LR} . Já o V_{LM} e a complacência estática da posição submerso apresentaram-se maior que prona e membros e cabeça retraídos na carapaça provavelmente devido à ausência de atrito dos membros com algum substrato, uma vez que os membros ficam livres na coluna d'água e, assim, existe menor resistência à expansão da cavidade pleuroperitoneal. Com o aumento do volume pulmonar, a flutuabilidade do animal aumenta e há redução da pressão hidrostática. Esse evento também pode influenciar a mecânica ventilatória nos animais, favorecendo maior expansão do sistema respiratório.

Quando o animal estava com os membros e cabeça retraídos na carapaça, foi observado menor V_{LR} , V_{LM} e complacência estática. Nessa posição, o que limita o aumento dos volumes pulmonares e assim resultando em um sistema respiratório menos complacente são os membros que estão inseridos na cavidade pleuroperitoneal. Os Testudines não expandem as costelas durante a ventilação, então o local onde os membros estão inseridos são os únicos lugares que permitem o aumento da cavidade pleuroperitoneal (Jackson, 1971a). Portanto, a posição de membros e cabeça retraídos na carapaça limita o aumento do volume da cavidade pleuroperitoneal, resultando em menor distensibilidade do sistema respiratório.

Em relação à razão V_{LR}/V_{LM} , quanto menor o valor, menor é a reserva expiratória e maior a reserva inspiratória. O resultado encontrado para essa espécie confirma a hipótese de que os membros retraídos impedem o aumento da cavidade pleuroperitoneal, pois tendo maior V_{LR}/V_{LM} , menor é a capacidade inspiratória

pulmonar. Esse fato também foi observado com o animal em prona, pois nessa posição, os pulmões, localizados na região dorsal, tem menor pressão das vísceras.

5.1.2. *Chelonoidis carbonarius*

C. carbonarius também apresentou diferenças de volumes pulmonares e complacência do sistema respiratório entre as posições submetidas e os pulmões. Os trabalhos presentes na literatura geralmente relativizam os dados de complacência estática em relação à massa corpórea dos indivíduos. Como *C. carbonarius* apresenta massa corpórea quase quatro vezes maior que *T. scripta*, discutir os dados relativizados apenas pela massa corpórea poderia causar entendimentos errôneos a respeito da mecânica respiratória das duas espécies. Porém, essa espécie sempre apresentou menores valores, independente da variável que foi utilizada para relativizar os dados (Figuras 6 e 7). Dessa maneira, os dados foram discutidos somente em relação à relativização pela massa corpórea.

Os valores de complacência mais baixos em *C. carbonarius* que as demais espécies estudadas podem ser explicadas pela presença de um septo pós-pulmonar mais desenvolvido (observação pessoal) nesses animais. Foi observado também que o epitélio respiratório dos pulmões de *C. carbonarius* aparenta ser mais denso do que *T. scripta*. Lambertz et al. (2010) mostraram que alguns representantes da família Testudinidae possuem septo pós-pulmonar mais desenvolvido que outros testudines. Estudos morfométricos quantitativos do sistema respiratório de *C. carbonarius* poderiam elucidar essa observação e caracterizar o aspecto de distribuição do epitélio respiratório (homogeneidade). Portanto, os pulmões com epitélio respiratório mais denso e distribuído de maneira homogênea poderiam explicar a complacência e os volumes pulmonares inferiores observados neste estudo.

Provavelmente isso também justifica o fato de *C. carbonarius* não apresentar diferença significativa nos valores de V_{LR} e V_{LM} de prona e membros e cabeça retraídos na carapaça, o que resultou também em maior reserva expiratória e menor inspiratória nesses animais (menor razão V_{LR}/V_{LM}). Em contrapartida, supino apresentou maior V_{LM} que prona e membros e cabeça retraídos na carapaça possivelmente devido a não existência de atrito dos membros do animal com o solo, possibilitando aumento da cavidade pleuropéritoneal. Já a razão V_{LR}/V_{LM} foi menor que as duas posições

justamente devido ao meio V_{LM} , o que significa que nessa posição os animais também possuem menor reserva expiratória e maior inspiratória

5.2. Complacência dinâmica

O efeito do aumento da frequência e volume observado durante a complacência dinâmica para ambas as espécies foi o mesmo verificado por Vitalis e Milsom (1986b). No trabalho desses dois autores, na medida em que a frequência foi aumentada (de 20 para 60 respirações por minuto) para cada volume aplicado, a complacência do sistema respiratório de *Trachemys scripta* diminuiu (de 5 para 2 ml.cmH₂O⁻¹.kg⁻¹).

A maioria das diferenças estatísticas encontradas para as duas espécies foi nas comparações entre as posições x pulmões. Isso acontece, pois quando os animais são abertos, as vísceras retiradas e o septo pós-pulmonar retirado quase totalmente (nem sempre é possível retirá-lo inteiro), diminui-se a pressão sobre os pulmões. Comparando as posições entre si, poucas combinações ou nenhuma foram diferentes. Porém, tais diferenças podem existir no gasto energético da ventilação. Para isso, o próximo passo deste trabalho será de realizar a análises do trabalho mecânico da ventilação a fim de verificar se o gasto enérgico da ventilação é diferente entre as posições.

6. Conclusões

Relacionando os dados de volume pulmonar, complacência estática e a dinâmica, conclui-se que essas análises se complementam e indicam para diferenças na mecânica ventilatória do sistema respiratório desses animais nas diferentes posições e só dos pulmões. Comparando os dados da literatura referentes à complacência em Testudines, verificou-se que *C. carbonarius* apresentou valores mais baixos de volumes pulmonares, de complacência estática e dinâmica, e a explicação para isso se deve provavelmente as diferenças morfológicas presentes no sistema respiratório desses animais.

Capítulo II

Padrões ventilatórios e trocas gasosas em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius*

1. Padrões ventilatórios e trocas gasosas

A ordem Testudines é um objeto de estudo interessante para a fisiologia comparada. Como citado anteriormente, esses animais apresentam características anatômicas singulares (Lyson et al., 2013), e, dentro de cada ordem existem diferenças morfológicas associadas ao sistema respiratório (Lambertz, 2010). Além disso, esses animais podem hibernar durante meses durante uma estação fria ou mesmo passam longo período em baixo da água quando a superfície de um lago congela (Ultsch, 2006; Madsen et al., 2013), de modo que, após esses períodos, respostas ventilatórias são ativadas devido às alterações fisiológicas que ocorrem nos organismos (Hicks e Wang, 2004).

Existem alguns métodos que permitem o estudo da ventilação e trocas gasosas em répteis. Um deles consiste em expor os animais à hipóxia (baixas concentrações de O_2) e hipercardia (altas concentrações de CO_2), na qual, conforme ventilam, quimiorreceptores de O_2 , CO_2 e pH são sensibilizados, ativando, dessa maneira, mecanismos que alteram o padrão ventilatório dos animais (Lutz e Prentice, 2002; Wang e Warburton, 1995; Lee e Milsom, 2015). Em outro tipo de método, os pesquisadores expõem os animais a diferentes temperaturas (Glass et al., 1979; Jackson et al., 1979b), fazendo com que o metabolismo seja alterado e, assim, modificam-se também os padrões ventilatórios, nos quais consistem em aumento ou diminuição da frequência ventilatória e/ou volume corrente (Vitalis e Milsom, 1986b; Cordeiro et al., 2014; Dzal et al., 2015; Johnson et al., 2015).

Além de trazer dados sobre o padrão ventilatório e o custo metabólico da ventilação dos animais, esse tipo de estudo pode apresentar resultados inéditos quanto às trocas gasosas que podem ocorrer nos organismos. Cordeiro e colaboradores (2014), ao estudarem o padrão ventilatório de duas espécies de cágados pleurodiras, *Podocnemis unifilis* e *Phrynops geoffroanus*, observaram que esta última possui ventilação reduzida e menor consumo de oxigênio quando comparada com outras espécies de Testudines. Tais resultados sugeriram para os pesquisadores que essa espécie pode possuir trocas gasosas extrapulmonares, tais como através da bursa cloacal, da pele e/ou do epitélio bucofaringeal.

Estimulando a ventilação, é possível calcular o custo metabólico da ventilação, o qual se refere ao quão custoso é para suprir forças elásticas e não elásticas associadas à expansão pulmonar e da cavidade corpórea (Wang e Warburton, 1995). Soma-se a isso o gasto energético dos músculos ventilatórios, que, em testudines, são associados aos membros locomotores (Gans e Hughes, 1967). Existem trabalhos na literatura mostrando esse custo em algumas espécies (Kinney e White, 1977; Gratz, 1979; Abe e Johansen, 1987; Jackson et al., 1991; Wang e Warburton, 1995; Cordeiro et al., 2014), sendo bem diversos, variando desde $-0,002 \text{ ml.O}_2.\text{ml}^{-1}$, em lagarto-teiú (*Tupinambis merianae*) (Skovgaard e Wang, 2004), até $0,03 \text{ ml.O}_2.\text{ml}^{-1}$ em uma espécie de cágado (*Podocnemis unifilis*) (Cordeiro et al., 2014).

Grande parte dos estudos sobre a ventilação em quelônios foi realizada em cágados (Jackson, 1973; Jackson et al., 1974; Vitalis e Milsom, 1986b; Frische et al., 2000; Cordeiro et al., 2014; Dzal et al., 2015; Johnson et al., 2015; Lee e Milsom, 2015) e alguns em tartarugas-marinha (Butler et al., 1984; Enstipp et al., 2011). Em relação aos jabutis, existem alguns trabalhos com espécies africanas e asiáticas que mostram somente algumas variáveis da ventilação desses animais (Burggren, 1977; Glass et al., 1978a; Benchetrit e Dejours, 1980), faltando, portanto, uma melhor caracterização sobre a fisiologia respiratória de jabutis e, além disso, em uma espécie da América do Sul.

T. scripta, espécie de cágado estudada neste projeto, já é bastante conhecida em relação à fisiologia respiratória (Jackson, 1971b; Jackson, 1973; Hitzig, 1982; Hitzig e Nattie, 1982; Vitalis e Milson 1986a,b; Lee e Milsom 2015), possibilitando assim validar os dados deste trabalho ao comparar com os da literatura. Já para o jabuti *C. carbonarius*, ainda não existem trabalhos na literatura mostrando o padrão ventilatório, as trocas gasosas ou o custo metabólico da ventilação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar o padrão ventilatório e as trocas gasosas pulmonares, bem como calcular o custo metabólico da ventilação de *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius*.

2.2. Objetivos específicos

Submeter as duas espécies de Testudines à hipóxia e hipercarbia, a fim de induzir respostas ventilatórias e possibilitar o estudo do padrão ventilatório e as trocas gasosas, bem como o cálculo do custo metabólico da ventilação.

3. Material e métodos

3.1. Animais

O Jacarezário da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP) localizada na cidade de Rio Claro forneceu, nos meses de novembro de 2014 e fevereiro de 2015, oito espécimes de *T. scripta* e seis de *C. carbonarius*, todos adultos e de ambos os sexos. Os animais foram mantidos no biotério de tetrápodes silvestres do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (Licença SISBIO: Número: 35221-1 e Protocolo Número: 12.1.1541.53.0 CEUA USP-Campus de Ribeirão Preto).

A massa corpórea dos espécimes de *T. scripta* tinha média e desvio padrão de $1,077 \pm 0,10$ kg e dos espécimes de *C. carbonarius*, $3,773 \pm 0,61$ kg. As caixas dos cágados *T. scripta* eram mantidas inclinadas, de modo que uma parte da caixa ficasse sem água. Os animais eram alimentados com ração para peixes carnívoros três vezes por semana e tinham acesso irrestrito à água. Já os jabutis *C. carbonarius* ficavam em caixas com maravalha, recebiam vegetais como alimento por três vezes na semana e tinham acesso ilimitado à água.

Ambas as espécies recebiam reforço vitamínico adicionado à alimentação e estavam sob ciclo de luz (12h claro/escuro) e temperatura controlada (25°C). As caixas em que ficavam os animais eram higienizadas uma vez por semana.

3.2. Determinação do mecanismo de ventilação e do custo metabólico da ventilação

Os animais foram submetidos à respirometria aberta, segundo o método de Glass et al. (1978) e modificada por Wang e Warburton (1995). Para isso, os animais ficaram de 5 a 7 dias em jejum e, 24 horas antes de iniciar o experimento, os mesmos foram colocados no *setup* do experimento para aclimação.

No caso de *T. scripta*, os animais foram colocados individualmente em um aquário com água onde uma única abertura permitia acesso ao ar. Nessa abertura encontrava-se um funil de cabeça para baixo com um pneumotacógrafo (tubo Fleisch) localizado na extremidade superior, em que havia um transdutor de pressão conectado para monitorar as diferenças de pressão e, assim, gerar o registro de ventilação (Figura 12). Na parte inferior do funil, havia três conectores (Figura 12). Em um deles retiravam-se continuamente amostras de ar de dentro do funil, nas quais eram direcionadas para um analisador de gases (ADInstruments) para registro da concentração de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2) nessas amostras. Em outro conector havia um tubo que fornecia misturas de ar provenientes de um misturador de gases (Pegas 4000MF, Columbus Instruments) contendo diferentes concentrações de O_2 e de CO_2 . E o último conector foi utilizado para a calibração da ventilação e dos gases no funil. Durante os experimentos com os animais, fechava-se esse último conector. A figura 10 é um esquema da metodologia utilizada para o experimento de respirometria.

Figura 10. Esquema do aparato utilizado na respirometria aberta para *T. scripta*. 1) cilindro dos gases (O_2 , CO_2 e N_2); 2) misturador de gases; 3) espirômetro (ADInstruments); 4) Labchart 8.0; 5) analisador de gases (ADInstruments); 6) desumidificador (sílica em gel); 7) funil com o pneumotacógrafo conectado na extremidade superior; 8) aquário; 9) computador.

O *setup* do experimento em *C. carbonarius* utilizou também da respirometria aberta, porém ao invés de utilizar um funil, foi colada uma máscara no pescoço dos animais, que foi construída com colar de cachorro colado em uma ponta superior de garrafa pet (Figura 11), onde havia o pneumotacógrafo e os conectores (Figura 12). O colar de cachorro foi fixado no pescoço do animal para impossibilitar de retraí-lo para dentro da carapaça. Além disso, o animal ficava em uma caixa contendo apenas maravalha.

Figura 11. Espécime de *Chelonoidis carbonarius* com a máscara desenvolvida para a respirometria. A máscara é composta pelo colar de cachorro adaptado e a ponta superior de uma garrafa pet de 2 litros. Na garrafa, estão inseridos os conectores e o pneumotacógrafo.

Figura 12. Esquema do funil ou da garrafa contendo conectores da parte superior (1 e 2) e inferior (3, 4 e 5). 1 e 2) conectores para medição da ventilação; 3) conector que fica fechado durante o experimento mas 4 e 5).

para a calibração da ventilação e dos gases, conecta-se uma seringa para a injeção dos volumes; 4) conector onde é removido constantemente a mistura gasosa do funil para determinação das concentrações gasosas; 5) conector onde fornece a mistura de gases proveniente do misturador de gases; 6) corte transversal do pneumotacógrafo, onde ocorre o fluxo laminar de ar.

Neste experimento, todos os animais foram submetidos à mistura de ar com concentrações ambientais de O₂ e CO₂ (normóxia), seguida de misturas hipóxicas ou hipercárbicas e finalizando com normóxia novamente. Não havia uma ordem de prioridade quanto ao tipo de tratamento que cada animal passaria, ou seja, os animais poderiam ser submetidos primeiramente à hipóxia e em outro dia à hipercardia ou vice-versa, sendo que havia no mínimo 12 horas de intervalo entre um tratamento e outro.

Em normóxia, foram utilizadas as concentrações de 20,95% de O₂ e 0,03% de CO₂. Já em hipóxia, as concentrações de O₂ utilizadas foram 9, 7, 5, e 3 % enquanto que o CO₂ permanecia em 0,03%. Em hipercardia, as concentrações de O₂ permaneciam em 20,95% e as de CO₂ utilizadas foram 1,5, 3, 4,5, e 6%. O tempo de exposição para cada situação era de duas horas, sendo que primeiramente os animais ficaram em normóxia, passando depois pelas diferentes concentrações hipóxicas ou hipercárbicas e finalizando em normóxia por uma hora (Figura 13). Amostras de ar foram retiradas continuamente de dentro da máscara e direcionadas para um analisador de gases (ADInstruments) para registro das concentrações de O₂ e de CO₂.

Figura 13. Esquema do protocolo experimental de respirometria aberta. O eixo X refere-se à duração do experimento (11 horas), indicando o início e o fim de cada situação (normóxia, hipóxia e hipercardia).

A calibração da máscara ou do funil foi feita com um ventilador (Inspira, *Harvard Apparatus*) artificial, com o qual se ventilavam volumes conhecidos de ar. Já

para a calibração da medida de trocas gasosas, foram injetados volumes conhecidos de ar com diferentes concentrações de O₂ e CO₂. Os dados obtidos da calibração do espirômetro e dos gases foram plotados em regressões lineares, nas quais foram obtidos bons ajustes ($r^2 > 0,9$) (Apêndices B e C). A equação da reta de cada regressão foi utilizada para calcular volume corrente, consumo de O₂ e produção de CO₂.

Para cada tratamento de duas horas, a última hora de exposição à mistura gasosa foi utilizada para extrair dados, exceto para a normóxia final, em que a última meia hora foi utilizada para extraí-los. Os dados extraídos foram: frequência ventilatória (f_R), frequência dos episódios ventilatórios (f_E), frequência ventilatória durante os episódios ventilatórios ($f_{\text{Repisódio}}$), volume corrente (V_C), duração da expiração (T_{EXP}), duração da inspiração (T_{INSP}), duração total de um ciclo ventilatório ($T_{\text{VENT}} = T_{\text{EXP}} + T_{\text{INSP}}$), duração de um período não ventilatório (T_{PNV}), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e produção de gás carbônico ($\dot{V}CO_2$). Com esses dados, foram calculados a ventilação por minuto ($\dot{V}_E$), o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$), a quantidade de gás carbônico liberado dentro da máscara ($\dot{V}CO_2$) e *air convection requeriment* ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ e $\dot{V}_E/\dot{V}CO_2$).

3.3. Tratamento estatístico

O *software GraphPad Prism 6.0* foi utilizado para a construção das figuras e análises estatísticas. Foi aplicado o teste ANOVA seguido pelo teste *post-hoc Tukey* comparando as fases de hipóxia entre elas e com normóxia e as de hipercarbida entre elas e com normóxia para cada parâmetro analisado. Valores de p abaixo ou igual 0,05 foram considerados significantes.

4. Resultados

O padrão da ventilação em *T. scripta* e *C. carbonarius* foi do tipo intermitente (Figura 14), na qual períodos não ventilatórios foram separados por curtos episódios ventilatórios contendo vários ciclos ventilatórios (expiração e inspiração).

Figura 14. Registros de ventilação (linha vermelha), porcentagem de gás carbônico (linha azul) e oxigênio (linha verde) dentro da câmara respirométrica de *Trachemys scripta* (A) e *Chelonoidis carbonarius* (B). Os répteis iniciam a ventilação expirando (sinal da ventilação para baixo em relação à linha de base), seguido por uma inspiração (sinal da ventilação para cima em relação à linha de base). Ao ventilar, a porcentagem de oxigênio cai e a de gás carbônico aumenta dentro da máscara.

4.1. Resposta ventilatória

Assim como verificado por outros autores (Burggren et al., 1977; Glass et al., 1978a; Vitalis e Milsom, 1986b; Cordeiro et al., 2014; Johnson et al., 2015), neste estudo foi observada uma resposta ventilatória em ambas as espécies expostas à ambientes hipóxicos e hipercárbicos (Figuras 15, 16 e 17). Houve aumento da ventilação nos níveis mais severos de hipóxia (3% O₂) e hipercarbia (6% CO₂) tanto em *T. scripta* ($16,36 \pm 5,37 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em normóxia e $117,2 \pm 34,66 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em 3% de O₂; $20,67 \pm 8,44 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em normóxia e $216,3 \pm 8,46 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em 6% de CO₂) como em *C. carbonarius* ($6,75 \pm 0,89 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em normóxia e $104,41 \pm 23,21 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em 3% O₂; $4,95 \pm 1,82 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em normóxia e $146,09 \pm 39,02 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em 6% de CO₂). Esse aumento em *C. carbonarius* foi resultado do aumento da frequência ventilatória ($1,87 \pm 0,23 \text{ ventilação.min}^{-1}$ em normóxia e $4,64 \pm$

0,58 ventilação.min⁻¹ em 3% O₂; 2,11 ± 0,31 ventilação.min⁻¹ em normóxia e 5,12 ± 0,74 ventilação.min⁻¹ em 6% de CO₂) e do volume corrente (3,98 ± 0,88 ml.kg⁻¹ em normóxia e 19,85 ± 4,54 ml.kg⁻¹ em 3% O₂; 2,31 ± 0,46 ml.kg⁻¹ em normóxia e 27,12 ± 6,14 ml.kg⁻¹ em 6% de CO₂) em hipóxia e hipercarbia.

Como consequência da frequência ventilatória, houve diminuição do período não-ventilatório (50,94 ± 1,99 s.min⁻¹ em normóxia e 25,72 ± 6,87 s.min⁻¹ em 3% O₂; 53,17 ± 0,75 s.min⁻¹ em normóxia e 20,95 ± 7,23 s.min⁻¹ em 6% de CO₂), aumento da ventilação por episódio em hipercarbia e do número de episódios ventilatórios em hipóxia (Figura 16). Além disso, *C. carbonarius* também apresentou aumento significativo no tempo de inspiração em hipóxia e hipercarbia (1,39 ± 0,08 s em normóxia e 2,64 ± 0,28 s em 3% O₂; 1,12 ± 0,06 s em normóxia e 3,11 ± 0,29 s em 6% de CO₂) e no ciclo ventilatório apenas significativo em hipóxia (2,91 ± 0,19 s em normóxia e 4,70 ± 0,47 s em 3% O₂; 2,31 ± 0,10 s em normóxia e 5,03 ± 0,43 s em 6% de CO₂) (Figura 16).

Já em *T. scripta*, não foi observada alteração na frequência ventilatória de hipóxia e hipercarbia (0,88 ± 0,22 ventilação.min⁻¹ em normóxia de hipóxia; 0,87 ± 0,18 ventilação.min⁻¹ em normóxia de hipercarbia), bem como nos volumes corrente (21,99 ± 4,95 ml.kg⁻¹ em normóxia de hipóxia; 21,13 ± 6,67 ml.kg⁻¹ em normóxia de hipercarbia). Também não foi observada alteração no período não-ventilatório (Figura 16) e no tempo de inspiração, expiração ou ciclo ventilatório (Figura 16). Já em relação ao número de ventilações por episódio e ao número de episódios ventilatórios, foi verificado aumento quando os animais foram expostos à hipóxia (Figura 16). Tais diferenças refletiram em tendência ao aumento na frequência ventilatória e volume corrente, o que resultou no aumento significativo da ventilação em *T. scripta* (Figura 15).

Em relação à normóxia final, foi observado retorno para os mesmos níveis da normóxia inicial em todas as variáveis analisadas, exceto na frequência ventilatória de *C. carbonarius* após passar por hipóxia (Figuras 15, 16, 17 e 18).

Figura 15. Frequência ventilatória (a, b), volume corrente (c, d) e ventilação por minuto (e, f) em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante as exposições em hipóxia e hipercarbia. Os pontos preenchidos são referentes às normóxias finais. * para *T. scripta* e + para *C. carbonarius* se referem aos valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores de normóxia. # normóxia final diferente ($p \leq 0,05$) da inicial.

Figura 16. Frequência ventilatória durante episódios ventilatórios (a, b), duração do período não-ventilatório (c, d) e frequência de episódios ventilatórios (e, f) em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante as exposições em hipóxia e hipercarbida. Os pontos preenchidos são referentes às normóxias finais. * para *T. scripta* e + para *C. carbonarius* se referem aos valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores de normóxia.

Figura 17. Duração da inspiração (a, b), duração da expiração (c, d) e duração de um ciclo ventilatório (e, f) em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante as exposições em hipóxia e hipercarbúria. Os pontos preenchidos são referentes às normóxias finais. * para *T. scripta* e + para *C. carbonarius* se referem aos valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos valores de normóxia.

4.2. Consumo de oxigênio e custo metabólico da ventilação

C. carbonarius não apresentou redução em relação aos valores de $\dot{V}O_2$ em normóxia quando foram expostos à hipóxia e hipercarbia (Figura 18). O $\dot{V}O_2$ em normóxia foi de $0,18 \pm 0,03 \text{ mlO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, sendo bem mais baixos que de outros jabutis já estudados (Tabela 6). Já o $\dot{V}O_2$ de *T. scripta* em normóxia foi $0,82 \pm 0,09 \text{ mlO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, reduzindo posteriormente ao expor os animais à hipóxia e hipercarbia ($0,09 \pm 0,01 \text{ mlO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em 3% de O_2 ; $0,20 \pm 0,07 \text{ mlO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em 6% de CO_2 (Figura 18). Os valores de $\dot{V}O_2$ em normóxia dessa espécie foram próximos aos dados presentes na literatura (Tabela 6).

Figura 18. Consumo de oxigênio em *Trachemys scripta* (quadrado) e *Chelonoidis carbonarius* (triângulo) durante as exposições à hipóxia (a) e hipercarbia (b). Os pontos preenchidos são referentes às normóxias finais. * para *T. scripta* se refere ao valor em normóxia significativamente diferente dos valores em hipóxia

O método de regressão linear foi utilizado para o cálculo do custo metabólico da ventilação. Para isso, plotaram-se os dados de $\dot{V}_E$ e $\dot{V}O_2$ de todos os indivíduos em normóxia, hipóxia e hipercarbia (Figura 19). O consumo de O_2 no ponto em que a $\dot{V}_E$ é igual a zero, representa o custo metabólico da ventilação. Sendo assim, esse método assume duas premissas: 1) as alterações metabólicas que ocorrem nos organismos durante a hipóxia e hipercarbia são relacionadas somente com mudanças na ventilação pulmonar; 2) existe uma relação linear entre a ventilação pulmonar e o consumo de

oxigênio. Porém, na literatura, esse método apresenta resultados diversos, variando desde $-0,0019 \text{ mlO}_2.\text{ml}^{-1}$ em uma espécie de lagarto (Skovgaard e Wang, 2004) a $0,03 \text{ mlO}_2.\text{ml}^{-1}$ em um cágado (Cordeiro et al., 2014). Neste trabalho foram encontrados valores próximos de zero para ambas as espécies em hipóxia e hipercarbia (Tabela 6).

Figura 19. Dados de ventilação plotados contra o consumo de oxigênio em *Trachemys scripta* (A) e *Chelonoidis carbonarius* (B) durante exposições de hipóxia (quadrado) e hipercarbia (triângulo). Os pontos nos gráficos representam valores de V_E e VO_2 de cada indivíduo durante exposições de normóxia, hipóxia e hipercarbia. Foi calculada a regressão linear para hipóxia e hipercarbia separadamente.

Tabela 6. Valores de frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_T), ventilação total (V_E) e consumo de oxigênio de testudines relativizados pela massa corpórea.

Espécie	f_R	V_T	V_E	Consumo de O_2	Referência
<i>Apalone ferox</i>				0,87±0,60	Bagatto e Henry (1999)
<i>Apalone spinifera</i>				0,36±0,06	Bagatto e Henry (1999)
<i>Chelonia mydas</i>	0,55±0,1	4,5±0,5	17,5±3,2	1,00±0,12	Jackson (1985)
<i>Chelonoidis carbonarius</i>	1,87±0,23	3,98±0,88	6,75±0,89	0,18±0,03	Este estudo
<i>Chrysemys picta bellii</i>	1,90±0,27	10,7±1,2	17,5	0,60	Glass et al. (1985)
<i>Chrysemys picta bellii</i>	1,9±0,3	9,3±3,1	16,7±4,0	0,58±0,1	Silver e Jackson (1985)
<i>Kinosternon leucostomum</i>				0,38±0,10	Bagatto e Henry (2000)
<i>Phrynops geoffroanus</i>	0,6±0,3	3,1±1,1	1,7±0,6	0,07±0,03	Cordeiro et al. (2014)
<i>Podocnemis unifilis</i>	2,4±1,0	9,9±1,4	26,0±7,6	1,13±0,07	Cordeiro et al. (2014)
<i>Staurotypus triporcatus</i>				0,41±0,06	Bagatto e Henry (2000)
<i>Testudo gigantea</i>				1,00±0,33	Hughes et al. (1971)
<i>Testudo hermanni</i>				1,29±0,85	Hughes et al. (1971)
<i>Testudo horsfieldi</i>	1,4	8,1	11,5		Berchetril e Dehours (1980)
<i>Testudo pardalis</i>	2,9±2,4	11,0±6,0	25,7±12,5		Burggen et al. (1977)
<i>Testudo pardalis</i>	2,9±0,3	10,7±2,7	13,4±3,6		Glass et al. (1978a,b)
<i>Trachemys scripta</i>				1,05±0,13	Bagatto e Henry (1999)
<i>Trachemys scripta</i>				0,90±0,07	Crawford et al. (1973)
<i>Trachemys scripta</i>	0,88±0,22	21,99±4,95	16,36±5,37	0,82 ± 0,09	Este estudo
<i>Trachemys scripta</i>	1,6±0,8	18,5±7,0	25,6±12,9	0,65±0,28	Jackson (1971)
<i>Trachemys scripta</i>	1,40±0,15			0,69±0,08	Jackson (1973)
<i>Trachemys scripta</i>	1,6±0,2	15,7±2,1	23,8±3,4	0,60±0,13	Lee e Milsom (2015)

Tabela 7. Custo metabólico da ventilação em *Trachemys scripta* e *Chelonodis carbanarius* calculado através do método de regressão linear dos valores de hipóxia e hipercarbia plotados individualmente.

Espécie	Estímulo	Custo metabólico da ventilação (ml.O ₂ .ml ⁻¹)	r ²
<i>T. scripta</i>	Hipóxia	-0,001613 ± 0,001923	0,0222
<i>T. scripta</i>	Hipercarbia	-0,00007818 ± 0,0009260	0,0003
<i>C. carbonarius</i>	Hipóxia	-0,0001983 ± 0,0004134	0,0103
<i>C. carbonarius</i>	Hipercarbia	0,0009340 ± 0,0003916	0,1689

5. Discussão

5.1. Ventilação

Esse tipo de padrão intermitente de ventilação está presente em quase todas as espécies de répteis já estudadas e é considerado um mecanismo adaptativo na qual diminui o custo metabólico da ventilação (Vitalis e Milsom, 1986a). Glass e colaboradores (1978a) também observaram esse padrão ventilatório em *Testudo pardalis*, porém os episódios ventilatórios continham uma única ventilação e os períodos não-ventilatórios eram curtos.

Os dados de frequência ventilatória e *C. carbonarius* são próximos dos encontrados por Burggren e colaboradores (1977) em outra espécie de jabuti (*Testudo pardalis*, pertencente à família Testudinidae), sendo maior o volume corrente e ventilação total nessa espécie. Os dados de ventilação e frequência ventilatória de *T. scripta* apresentou-se muito próximos de outros estudos com essa mesma espécie. Além disso, o fato de os organismos terem apresentado retorno à condição inicial (normóxia) após passar por hipóxia ou hipercarbia, pode indicar que esses animais possuem alta capacidade de ajuste fisiológico sobre as respostas ventilatórias após exposições em diferentes concentrações de O₂ e CO₂. Nielsen (1960) também verificou rápido retorno aos níveis de normóxia inicial da frequência ventilatória após exposição hipercárbica em duas espécies de lagarto (*Lacerta viridis* e *L. sicula*). Em contrapartida, Klein e colaboradores (2002) não verificaram retorno da frequência ventilatória aos níveis de normóxia inicial em outra espécie de lagarto (*Uromastix aegyptius microlepis*). Nesse estudo (Klein et al., 2002), foi observado aumento da frequência ventilatória logo após o período de hipercarbia

O aumento da frequência ventilatória em *C. carbonarius* resultou na diminuição do período não-ventilatório, ao passo que em *T. scripta* não houve diferença significativa no período não-ventilatório. Isso aconteceu, pois a frequência ventilatória também não apresentou diferença significativa em *T. scripta*. Apesar de não ter havido diferença, houve tendência ao aumento na frequência ventilatória, assim como no volume corrente, o que resultou no aumento significativo da ventilação. O tempo de ventilação nas duas espécies foi próximo aos valores encontrados em outros estudos (Benchetrit e Dejours, 1980; Milsom e Jones, 1980; Cordeiro et al., 2014), havendo um aumento significativo nos níveis mais severos de hipóxia e hipercarbica apenas em *C. carbonarius*.

Consumo de oxigênio e custo metabólico da ventilação

Visto que os dados de custo metabólico da ventilação foram baixos e o $\dot{V}O_2$ de *T. scripta* reduziu significativamente em hipóxia e houve uma tendência de redução metabólica em hipercarbica, possíveis explicações para isso são: 1) a ventilação intermitente que esses animais exibem podem causar erros de análises; 2) podem ter apresentado depressão metabólica quando expostos a baixas concentrações de O_2 e altas de CO_2 (Lee e Milsom, 2015). Por ventilar de modo intermitente, alguns animais podem ter tido períodos não ventilatórios maiores que outros, causando assim um erro na estimativa do custo metabólico da ventilação. Além disso, nesse método é realizada a análise de todas as ventilações do período estipulado. Segundo Lee e Milsom (2015), isso pode causar erro nos cálculos do custo metabólico da ventilação, pois a primeira ventilação após um período não ventilatório demandaria maior custo energético comparado com as outras ventilações que ocorrem quando o animal já está ventilando por certo período.

Segundo Hicks e Wang (2004), quando os animais são expostos à baixa concentração de O_2 , a depressão do metabolismo aeróbico pode ocorrer devido a três fatores: 1) os animais apresentarem o comportamento de escolher ambientes com temperaturas mais baixas, diminuindo a taxa metabólica do organismo; 2) ocorrer respostas metabólicas nas células dos organismos, que diminuem a produção e demanda de ATP; e 3) muitos répteis aquáticos possuem o *shunt* cardíaco direito-esquerdo, na

qual o sangue é desviado da circulação venosa para a circulação arterial sistêmica, diminuindo o fluxo sanguíneo nos pulmões. Além de ambientes hipóxicos, alta concentração de CO₂ também pode induzir depressão metabólica, como foi visto em uma espécie de serpente por Wang e colaboradores (1993). Além disso, hipercarbia pode induzir redução do metabolismo não ventilatório devido à acidose metabólica (Wang et al., 1993).

Portanto, os valores de custo metabólico da ventilação encontrados para *T. scripta* e *C. carbonarius* podem ter sido subestimados devido à possível depressão metabólica apresentadas por esses animais, corroborando dados da literatura (Wang et al., 1993; Wang e Warburton, 1995; Lee e Milsom, 2015). Hipóxia e hipercarbia têm efeitos diretos sobre o metabolismo dos animais, o que, por sua vez, pode refletir em erros na estimativa do custo metabólico da ventilação. Além disso, o método pode não ser ideal para esse tipo de análise. Skovgaard e Wang (2007) propõem a realização de outros métodos de indução da ventilação para o cálculo do custo metabólico da ventilação, como por exemplo, através da secção cirúrgica do nervo vago, anulando, assim, os efeitos metabólicos que hipóxia e hipercarbia podem causar.

6. Conclusões

Assim como na maioria das espécies de répteis já estudadas, *T. scripta* e *C. carbonarius* apresentaram o padrão de ventilação intermitente. Além disso, também exibiram respostas ventilatórias quando foram expostos à hipóxia e hipercarbia, sendo tais respostas mais pronunciadas em *C. carbonarius*. Comparando com dados de outros jabutis presentes na literatura, esses valores foram mais baixos, ao passo que os dados encontrados para *T. scripta* são mais próximos aos dados da literatura para a mesma espécie.

Além disso, o método para cálculo do custo metabólico da ventilação parece não ser eficiente devido à possíveis alteração fisiológicas e/ou comportamentais que podem ocorrer.

Considerações finais

Este estudo trouxe dados inéditos sobre a influência das posições (membros e cabeça retraídos na carapaça e/ou submerso na água) exibidas por *T. scripta* e *C. carbonarius* sobre a mecânica ventilatória. Além disso, os dados de complacência e volumes pulmonares mostraram, para todas as posições e para os pulmões, valores inferiores em *C. carbonarius*, indicando possíveis diferenças morfológicas nos pulmões dessa espécie quando comparados a outros Testudines. Os dados de *T. scripta* são próximos com os dados dessa espécie presentes na literatura, e os de *C. carbonarius* são inéditos.

Os dados de ventilação foram coerentes com dados de Testudines presentes na literatura. Como visto em outros trabalhos, *T. scripta* e *C. carbonarius* mostraram baixo consumo de O₂ e o custo metabólico da ventilação também apresentou valores baixos. Ademais, outros trabalhos na literatura também mostraram baixo custo metabólico da ventilação que, segundo alguns autores, pode ser devido ao método que não seria ideal para essa análise ou os animais tiveram depressão metabólica.

Referências bibliográficas

- Abe, A. S.; Johansen, K. 1987. Gas exchange and ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in *Amphisbaena alba* (Reptilia: Amphisbaenia). The Journal of Experimental Biology. 127:159-172.
- Bagatto, B.; Henry, R. P. 1999. Exercise and forced submerged in the pond slider (*Trachemys scripta*) and softshell turtle (*Apalone ferox*): influence on bimodal gas exchange, diving behavior and blood acid-base status. The Journal of Experimental Biology. 202:267-278.
- Benchetrit, G.; Dejours, P. 1980. Ventilatory CO₂ drive in the tortoise *Testudo horsfieldi*. The Journal of Experimental Biology. 87:229-236.
- Brainerd, E. L. 1999. New perspectives on the evolution of lung ventilation mechanisms in vertebrates. Experimental Biology Online (EBO). 4:2, 11-28.
- Burggren, W. W.; Glass, M. L.; Johansen, K. 1977. Pulmonary ventilation: perfusion relationships in terrestrial and aquatic chelonian reptiles. Canadian Journal of Zoology. 55:2024-2034.
- Butler P. J.; Milsom, W. K.; Woakes, A. J. 1984. Respiratory, cardiovascular and metabolic adjustments during steady state swimming in the green turtle, *Chelonia mydas*. Journal of Comparative Physiology B. 154:167-174.
- Crawford Jr, E. C.; Gatz, R. N.; Magnussen, H.; Perry, S. F.; Piiper, J. 1976. Lung volumes, pulmonary blood flow and carbon monoxide diffusing capacity of turtle. Journal of Comparative Physiology B. 107:169-178.
- Cordeiro, T. E. F.; Abe, A. S.; Klein, W. 2014. Ventilation and gas exchange in two turtles: *Podocnemis unifilis* and *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Pleurodira). Respiratory physiology and neurobiology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.010>.
- Dzal, Y. A.; Jenkin, S. E. M.; Lague, S. L.; Reichert, M. N.; York, J. M.; Pamenter, M. E. 2015. Oxygen in demand: How oxygen has shaped vertebrate physiology. Comparative Biochemistry and Physiology. 186:4-26.

- Enstipp, M. R.; Ciccione, S.; Gineste, B.; Milbergue, M.; Ballorian, K.; Ropert-Coudert, Y.; Kato, A.; Plot, V.; Georges, J.Y. 2011. Energy expenditure of freely swimming adult green turtles (*Chelonia mydas*) and its link with body acceleration. *The Journal of Experimental Biology*. 214:4010-4020.
- Ernst, C.H.; Lovich, J.E. 2009. *Turtles of the United States and Canada*. The Johns Hopkins University Press.
- Frische S.; Fago, A.; Altimiras, J. 2000. Respiratory responses to short term hypoxia in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 126: 223:231.
- Gans, C.; Hughes, G. M. 1967. The mechanism of lung ventilation in the tortoise *Testudo graeca* Linne. *The Journal of Experimental Biology*. 47:1–20.
- Gaunt A. B.; Gans, C. 1969. Mechanics of respiration in the snapping turtle, *Chelydra serpentina* (Linné). *Journal of Morphology*. 128:195-227.
- Glass, M.; Burggren, W. W.; Johansen, K. 1978a. Ventilation in an aquatic and terrestrial chelonian reptile. *The Journal of Experimental Biology*. 72:165-179.
- Glass, M. L.; Hicks, J. W.; Riedesel, M. L. 1979b. Respiratory response to long-term temperature exposure in the box turtle, *Terrapene ornata*. *Journal of Comparative Physiology B*. 131:353-359.
- Gratz, R. K. 1979. Ventilatory response of the diamondback water snake, *Natrix rhombifera* to hypoxia, hypercapnia and increased oxygen demand. *Journal of Comparative Physiology B*. 129:105-110.
- Herman, J. K.; Smatresk, N. J. 1999. Cardiorespiratory response to progressive hypoxia and hypercapnia in the turtle *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Biology*. 202:3205-3213.
- Hicks, W. J.; Wang, T. 1999. Hypoxic hypometabolism in the anesthetized turtle, *Trachemys scripta*. *American Journal of Physiology*. 277:R18-R23.
- Hicks, W. J.; Wang, T. 2004. Hypometabolism in reptiles: behavioural and physiological mechanism that reduce aerobic demands. *Respiratory physiology and neurobiology*. 141:261-271.

- Hitzig, B. M. 1982. Temperature-induced changes in turtle CSF pH and central control of ventilation. *Respiration Physiology*. 49:205-222.
- Hitzig, B. M.; Nattie E. E. 1982. Acid-base stress and central chemical control of ventilation in turtles. *Journal of Applied Physiology*. 53:1365-1370.
- Hopkins, S. R.; Wang, T.; Hicks, J. M. 1996. The effect of altering pulmonary blood flow on pulmonary gas exchange in the turtle *Trachemys (Pseudemys) scripta*. *The Journal of Experimental Biology*. 199:2207-2214.
- Hughes, G. M.; Gaymer, R.; Moore, M.; Woakes, A. J. 1971. Respiratory exchange and body size in the aldabra giant tortoise. *The Journal of Experimental Biology*. 55:651-665.
- Jackson, D. C. 1971a. Mechanical basis for lung volume variability in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *American Journal of Physiology*. 220:754-758.
- Jackson, D. C. 1971b. The effect of temperature on ventilation in the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Respiration Physiology*. 12:131-140.
- Jackson, D. C. 1973. Ventilatory response to hypoxia in turtles at various temperature. *Respiration Physiology*. 18:178-187.
- Jackson, D. C.; Palmer, S. E.; Meadow, W. 1974. The effects of temperature and carbon dioxide breathing on ventilation and acid-base status of turtles. *Respiration Physiology*. 20:131-146.
- Jackson, D. C.; Kraus D. R.; Prange, H. D. 1979a. Ventilatory response to inspired CO₂ in the sea turtle: effects of body size and temperature. *Respiration Physiology*. 38:71-81.
- Jackson, D. C.; Prange, H. D. 1979b. Ventilation and gas exchange during rest and exercise in adult green sea turtle. *Journal of Comparative Physiology*. 134:315-319.
- Johnson, S. M.; Krisp, A. R.; Bartman, M. E. 2015. Hypoxia switches episodic breathing to singlet breathing in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta*) via a tropisetron-sensitive mechanism. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 207:48-57.

- Kinney, J. L.; White, F. N. 1977. Oxidative cost of ventilation in a turtle *Pseudemys floridana*. *Respiration Physiology*. 31:327-332.
- Klein, W.; Abe, A. S.; Perry, S. F. 2003. Static lung compliance and body pressures in *Tupinambis merianae* with and without post-hepatic septum. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 135:73-86.
- Klein, W.; Cood, J.R. 2010. Breathing and locomotion: Comparative anatomy, morphology and function. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 173S: S26-S32.
- Lambertz, M.; Böhme, W.; Perry, S. F. 2010. The anatomy of the respiratory system in *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 (Testudines: Cryptodira) and related species, and its phylogenetic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 156:330-336.
- Lambertz, M.; Grommes, K.; Kohlsdorf, T.; Perry, S. F. 2014. Lungs of the first amniotes: why simple if they can be complex?. *Biology Letters*. 11:20140848.
- Landberg, T.; Mailhot, J. D.; Brainerd, E. L. 2003. Lung ventilation during treadmill locomotion in a terrestrial turtle, *Terrapene Carolina*. *The Journal of Experimental Biology*. 206: 3391-3404.
- Landberg, T.; Mailhot, J. D.; Brainerd, E. L. 2009. Lung ventilation during treadmill locomotion in a semi-aquatic turtle, *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Biology*. 311A:551-562.
- Le, M.; Raxworthy, C. J.; McCord, W. P.; Mertz, L. 2006. A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:517-531.
- Lee, S. Y.; Milsom, W. 2015. The metabolic cost of breathing in red-eared sliders: An attempt to resolve an old controversy. *Respir. Physiol & Neurobiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2015.10.011>.
- Lutz, P. L.; Prentice, H. M. 2002. Sensing and responding to hypoxia, molecular and physiological mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 463-468.
- Lyson, T. R.; Bever, G. S.; Scheyer, T. M.; Hsiang, A. Y.; Gauthier, J. A. 2013. Evolutionary origin of the turtle shell. *Current Biology*. 23: 1-7.

- Lyson, T. R.; Schachner, E. R.; Botha-Brink, J.; Scheyer, T. M.; Lambertz, M.; Bever, G. S.; Rubidge, B. S.; Queiroz, K. 2014. Origin of the unique ventilator apparatus of turtles. *Nature Communications*. 5:5211.
- Madsen, J. G.; Wang, T.; Beedholm, K.; Madsen, P. T. 2013. Detecting spring after a long winter: coma or slow vigilance in cold, hypoxic turtles?. *Biology Letters*. 9:20130602.
- Milsom, W. K.; Jones, D. R. 1980. The role of vagal afferent information and hypercapnia in control of breathing pattern in chelonian. *The Journal of Experimental Biology*. 87: 53-63.
- Milsom, W. K.; Vitalis, T. Z. 1984. Pulmonary mechanics and work of breathing in the lizard, *Gekko gecko*. *The Journal of Experimental Biology*. 113: 187-202.
- Nielsen, B. 1961. On the regulation of the respiration in reptiles. I. The effect of temperature and CO₂ on the respiration of lizards (*Lacerta*). *The Journal of Experimental Biology*. 38:301-314.
- Orenstein, R. 2012. Turtle, tortoises and terrapins: a natural history. 2^a edição. Firefly Book.
- Pages, T.; Fuster, J. F.; Palacios, L. 1990. Some mechanical characteristics of the turtle respiratory system of the fresh-water turtle *Mauremys caspica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 97A:411-416.
- Perry, S. F., Duncker, H. -R. 1978. Lung architecture, volume and static mechanics in five species of lizards. *Respiration Physiology*. 34:61-81.
- Perry, S. F., Duncker, H. -R. 1980. Interrelationship of Static Mechanical Factors and Anatomical Structure in Lung Evolution. *Journal of Comparative Physiology*. 138:321-334.
- Perry, S. F. 1983. Reptilian Lungs. Functional anatomy and evolution. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 79:1-81.
- Perry, S.F. 1998. Lungs: Comparative Anatomy, Functional Morphology, and Evolution. p. 1-92 In: C. Gans & A.S. Gaunt, *Biology of Reptilia*. Vol. 19 (Morphology G). Ithaca, New York.

- Pough, F.H.; Janis, C.M.; Heiser, J.B. 2008. A Vida dos Vertebrados. Atheneu Editora. 4ª ed.
- Skovgaard, N.; Wang, T. 2004. Cost of ventilation and effect of digestive state on the ventilatory response of the tegu lizard. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 141:85-97.
- Skovgaard, N.; Wang, T. 2007. Low cost of ventilation in the vagotomised alligator (*Alligator mississippiensis*). *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 159:28-33.
- Uetz, P. (editor), The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, acessado em 13/11/2015.
- Ult, G. R. 2006. The ecology of overwintering among turtles: where turtles overwinter and its consequences. 81: 339-367.
- Vitalis, T. Z.; Milsom, W. K. 1986a. Mechanical analysis of the spontaneous breathing in the semi-aquatic turtle, *Pseudemys scripta*. *The Journal of Experimental Biology*. 125:157-171.
- Vitalis, T.Z.; Milsom, W.K. 1986b. Pulmonary Mechanics and the Work of Breathing in the Semi-aquatic Turtle, *Pseudemys scripta*. *The Journal of Experimental Biology*. 125: 137-155
- Wang, T.; Fernades W.; Abe, A. S. 1993. Blood pH and O₂ homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). *The SNAKE*. 25:21-26.
- Wang, T.; Warburton, S.J. 1995. Breathing pattern and cost of ventilation in the American alligator. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 102:29–37.

Apêndices

Apêndice A - Fórmulas utilizadas para o cálculo das variáveis analisadas no experimento de mecânica respiratória.

Variável	Fórmula
Volume pulmonar residual	-
Volume pulmonar máximo	-
Volume de reserva dos pulmões	-
Complacência estática	$\frac{V_{\text{FINAL}} - V_{\text{INICIAL}}}{P_{\text{FINAL}} - P_{\text{INICIAL}}}$
Complacência dinâmica	$\frac{V_{\text{FLUXO MÁXIMO}} - V_{\text{FLUXO MÍNIMO}}}{P_{\text{FLUXO MÁXIMO}} - P_{\text{FLUXO MÍNIMO}}}$

Apêndice B - Regressão linear feita para a calibração do sistema em relação ao volume corrente (A), consumo de oxigênio (B) e liberação de gás carbônico (C) de *Trachemys scripta*.

Apêndice C - Regressão linear feita para a calibração do sistema em relação ao volume corrente (A), consumo de oxigênio (B) e liberação de gás carbônico (C) de *Chelonoidis carbonarius*.

Apêndice D - Fórmulas utilizadas para o cálculo das variáveis do experimento de padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação.

Variável	Fórmula	Unidades
Frequência respiratória	n° expirações / 60min	Ventilações.min ⁻¹
Volume corrente	*	ml.kg ⁻¹
Ventilação por minuto	V _C .f _R	ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹
Frequência ventilatória por episódio	**	ventilação.episódio ⁻¹
Período não-ventilatório	***	s.min ⁻¹
Frequência de episódios ventilatórios	**	episódio.hora ⁻¹
Duração da inspiração	**	s
Duração da expiração	**	s
Duração de um ciclo ventilatório	T _{INP} + T _{EXP}	s
Consumo de oxigênio	*	ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹
Produção de gás carbônico	*	ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹
Volume de ar para absorver 1 ml de O ₂	-	ml.mlO ₂ ⁻¹
Volume de ar para remover 1 ml de CO ₂	-	ml.mlCO ₂ ⁻¹
Razão de troca respiratória	-	-

* Obtidos a partir das equações de reta geradas durante as calibrações. ** Obtidos no próprio registro do LabChart 8.0. *** Foi selecionado as áreas em que não havia ventilação dentro do período analisado de cada animal e obtido diretamente no LabChart 8.0