UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Aspectos comportamentais e morfo-fisiológicos das trocas gasosas de *Phrynops geoffroanus*
(Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae)

Tábata Elise Ferreira Cordeiro

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

Ribeirão Preto - SP
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Aspectos comportamentais e morfo-fisiológicos das trocas gasosas de *Phrynops geoffroanus*
(Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae)

Tábata Elise Ferreira Cordeiro

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Wilfried Klein

Ribeirão Preto - SP

2019

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.

Cordeiro, Tábata Elise Ferreira

Aspectos comportamentais e morfo-fisiológicos das trocas gasosas de *Phrynops geoffroanus* (Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae). Ribeirão Preto, 2019.

188 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área: Biologia Comparada.

Orientador: Klein, Wilfried.

1. Fisiologia. 2. Respiração. 3. Respiração extrapulmonar. 4. Protocolo anestésico. 5. Comportamento animal. 6. Morfologia. 7. Estereologia. 8. Gases sanguíneos. 9. Quelônios. 10. *Phrynops geoffroanus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aspectos comportamentais e morfo-fisiológicos das trocas gasosas de *Phrynops geoffroanus* (Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae).

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, que esteve comigo durante toda essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto de um trabalho de anos de muita persistência, aprendizados, frustrações e recomeços. E no final, tudo deu certo. Um trabalho que não começou neste doutorado, mas que vem sendo construído ao longo de toda a minha formação pessoal e profissional. Em momentos como este, o fechamento de um ciclo, consigo parar para refletir o quanto eu tenho a agradecer. GRATIDÃO. Por ter tido tantos parceiros ao longo desses anos, que me acompanharam, me ajudaram, me fortaleceram e me permitiram terminar mais essa etapa da minha vida. A todos vocês, um pouco das minhas sinceras palavras.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilfried Klein, pela orientação ao longo dos últimos 11 anos. Obrigada pelas orientações e contribuições para este trabalho, pela paciência, seriedade e serenidade nos momentos mais complicados.

À minha família e os meus ancestrais. Obrigada às minhas avós e tias. Eu não vi a luta dos meus ancestrais, mas tenho certeza que sem luta e não teria chegado até onde cheguei. Eu vi a luta dos meus pais para dar a mim e a minha irmã todas as oportunidades para sonharmos e realizarmos esses sonhos. A determinação que eu tenho hoje vem de vocês e é o maior legado que eu posso receber. Obrigada por todo o amor que vocês nos deram.

À minha irmã, Tamiris, por acreditar em mim com tanta força, mesmo quando eu não acreditei. Foi em você que me reergui depois tantos tropeços e decepções. Foi com você que dei tantas risadas e recebi tanto amor. Espero poder ser ao menos um pouquinho do tantão que você é para mim.

À Helena, minha amiga que escolhi para ser minha irmã. Obrigada pelas horas de conversas, sejam as de trabalho ou as pessoais. A gente escolheu ser parceiras na vida e eu tenho muito orgulho disso.

Ao Sandro, meu amor. Obrigada pela dedicação a esse relacionamento e por toda sua compreensão nesses anos distante. Crescemos juntos e agora temos uma vida de coisas boas pela frente.

Aos meus amigos, minha rede de apoio em tanto lugares deste Brasil (e do mundo). Obrigada a todos que tanto torcem por mim e acompanham as minhas conquistas. Que nossas vidas continuem se conectando, qualquer que seja a cidade!

Às amigas de apê...o apt 33 foi um local de alta rotatividade e de muito amor. Eu tenho um carinho muito grande por todas as lindas amizades que pude fazer ao longo desses anos. Obrigada também ao apt A12. Nossa história foi breve e encantadora.

Às mulheres mais especiais que conheci em Ribeirão, minhas companheiras de handebol da LAURP e da FILÔ, sempre dividindo dores e alegrias. Os anos em Ribeirão Preto se tornaram mais leves e aconchegantes graças a vocês.

Às minhas amigas doutoras, Melina e Lilian. O doutorado é processo difícil, mas eu encontrei no meio caminho duas pessoas que me permitiram respirar um pouco...sendo dando risadas ou fazendo uma análise super crítica da situação do país. Sentirei saudades das nossas (longas) horas de conversa na cantina.

Aos companheiros de PEIC, lugar onde me descobri educadora e mais, onde eu amei descobrir isso. A educação agora é uma missão de vida. E o PEIC me mostrou que é possível se trabalhar a educação de uma forma mais significativa.

Aos amigos do Laboratório de Morfo-Fisiologia de Vertebrados, Vanessa, Vitor, Diego, Rafa, Alan, Ray, Carla, Flávia Bárbara, pelas ricas discussões que tanto ajudaram a compor esta tese e pela ajuda nos perrengues. A gente nunca deve trabalhar sozinha e eu aprendi muito disso com vocês.

À mais especial de todas, minha amiga e colega de trabalho Susie Keiko Teixeira Rocha. Obrigada por ser a excelente profissional que você é, contribuindo com o andamento do laboratório. Obrigada também pela preocupação e pelo carinho.

À Thais, por seu profissionalismo, que me ajudou a ver o quanto fui e sou capaz de enfrentar os percalços da vida e perceber tudo que eu venho construindo ao longo da minha trajetória. Preciso também agradecer às tantas colaborações e parcerias que fiz e que permitiram que este trabalho pudesse ser concluído.

Ao Prof. Dr. André Luis da Cruz, por tantos ensinamentos sobre estereologia e momentos de discussão.

Aos Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva, Ademilson Panunto Castelo, Tiago Campos Pereira, Patrícia Ferreira Monticelli e Marisa Fernandes pelo empréstimo de aparelhos que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. John Campbell McNamara, pelas contribuições acadêmicas ao longo dos anos como parecerista dos meus relatórios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, nas pessoas da Vera (e Renata) e prof. Dra. Tiana. Obrigada por toda a disponibilidade nos momentos de dúvida e apreensão.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, ao Departamento de Biologia e à Comissão de Pós-Graduação, onde vivenciei um pouco da universidade pública de excelência e também pude participar de comissões como representante discente. Foi uma ótima experiência.

Obrigada também por todo o apoio institucional, principalmente em nome dos técnicos da secretaria, transporte e manutenção.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Laboratório Multiusuário de Histotécnica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e seus maravilhosos técnicos Tuca, Vani e Zé, pelo suporte científico e técnico no processamento de tecido para microscopia de luz e eletrônica.

Ao técnico Humberto Giusti, que me ensinou a difícil arte da canulação arterial. Obrigada pela disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Às técnicas Talita, do Departamento de Biologia, e Roberta, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio em etapas do trabalho.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia da UFSCar, pela recepção e ajuda na etapa de análises bioquímicas deste trabalho. Em especial, Drielle, Livia e Gustavo, que estiveram todos os dias comigo e me ensinaram e ajudaram demais.

Aos veterinários Gustavo e João (Nucleon), por todo o auxílio com o trabalho para a elaboração do protocolo anestésico, e César, pela abertura do Bosque Fábio Barreto para ceder os animais usados neste estudo.

Aos cagadinhos lindos, com quem tanto aprendi sobre fisiologia. Os quelônios, quando ainda era criança, despertaram o meu interesse por animais, que me levou à biologia e por último à fisiologia. Que eu possa continuar contribuindo para a produção do conhecimento desses animais tão fascinantes.

À CAPES e FAPESP, pela bolsa doutorado e aporte financeiro que permitiu que esse trabalho pudesse ser executado.

À todos vocês toda a minha GRATIDÃO. Esta tese tem um pouquinho de cada um de vocês e eu nunca me esquecerei de todos os momentos passados vividos durante este doutorado.

“Quanto mais a gente ensina, mais aprende o que ensinou.”

(MARIA BETHÂNIA, 1983)

RESUMO

CORDEIRO, Tábata Elise Ferreira. **Aspectos comportamentais e morfo-fisiológicos das trocas gasosas de *Phrynops geoffroanus* (Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae)**. 2019. XX f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Testudines realizam ventilação pulmonar intermitente, um processo conveniente, pois diminui o gasto de energia, principalmente em espécies aquáticas. Algumas espécies de tartarugas aquáticas também são capazes de realizar trocas gasosas com a água, usando a pele, o epitélio bucofaríngeo e/ou as bolsas cloacais como superfície de troca gasosa. *Phrynops geoffroanus* possui taxas mais baixas de ventilação e consumo de oxigênio no ar quando comparado a outras tartarugas, sugerindo uma estratégia de troca bimodal de gases nessa espécie. Este trabalho, portanto, teve como objetivo entender os mecanismos de troca gasosa em *Phrynops geoffroanus*, testando a hipótese de que a espécie possui tecidos extrapulmonares capazes de absorver oxigênio do ambiente aquático. Para responder a essa questão, optou-se por uma abordagem integrativa, investigando a hipótese de trabalho utilizando diferentes métodos, considerando aspectos comportamentais, morfológicos e fisiológicos. Além disso, o primeiro capítulo desta tese apresenta a proposta de um protocolo anestésico para uso em experimentos fisiológicos. A combinação de cetamina (40mg.kg⁻¹) e midazolam (2mg.kg⁻¹) fornece uma combinação anestésica eficaz, permitindo procedimentos cirúrgicos de curto prazo em *P. geoffroanus*. Na abordagem comportamental, observamos que *P. geoffroanus* foi capaz de passar longos períodos submersos e que na maioria das vezes os animais permaneceram em repouso. As análises morfológicas do tegumento, da cavidade bucofaríngea, das bolsas cloacais e dos pulmões descartaram a possibilidade de ocorrência de trocas gasosas aquáticas na pele e na boca. Os achados morfométricos mostraram que a densidade de volume padronizada por massa e a área da superfície respiratória eram significativamente maiores nos pulmões do que nas bolsas cloacais. Experimentos fisiológicos confirmaram que *P. geoffroanus* não foi capaz de absorver oxigênio através da cavidade bucofaringeal e bolsas cloacais, mesmo sob condições de hiperóxia aquática. Conclui-se, portanto, a partir da presente data que *P. geoffroanus* não realiza trocas gasosas extrapulmonares em proporções adequadas para a manutenção das necessidades metabólicas básicas da espécie, uma vez que as diferentes abordagens aqui empregadas, comportamentais, morfológicas e fisiológicas, não forneceram nenhum suporte para uma estratégia de troca bimodal de gases nesta espécie.

Palavras-chave: Fisiologia; Respiração; Respiração extrapulmonar; Protocolo anestésico;

Comportamento subaquático; Morfologia; Estereologia; Gases sanguíneos; Quelônios.

ABSTRACT

CORDEIRO, Tábata Elise Ferreira. **Behavioral and morpho-physiological aspects of gas exchange in *Phrynops geoffroanus* (Wagler, 1830) (Testudines: Chelidae)**. 2019. XX f.

Thesis (Doctorate degree) – School of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Testudines perform intermittent pulmonary ventilation, a convenient process since it reduces energy expenditure, especially in aquatic species. Some species of aquatic turtles are also able to perform gas exchange with water, using the skin, buccopharyngeal epithelium and/or the cloacal bursae as gas exchange surfaces. *Phrynops geoffroanus* possesses lower rates of ventilation and oxygen consumption in air when compared to other turtles, suggesting a bimodal gas exchange strategy in this species. This work, therefore, aimed to understand the mechanisms of gas exchange in *Phrynops geoffroanus*, testing the hypothesis that the species possesses extrapulmonary tissues capable of absorbing oxygen from the aquatic environment. To answer this question, an integrative approach was chosen, investigating the working hypothesis using different methods, considering behavioral, morphological and physiological aspects. Additionally, the first chapter of this thesis presents the proposal of an anesthetic protocol for use in physiological experiments. The combination of ketamine (40mg.kg⁻¹) and midazolam (2 mg.kg⁻¹) proved to be an effective anesthetic combination allowing short-term surgical procedures in *P. geoffroanus*. Within the behavioral approach, we observed that *P. geoffroanus* was able to spend long periods submerged and that most of the time the animals remained at rest. The morphological analyzes of the integument, the buccopharyngeal cavity, the cloacal bursae and the lungs ruled out the possibility of aquatic gas exchange occurring through skin and mouth. Morphometric analyzes showed that mass-standardized volume density and respiratory surface area were significantly greater in the lungs than in the cloacal bursae. Physiological experiments confirmed that *P. geoffroanus* was not able to absorb oxygen through the buccopharyngeal cavity and cloacal bursae, even under conditions of aquatic hyperoxia. It is therefore concluded from the present data that *P. geoffroanus* does not perform extrapulmonary gas exchange in proportions adequate for the maintenance of the basic metabolic needs of the species, as the different approaches employed here, behavioral, morphological and physiological, did not provide any support for a bimodal gas exchange strategy in this species.

Keywords: Physiology; Respiration; Extra-pulmonary breathing; Anesthetic protocol; Underwater behavior; Morphology; Stereology; Blood gases; Chelonians.

Lista de Figuras

Figura 2.1 Escore total (0 a 7) dos efeitos das diferentes combinações anestésicas sobre os parâmetros físicos de <i>P. geoffroanus</i>	44
Figura 2.2 Escore do efeito das diferentes combinações anestésicas sobre o tônus muscular (0 a 3) de <i>P. geoffroanus</i>	45
Figura 2.3 Efeitos das combinações anestésicas sobre a frequência cardíaca de <i>P. geoffroanus</i>	45
Figura 3.1 Esquema ilustrando o aquário (medidas) onde os animais eram filmados, com a localização das plataformas (medidas) e a altura do nível de água	59
Figura 3.2 Frequência relativa (%) de ocorrência das categorias comportamentais registradas em <i>P. geoffroanus</i>	63
Figura 3.3 Tempos de atividade (A) e submerso (B) ao longo tempo (0' – 10', 30' – 40', 60' – 70', 110' – 120').....	69
Figura 3.4 Frequência relativa (min-1) do padrão comportamental “Tocar a cabeça” de <i>P. geoffroanus</i>	70
Figura 4.1 Aplicação do Método de Cavalieri no pulmão de <i>P. geoffroanus</i>	86
Figura 4.2 Pele de <i>P. geoffroanus</i>	91
Figura 4.3 Cavidade bucofaringeal de <i>P. geoffroanus</i>	93
Figura 4.4 Visão ventral dos pulmões de <i>P. geoffroanus</i>	94
Figura 4.5 Pulmões de <i>P. geoffroanus</i>	95
Figura 4.6 Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de pulmão de <i>P.</i>	96
Figura 4.7 Bolsas cloacais de <i>P. geoffroanus</i>	98
Figura 5.1 Pressão parcial arterial de oxigênio (PaO ₂) de <i>P. geoffroanus</i> quando exposto à diferentes concentrações de oxigênio aéreo e aquático.	117
Figura 5.2 Efeito das exposições de <i>P. geoffroanus</i> a diferentes P _{água} O ₂ e P _{ar} O ₂ sobre o PaO ₂ e lactato.....	121
Figura 5.3 Efeito das exposições de <i>P. geoffroanus</i> a diferentes P _{água} O ₂ e P _{ar} O ₂ sobre o pH e HCO ₃ ⁻	121

Lista de tabelas

Tabela 2.1. Efeitos das diferentes combinações de cetamina e midazolam sobre os tempos de indução, fase platô e tempo de recuperação.	43
Tabela 2.2. Efeitos das combinações anestésicas sobre o tempo de indução e recuperação dos diferentes parâmetros físicos de <i>P. geoffroanus</i> . Dados apresentados como média e desvio padrão.	46
Tabela 3.1 Etograma dos comportamentos subaquáticos observados em <i>P. geoffroanus</i>	62
Tabela 3.2 Frequência absoluta de ocorrência dos padrões comportamentais registrados em <i>P. geoffroanus</i>	63
Tabela 3.3 - Classificação dos padrões comportamentais de <i>P. geoffroanus</i> em categorias....	64
Tabela 3.5 Diferenças estatísticas para o tempo de atividade de <i>P. geoffroanus</i> , considerando as diferentes combinações de tratamentos.....	67
Tabela 3.6 Diferenças estatísticas para o tempo submerso de <i>P. geoffroanus</i> , considerando as diferentes combinações de tratamentos. Valores $P < 0,05$ para diferenças entre misturas de gases, período de medição, intervenções do corpo e a interação entre os fatores.	68
Tabela 4.1 Identificação, massa corpórea e medidas morfométricas dos pulmões e bolsas cloacais de três indivíduos de <i>P. geoffroanus</i>	99
Tabela 5.1 Valores dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos de <i>P. geoffroanus</i> expostos a diferentes concentrações oxigênio no meio aéreo e aquático.....	119

Lista de abreviaturas e siglas

$\dot{V}_E$	Ventilação
$\dot{V}CO_2$	Eliminação de dióxido de carbono
$\dot{V}O_2$	Consumo de oxigênio
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
ap	Ápice
a/p	Área relativa a um ponto
ATP	Trifosfato de adenosina
bpm	Batimentos por minuto
Ca^{2+}	Íon Cálcio
C_{BCdir}	Comprimento da bolsa cloacal direita
C_{BCesq}	Comprimento da bolsa cloacal esquerda
cap	Capilar sanguíneo
Cc	Células colunares ciliadas
cil	Corpos de inclusão lamelar
cl	Cólo
Cl^-	Íon Cloreto
cm	Centímetro
cm	Células ricas em mitocrôndria
cmH_2O	Centímetro de água
cm^3	Centímetro cúbico
$cm^3.kg^{-1}$	Centímetro cúbico por quilograma
CO_2	Dióxido de carbono
cp	Corpo
cs	Camada serosa
Csm	Células secretoras de mucosa
C_{SR}	Comprimento do sistema respiratório
Der	Derme
E	Epidural
Epi	Epitélio de revestimento

epi*	Epiderme queratinizada
Eri	Eritrócito
fv	Favéolo
g	Grama
g/dL	Grama/decilitro
GEFAU/SP	Gestão Ambiental da Fauna de São Paulo
H ₂ O	Água
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
Hct	Hematócrito
HE	Hematoxilina-eosina
HiCN	Cianeto de hemoglobina
IC	Intracloacal
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
K ⁺	Íon potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
L.h ⁻¹	Litro por hora
Lb	Lâmina basal
M _{BC}	Massa das bolsas cloacais
MC	Massa Corpórea
m/d	Metros por dia
mEq	Miliequivalente
Mg	Miligrama
mg/kg ou mg.kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
Mg ⁺	Íon magnésio
min ⁻¹	Por minuto
mL	Mililitro
ml.min ⁻¹	Milímetro por minuto
mL.min ⁻¹ .kg ⁻¹	Milímetro por minuto por quilograma
mLO ₂ kg ⁻¹ .min ⁻¹	Milímetro de oxigênio por quilograma por minuto

mM	Milimolar
mm ²	Milímetro ao quadrado
mmHg	Milímetro de mercúrio
mmol	Milimol
M _{SR}	Massa dos pulmões
N	Número amostral
N ₂	Nitrogênio
Na ⁺	Íon sódio
NA	Não se aplica
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nm	Nanometro
O ₂	Oxigênio
P	Probabilidade de significância
P _{água} O ₂	Pressão parcial de oxigênio na água
pI	Pneumócito do tipo I
pII	Pneumócito do tipo II
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
PE 50	Tubo de polietileno tamanho 50
PG	<i>Phrynops geoffroanus</i>
pH	Potencial hidrogênico
Pi	Número de pontos sobre o parênquima e lúmen
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
Sm	Submucosa
SP	São Paulo
S par	Área superficial do parênquima respiratório
S par N-resp	Área superficial do parênquima não respiratório
SC	Subcutâneo
SPH	Septo pós-hepático
SPP	Septo pós-pulmonar
T	Distância entre os cortes
Tb	Trabécula
TEFC	Tábata Elise Ferreira Cordeiro

T_m	Túnica muscular
TOP	Temperatura ótima preferida
vmp	Vesículas micropinocitóticas
vp	Vesículas de pinocitose
V_{par}	Volume do parênquima
V_{par}/MC	Volume do parênquima padronizado pela massa
V_{par}/V_{ref}	Proporção do volume do parênquima por volume de referência
V_{Ref}	Volume de referência
V_{ref}/MC	Volume de referência padronizado pela massa
V_{RefBC}	Volume de referência das bolsas cloacais
V_{RefP}	Volume de referência dos pulmões
V_s	Vaso sanguíneo
V_v par ar	Densidade de volume do parênquima (ar)
V_v par tecido	Densidade de volume do parênquima (tecido)
V_v par vaso	Densidade de volume do parênquima (vaso sanguíneo)
za	Zônula de adesão
zo	Zônula de oclusão

Sumário

FOLHA DE APROVAÇÃO	4
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	10
ABSTRACT	12
Lista de Figuras	14
Lista de tabelas	15
Lista de abreviaturas e siglas	16
1. CAPÍTULO 1 - TROCAS GASOSAS EM QUELÔNIOS	24
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	24
1.1.1 Respiração nos Répteis	24
1.1.2 O estudo das trocas gasosas em quelônios	27
1.1.3 <i>Phrynops geoffroanus</i> : história natural e fisiologia da respiração	28
1.1.4 Respiração bimodal em quelônios	29
1.1.5 Justificativa e objetivos do trabalho	31
2. CAPÍTULO 2 - PROTOCOLO ANESTÉSICO PARA <i>PHRYNOPS GEOFFROANUS</i> VISANDO PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS EM FISIOLOGIA	33
2.1 RESUMO	33
2.2 ABSTRACT	34
2.3 INTRODUÇÃO	35
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.4.1 Animais	40
2.4.2 Protocolo experimental	40
2.4.3 Análise dos dados	42
2.4.4 Análise estatística	42
2.5 RESULTADOS	43
2.6 DISCUSSÃO	47
3. CAPÍTULO 3 - COMPORTAMENTO SUBAQUÁTICO DE <i>PHRYNOPS</i> <i>GEOFFROANUS</i> FRENTE À RESPOSTAS FISIOLÓGICAS	52
3.1 RESUMO	52
3.2 ABSTRACT	53
3.3 INTRODUÇÃO	54
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS	57

3.4.1	Animais	57
3.4.2	Filmagens	57
3.4.3	Coleta e análise dos dados	59
3.4.4	Análises estatísticas	60
3.5	RESULTADOS	61
3.5.1	Etograma e aspectos gerais do comportamento subaquático.....	61
3.5.2	Respostas comportamentais a diferentes situações de disponibilidade de oxigênio	64
3.5.3	Tempo de atividade	65
3.5.4	Tempo submerso	65
3.6	DISCUSSÃO	71
4.	CAPÍTULO 4 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DE TECIDOS COM POTENCIAL DE TROCAS GASOSAS EM <i>PHRYNOPS GEOFFROANUS</i>	79
4.1	RESUMO	79
4.2	ABSTRACT.....	80
4.3	INTRODUÇÃO	81
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.4.1	Animais	85
4.4.2	Análises morfológicas	87
4.4.3	Processamento das amostras	87
4.4.4	Análises qualitativas.....	89
4.4.5	Análises quantitativas – Estereologia.....	89
4.4.6	Análise estatística.....	89
4.5	RESULTADOS	90
4.5.1	Análise qualitativa.....	90
4.6	Discussão	100
4.6.1	Análise qualitativa	100
4.6.2	Análise quantitativa.....	104
4.6.3	Implicações morfofuncionais	106
5.	CAPÍTULO 5 - TROCAS GASOSAS POR VIAS EXTRAPULMONARES EM <i>PHRYNOPS GEOFFROANUS</i>	108
5.1	RESUMO	108
5.2	ABSTRACT.....	109
5.3	INTRODUÇÃO	110
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS	112
5.4.1	Animais	112

5.4.2	Preparação dos animais	112
5.4.3	Protocolo experimental	113
5.4.4	Análises sanguíneas.....	114
5.4.5	Análises estatísticas.....	116
5.5	RESULTADOS	118
5.6	DISCUSSÃO	122
5.6.1	Crítica aos métodos	122
5.6.2	Dados fisiológicos	123
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
7.	REFERÊNCIAS	132
APÊNDICES.....		168
APÊNDICE A - Levantamento bibliográfico dos fármacos testados em diferentes espécies de Testudines.		169
APÊNDICE B - Tabela usada para a avaliação física e monitoramento dos parâmetros fisiológicos de <i>P. geoffroanus</i> ao longo de tempo.		171
APÊNDICE C - Escores totais dos espécimes de <i>P. geoffroanus</i> calculados a partir da pontuação atribuída durante a avaliação física, sob efeito de diferentes combinações anestésicas.		172
.....		172
APÊNDICE D - Volume de referência (V_{ref}), volume do parênquima (V_{par}) das diferentes regiões das bolsas cloacais de <i>P. geoffroanus</i> e os seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea (V_{ref}/MC e V_{par}/MC), e a razão entre o volume do parênquima e o volume de referência (V_{par}/V_{ref}),.....		173
APÊNDICE E - Volume de referência (V_{ref}), volume do parênquima (V_{par}) das diferentes regiões dos pulmões de <i>P. geoffroanus</i> e os seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea (V_{ref}/MC e V_{par}/MC), e a razão entre o volume do parênquima e o volume de referência (V_{par}/V_{ref}),.....		174
APÊNDICE F - Volume de referência (V_{ref}), volume do parênquima (V_{par}) das bolsas cloacais e pulmões de <i>P. geoffroanus</i> e os seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea (V_{ref}/MC e V_{par}/MC), e a razão entre o volume do parênquima.....		175
APÊNDICE G - Fração de volume do lúmen (V_v par ar), parênquima total (V_v par tecido) e vasos sanguíneos (V_v par vaso) nas diferentes regiões das bolsas cloacais de <i>P. geoffroanus</i> . .		176
APÊNDICE H - Fração de volume do lúmen (V_v par ar), parênquima total (V_v par tecido) e vasos sanguíneos (V_v par vaso) nas diferentes regiões dos pulmões de <i>P. geoffroanus</i>		177
APÊNDICE I - Fração de volume do lúmen (V_v par ar), parênquima total (V_v par tecido) e vasos sanguíneos (V_v par vaso) dos pulmões e das bolsas cloacais de <i>P. geoffroanus</i>		178
APÊNDICE J - Área superficial do parênquima respiratório (S_{par}) e não respiratório ($S_{par\ N-resp}$), seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea e a proporção de superfície respiratória das diferentes regiões das bolsas cloacais de <i>P. geoffroanus</i>		179

APÊNDICE K - Área superficial do parênquima respiratório (S par) e não respiratório (S par N-resp), seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea e a proporção de superfície respiratória das diferentes regiões dos pulmões de <i>P. geoffroanus</i>	180
APÊNDICE L - Área superficial do parênquima respiratório (S par) e não respiratório (S par N-resp), seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea e a proporção de superfície respiratória das dos pulmões e bolsas cloacais de <i>P. geoffroanus</i>	181
ANEXOS.....	182
ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto	183
ANEXO B – Autorização de instalação para empreendimentos de cativeiro	184
ANEXO C – Autorização de uso e manejo para empreendimentos de cativeiro	186
ANEXO D – SIGAM – Extrato de Empreendimento de Fauna.....	187

1. CAPÍTULO 1 - TROCAS GASOSAS EM QUELÔNIOS

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 Respiração nos Répteis

A ordem Reptilia é caracterizada por uma grande variedade nas formas corporais. Essa variedade morfológica se manifesta na multiplicidade de nichos ecológicos, hábitos alimentares, comportamentos e ajustes fisiológicos que permeiam esses animais na natureza. Esses são alguns fatores que podem justificar a alta diversidade das estruturas pulmonares em vertebrados, notavelmente os pulmões do tipo unicameral, paucicameral e multicameral (PERRY, 1998). Lambertz e colaboradores (2010) hipotetizaram que os pulmões unicamerais surgiram a partir de pulmões multicamerais, que perderam a complexidade das estruturas intrapulmonares. Essa hipótese foi corroborada através de estudos embriológicos, mostrando que a estrutura multicameral dos pulmões está presente em todos os amniotas (Lambertz et al., 2015). Mesmo a estrutura básica do sistema respiratório dos répteis observada em *Sphenodon*, com pulmões pareados, unicamerais com o lúmen central uniforme e sem divisões intrapulmonares (PERRY, 1998; BRAINERD, 1999), foi identificada uma fileira de septos homologos aos septos intrapulmonares observados em répteis que apresentam pulmões com divisões internas (Lambertz et al., 2015).

Estruturalmente, os pulmões dos répteis são classificados pelo número de divisões intrapulmonares (septos) que formam as câmaras internas, pela distribuição do parênquima pulmonar e pelos tipos de parênquima encontrados ao longo dos pulmões (PERRY, 1998). Os pulmões podem ser unicamerais, transicionais (paucicamerais) e multicamerais. Essas características evoluíram ao longo da história evolutiva dos vertebrados e se diversificaram entre os répteis, contribuindo para o aumento da área superficial nos pulmões para as trocas gasosas e estão relacionadas, consequentemente, ao aumento do metabolismo aeróbico em alguns táxons desse grupo.

Os pulmões unicamerais não possuem divisões internas, o epitélio respiratório fica alocado somente na superfície interna da parede pulmonar, e estão presentes na maioria dos lagartos e serpentes (Duncker, 1978a, 1981; Duncker, 2004). Os pulmões transicionais ou paucicamerais são uma condição morfollogicamente intermediária, com ganho de divisões internas dos pulmões, (PERRY, 1998; DUNCKER, 2004), como o descrito em *Iguana iguana*. Os pulmões multicamerais são subdividido em câmaras, que aumentam a área superficial de trocas gasosas, permitindo que os animais com esse tipo de pulmão respondam com maior eficiência à demanda energética (DUNCKER, 2004). Os pulmões de tartarugas marinhas, como em *Caretta caretta*, são o exemplo de melhor desenvolvimento morfológico pulmonar entre os

répteis, possuindo um grande número de câmaras e parênquima muito denso de distribuição homogênea, garantindo altas taxas de trocas gasosas (DUNCKER, 1981; LUTCAVAGE *et al.* 1989).

A distribuição do parênquima pulmonar pode ser homogênea, quando é observada uma distribuição uniforme de tecido respiratório ao longo de todo pulmão, ou heterogênea, quando essa distribuição se modifica ao longo dos eixos crânio-caudal e/ou médio-lateral dos pulmões, onde a região crani-medial apresenta maior densidade de tecido pulmonar enquanto que a região caudo-lateral pode ser caracterizada por ter menor quantidade nichos (a unidade básica dos pulmões dos répteis) e ter uma forma *like-sac*, uma região especializada para o armazenamento do ar (PERRY, 1998; POWELL & HOPKINS, 2004). Esse parênquima pode ser constituído por camadas trabeculares, ediculares, e faveolares, seguindo um aumento da área superficial (PERRY, 1998).

Também há a presença de mesos e septos, estruturas que auxiliam na estabilização intracelômica dos pulmões (KLEIN *ET AL.*, 2000; LAMBERTZ *ET AL.*, 2010, LYSON *ET AL.*, 2014). O meso é definido como um ligamento que conecta um órgão com a parede do corpo ou com outro órgão, enquanto que o septo separa um ou mais órgãos das demais vísceras (KLEIN *et al.*, 2000). Essas membranas também apresentam ampla variação entre os diversos grupos de répteis. Os mesopneumônios dorsal e ventral conectam os pulmões e podem ser ausentes, parcialmente presentes ou totalmente presentes entre os répteis. Além disso, um septo pode separar os pulmões e fígado das demais vísceras (septo pós-hepático ou SPH), como encontrado em *Salvator (Tupinambis) merianae* e outros Teioidea (KLEIN *et al.*, 2000; 2003b), ou ainda isolar os pulmões dos demais órgãos (septo pós-pulmonar ou SPP), o que é observado em todos os Testudines (LAMBERTZ *et al.*, 2010), Crocodylia, Chamaeleonidae, Varanoidea, além dos aves e mamíferos (DUNCKER, 1978a).

A relação entre os diferentes aspectos morfológicos irá refletir em parâmetros fisiológicos da respiração de um organismo, influenciando a sua taxa metabólica (KINNEY & WHITE, 1977; JACKSON *ET AL.*, 1991; WANG & WARBURTON, 1995; SKOVGAARD & WANG, 2004). O aumento da taxa metabólica em alguns grupos de amniotas, e consequentemente em alguns grupos de répteis, é uma confluência entre os caracteres morfológicos e as demandas funcionais dos organismos (LIEM, 1988). O sistema respiratório é um ótimo exemplo desse tipo de relação. Liem (1988) considerou que a eficiência do sistema respiratório depende de propriedades estruturais e funcionais, as quais não podem ser dissociadas.

Os répteis ventilam os pulmões através de uma bomba de aspiração (BRAINERD, 1999). Esse tipo de ventilação evoluiu entre os anamniotas, com o surgimento do músculo *transversus abdominis*, que auxilia no processo de expiração (BRAINERD & OWERKOWICZ, 2006). A expiração ativa foi o primeiro passo na evolução da bomba de aspiração, com a utilização dos músculos axiais expiratórios complementada pela bomba bucal inspiratória (BRAINERD & OWERKOWICZ, 2006). Em amniotas, com exceção dos quelônios, os movimentos de inspiração são efetuados pelos músculos intercostais. A respiração realizada por bomba de aspiração ocorre com a expansão da região anterior da cavidade pleuroperitoneal, que gera uma pressão negativa, direcionando o ar para dentro dos pulmões (BRAINERD, 1999; DUNCKER, 2004). Inicialmente esse movimento era gerado pela aspiração costal com o movimento de rotação das costelas. Secundariamente, outros músculos evoluíram para auxiliar na inspiração, como os análogos músculos diafragmáticos de Mammalia e de Crocodylia. Os músculos *transversus abdominis* e *retrahens costarum* são os responsáveis pelo processo de exalação do ar. (LIEM, 1988; BRAINERD, 1999). Nos quelônios, os músculos responsáveis pelos processos de inspiração são os *obliquus abdominis* e *serratus*, que se estendem a partir dos membros, enquanto que os músculos responsáveis pela expiração são *transversus thoracis* e *transversus abdominis* (LYSON *et al.*, 2014).

Nos Répteis esses movimentos musculares são realizados periodicamente. Répteis realizam respiração intermitente (WANG *et al.*, 1988). A ventilação é realizada em episódios que se iniciam com a expiração e terminam com uma inspiração (MILSOM, 1991; DRUZISKY & BRAINERD, 2001). Cada episódio ventilatório pode ser composto por um único evento ventilatório ou por muitos eventos ventilatórios (expiração – inspiração), dependendo das condições ambientais às quais o animal é submetido (MILSOM & JOHANSEN, 1975; GANS & CLARCK, 1976; ANDRADE & ABE, 1999; KLEIN *et al.*, 2002; SKOVGAARD & WANG, 2004; MACIEL *et al.*, 2011). A respiração intermitente é conveniente para esses animais por ser menos custosa energeticamente (GANS & CLARCK, 1976). Durante a apneia (período não-ventilatório), as trocas gasosas continuam ocorrendo no epitélio pulmonar, garantindo suprimento de oxigênio para atividades que são realizadas nesse período (LENFANT *et al.*, 1970; LANDBERG *et al.*, 2009). O padrão irregular da frequência respiratória, com intervalos de apneia mais longos, é típico de espécies de hábito de vida aquático ou semi-aquático e pode persistir mesmo no ambiente terrestre (BURGGREN, 1975; GLASS *et al.*, 1978).

1.1.2 O estudo das trocas gasosas em quelônios

Dentre os répteis, o clado Testudines é considerado um grupo pertinente para o estudo da respiração, visto que os animais pertencentes a este grupo possuem um *Bauplan* singular que influencia na fisiologia das trocas gasosas. Os quelônios são animais de fácil reconhecimento devido à presença da carapaça, na região dorsal, e do plastrão, na região ventral. A coluna vertebral e as costelas são fusionadas à carapaça, impedindo a participação dessas estruturas no processo de ventilação. Essas estruturas rígidas vão limitar a expansão da cavidade abdominal (BRAINERD, 1999), o que poderia diminuir a eficiência das trocas gasosas nesse grupo. Para suprir essas limitações, grupos musculares que evoluíram para a participação da respiração costal em outros amniotas não são mais necessários (GANS & HUGHES, 1967; GAUNT & GANS, 1969). Por último, a cabeça, assim como os membros anteriores e posteriores tem a capacidade de se retrair para dentro da carapaça. Membros e cinturas também podem ajudar na entrada e saída de ar dos pulmões, porém não existe um padrão nessa função entre os quelônios (MCCUTCHEON, 1943; WALKER, 1963; GANS E HUGHES, 1967; GAUNT E GANS, 1969; JACKSON E PRANGE, 1979; LANDBERD *ET AL.*, 2003; 2009). Esse movimento interfere no volume pulmonar do animal, reduzindo o volume de ar que entra nos pulmões a cada inspiração (CORDEIRO, 2014; BAÚ 2016).

Testudines apresentam uma organização básica com pulmões multicameriais, compartimentalizados internamente por um brônquio intrapulmonar (PERRY, 1998). Outra característica encontrada nos Testudines é a presença de um septo pós-pulmonar localizado ventralmente em relação aos pulmões (LAMBERTZ *et al.*, 2010). O septo pós-pulmonar surge ainda durante o desenvolvimento embrionário e separa a cavidade pleural da cavidade peritoneal (PERRY, 1998). Dessa forma, os pulmões estão restritos à cavidade pleural, presos dorsalmente pelos mesopneumônios dorsais. A partir desse plano básico, houve diversificação morfológica dos pulmões dentro do grupo, incluindo aumento ou diminuição do número de câmaras intrapulmonares, o comprimento e localização do brônquio intrapulmonar nas diferentes famílias descritas e o grau de desenvolvimento do septo pós-pulmonar e do mesopneumônio dorsal. (PERRY, 1998; LAMBERTZ *et al.*, 2010).

Testudines há muito tempo é considerado um grupo monofilético (GAFFNEY & MEYLAN, 1984) e trabalhos recentes utilizando caracteres morfológicos e moleculares corroboram a tese de que os animais pertencentes a esse clado possuem uma origem única (GAFFNEY & MEYLAN, 1988; SHAFFER ET AL., 1997; WU ET AL., 1999; CERVELLI ET AL., 2003; FUJITA ET AL., 2004; KRENZ ET AL., 2005; PARHAM ET AL., 2006; VARGAS-

RAMIREZ *ET AL.*, 2008; GUILLON *et al.*, 2012), que remete ao período Triássico, há aproximadamente 220 milhões de anos (LI *et al.*, 2008).

A ordem Testudines, hoje representada por aproximadamente 300 espécies divididas em 13 famílias (BISBY *et al.*, 2012; VAN DIJK *et al.*, 2014), sendo que oito dessas famílias ocorrem na América do Sul (Dermochelyidae, Cheloniidae, Chelydridae, Emydidae, Kinosternidae, Testudinidae, Podocnemididae e Chelidae) (Friol, 2014). A família Chelidae ocupa territórios que abrangem a Austrália, Nova Guiné e América do Sul, onde são representados pelos gêneros *Acanthochelys*, *Chelus*, *Hydromedusa*, *Mesoclemmys*, *Phrynops*, *Platemys* e *Rhinemys* (VAN DIJK *et al.*, 2014). Na América do Sul a distribuição geográfica das espécies que compõem esses gêneros vai desde o norte da Colômbia até a Argentina (PRITCHARD, 1979; SEDDON, 1997; POUGH *et al.*, 2003). Todos os gêneros de Chelidae ocorrem no Brasil e das 23 espécies identificadas, 19 habitam biomas brasileiros (SOUZA, 2004).

A fauna brasileira não é contemplada nos estudos sobre o sistema respiratório. A maioria dos trabalhos que consideram quelônios da fauna brasileira abordam assuntos como conservação (MARCOVALDI & MARCOVALDI, 1999; BUGONI *et al.*, 2001; THOMÉ *et al.*, 2007), biologia reprodutiva (ALHO & PÁDUA, 1982; BAPTISTOTTE *et al.*, 2003), nidificação (VOGT & BULL, 1982; SOUZA & VOGT, 1982; MARCOVALDI *et al.*, 2007), aspectos alimentares (VOGT, 1981), estruturas populacionais (FACHÍN-TERÁN & VOGT, 2004; BJORNDALE *et al.*, 2006), hipóteses de dispersão e forrageio (NARO-MACIEL *et al.*, 2007) e migração (MORTIMER, 1987).

1.1.3 *Phrynops geoffroanus*: história natural e fisiologia da respiração

A espécie investigada nesta tese, *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812), pertence ao gênero *Phrynops*, são animais conhecidos popularmente como cágados de pescoço longo ou cágado de barbicha. A espécie pode ser facilmente distinguida pela forma do casco e da cabeça mais achatada, e pelas linhas brancas e esverdeadas ao longo dos lados da cabeça (SCHNEIDER *et al.*, 2010). Esses animais vivem a maior parte do tempo em ambientes de água doce (ORENSTEIN, 2012). Os trabalhos encontrados na literatura que contemplam o gênero *Phrynops* abordam principalmente assuntos sobre taxonomia (RODHIN & MITTERMEIER, 1983; Bickham *et al.*, 2007; Friol, 2014), relações filogenéticas (SEDDON *ET AL.*, 1997; GEORGES *et al.*, 1999; FUJITA *et al.*, 2004; WINKLER, 2006; LOURENÇO *et al.*, 2012; FRIOL, 2014), distribuição geográfica (RUSSELL *et al.*, 1978; BRANDÃO *et al.*, 2002; SOUZA, 2005), importância econômica e influência antrópica (BRITES &

RANTIN, 2004; FACHÍN-TERÁN *et al.*, 2001a; PIN, 2009; PIÑA *et al.*, 2009), aspectos alimentares (MOLINA, 1990; FACHÍN-TERÁN & VOGT, 1995; MOLINA *et al.*, 1998; SOUZA, 2004); conservação (BUGONI *et al.*, 2001; THOMÉ *et al.*, 2007) e biologia reprodutiva (ALHO & PÁDUA, 1982; BUJES, 1998; SOUZA & ABE, 2001; BAPTISTOTTE *et al.*, 2003; TORTATO, 2007; SILVA & VILELA, 2008; FERREIRA JR. *et al.*, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2011). A fisiologia da respiração desse táxon tem sido negligenciada e existe somente um trabalho na aérea (CORDEIRO; ABE & KLEIN, 2016).

A espécie *Phrynops geoffroanus* representa possivelmente um complexo de espécies (MITTERMEIER *et al.* 1980; RHODIN & MITTERMEIER, 1983) e tem ampla distribuição no Brasil, ocorrendo desde a Amazônia colombiana até o sul do Brasil e norte da Argentina. Esses animais são generalistas, sendo encontrados em rios e córregos, com diferentes velocidades de correntes, lagos, e são vistos habitando canais e rios em perímetro urbano (PRITCHARD & TREBBAU 1984, ERNST & BARBOUR 1989; SOUZA & ABE 2000, 2001; SOUZA *et al.* 2008; BRITES & RANTIN 2004; VAN DIJK *et al.*, 2014).

Phrynops geoffroanus é um exemplo da discrepância das estratégias utilizadas para a realização das trocas gasosas. Em um trabalho realizado com o objetivo de se medir o custo metabólico da respiração da espécie *Phrynops geoffroanus*, observou-se que os indivíduos dessa espécie apresentaram valores de ventilação e consumo de oxigênio atmosférico muito mais baixos ($1,7 \pm 0,6 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $0,07 \pm 0,03 \text{ mlO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente) (CORDEIRO, 2014; CORDEIRO; ABE & KLEIN, 2016), quando comparados aos de outros quelônios já investigados (JACKSON, 1985; GLASS *et al.*, 1985; Vitalis & Milsom, 1986a,b; BAGATTO & HENRY, 1999). Esses valores podem ser considerados um indício do uso de alguma via alternativa para as trocas gasosas, por meio de estruturas extrapulmonares (BELKIN, 1968; GAGE & GAGE, 1886; LEGLER & WINOKUR, 1983).

1.1.4 Respiração bimodal em quelônios

A investigação acerca da respiração bimodal em quelônios remete ao século XIX e se estendeu ao longo do século XX, com abordagens de estudos fisiológicos e morfológicos. A respiração bimodal pode ser definida como a habilidade de realizar trocas gasosas entre o animal e os meios aéreo e aquático (BELKIN, 1968; JACKSON *et al.*, 1976; GATTEN, 1980, 1984; STONE *et al.*, 1992a). Gage e Gage (1886) demonstraram a ocorrência da respiração aquática para duas espécies de quelônios; *Apalone muticus* e *A. spinifera spinifera*.

Para que um epitélio tenha função de transporte de gases, algumas propriedades devem ser

observadas: grande área superficial de contato com o meio externo, superfície úmida, pequena distância de difusão e rede de capilares (PIIPER & SCHEID, 1982). Algumas estruturas extrapulmonares em Testudines detêm essas características e, por essa razão, poderiam realizar trocas gasosas. Já foram observados que as trocas gasosas podem ocorrer através da integumento, do epitélio bucofaringeal, do epitélio da cloaca e/ou pela bolsa cloacal (GAGE & GAGE, 1886; WANG *et al.*, 1989; STONE *et al.*, 1992a; KING & HEATWOLE, 1994; GORDOS & FRANKLIN, 2002; JACKSON *et al.*, 2004).

Em *Elseya latisternum* foram encontrados tecidos altamente vascularizados na região dos membros traseiros, além de ter sido constatada a presença de um par de bolsas cloacais (KING & HEATWOLE, 1994). Belkin (1968) constatou que *Sternotherus minor* poderia permanecer até 5000 horas submerso à 22°C, com água saturada, absorvendo oxigênio da água. A absorção de O₂ e eliminação de CO₂ por processo passivo, por meio da pele, também já foi observada em *Sternotherus odoratus* (ROOT, 1949), *S. minor* (BELKIN, 1968) e *Trionyx triunguis* (GIRGIS, 1961). A bomba bucal e a bomba cloacal observado em inúmeros quelônios são uma forma ativa de fornecer O₂ às superfícies que vão realizar as trocas gasosas. Espécies como *Chelydra serpentina* (BAGATTO & HENRY, 1999), *Sternotherus minor* (BELKIN, 1968), *Trachemys scripta* (BELKIN, 1968), *Platysternon megacephalum* (DRUZISKY & BRAINERD, 2001), *Trionyx sinensis* (WANG *et al.*, 1989), *Apolone spinifera aspera* (DUNSON, 1960) e *Elseya latisternum* (KING & HEATWOLE, 1994b) realizam a bomba bucal durante a submersão, enquanto que na espécie *Rheodytes leukops* (LEGLER & CANN, 1980) foi observado a bomba cloacal.

A bolsa cloacal é composta por um par de apêndices da cloaca que podem ser altamente vascularizadas e usadas para as trocas gasosas no ambiente aquático, através da difusão ativa entre o animal e o meio aquático (PETERS, 1964; LEGLER, 1993b; KING & HEATWOLE, 1994). A presença dessa estrutura foi registrada pela primeira vez na literatura por Perrault, em 1733, em *Testudo elegans* (KING & HEATWOLE, 1994). Após essa publicação, diversos outros trabalhos apontaram a presença ou ausência desses órgãos (BOJANUS, 1821), e ainda a descrição dos mesmos em diversas espécies (NOBLE & NOBLE, 1940; ASHLEY, 1955; NIELSEN, 1983; MALLMAN-FRANCO, 2002).

Smith e James (1958) resumiram a ocorrência da bolsa cloacal em quelônios, avaliando a importância taxonômica dessa estrutura. Nesse trabalho, os autores atribuíram a presença das bolsas cloacais para as famílias Pelomedusidae, Emydidae, Chelydridae, Platysternidae e Chelidae, a qual pertence o gênero *Phrynops*.

1.1.5 Justificativa e objetivos do trabalho

As diferenças nos ajustes fisiológicos encontrados em *Phrynops geoffroanus*, em relação às espécies já apresentadas na literatura foram evidentes, mesmo quando estes foram expostos as condições em que a ventilação era estimulada (hipóxia e hipercarbica) (CORDEIRO *et al.*, 2016). Esses dados justificam a importância de se investigar quais as vias são utilizadas por esses animais para a absorção de oxigênio e eliminação de gás carbônico, além das trocas gasosas já conhecidas através do epitélio pulmonar. Esses órgãos ou tecidos explicariam o fato de *P. geoffroanus* apresentar baixos níveis de $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$ e $\dot{V}_E$. A demanda de oxigênio requerida pelo animal pode estar sendo complementada por esses meios alternativos, através da água. Novas investigações devem priorizar a dissecação dessa espécie, bem como medições de trocas gasosas aquáticas para corroborar a sugestão das trocas gasosas estarem sendo realizados por meios de vias aéreas e aquáticas.

Este trabalho se propôs a investigar se *Phrynops geoffroanus* possui outras estruturas (e se sim, quais) habilitadas para realizar as trocas gasosas com o meio em que esteja inserido. O mesmo é o primeiro trabalho que investigará aspectos morfofisiológicos das trocas gasosas por vias pulmonares e extrapulmonares em espécies da família Chelidae pertencentes à fauna brasileira.

Para responder a pergunta principal desta tese, escolheu-se por uma abordagem integrativa, abrangendo diferentes áreas da biologia. Kramer (1987) afirma que a respiração é um processo multifacetado, sendo necessário o estudo a partir de diferentes abordagens. A investigação das trocas gasosas em quelônios sob os pontos de vista comportamentais, morfológicos e fisiológicos são estratégicos para se entender a demanda metabólica necessária para a manutenção das atividades desses animais e quais os fatores que interferem na eficiência das trocas gasosas.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar, sob a luz de diferentes abordagens metodológicas, se *Phrynops geoffroanus* possui estruturas extrapulmonares capazes de realizar trocas gasosas. Esta tese foi dividida em seis capítulos, esta introdução geral, o segundo capítulo dedicado criar um protocolo anestésico para *P. geoffroanus* que possa ser usado em diferentes condições experimentais e clínicas. Esse capítulo veio a partir da demanda da necessidade de manipulação de *P. geoffroanus* para a realização de procedimentos cirúrgicos.

A partir do terceiro capítulo, os objetivos se voltaram para corroborar ou não a hipótese de que *P. geoffroanus* pode realizar respiração bimodal. A última parte da tese traz as

considerações finais, relacionando os achados discutidos nos capítulos anteriores. Os objetivos específicos desta tese foram:

1. Descrever e quantificar padrões comportamentais subaquáticos de *P. geoffroanus*, relacionando os ajustes comportamentais aos ajustes fisiológicos frente às mudanças ambientais nas concentrações de gases respiratórios na água (Capítulo 3);
2. Analisar qualitativamente e quantitativamente as estruturas que possam estar associadas com as trocas gasosas extrapulmonares de *P. geoffroanus*, estabelecendo as suas funções morfofuncionais (Capítulo 4);
3. Investigar se *P. geoffroanus* é capaz de realizar trocas gasosas com o ambiente aquático por meio da cavidade bucofaringeal ou por meio das bolsas cloacais (Capítulo 5).

2. CAPÍTULO 2 - PROTOCOLO ANESTÉSICO PARA *PHRYNOPS GEOFFROANUS* VISANDO PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS EM FISIOLOGIA

2.1 RESUMO

O uso dos fármacos em répteis durante protocolos experimentais em investigações fisiológicas geralmente está relacionado à contenção física do animal para a preparação do mesmo para o protocolo experimental, podendo envolver a inserção do animal no *setup* experimental, a canulação de algum vaso sanguíneo para coleta de sangue ou injeção de droga, inserção de cateter para coleta de material biológico ou algum tipo de sensor para medir temperatura corpórea ou/e parâmetros cardiovasculares. Dependendo da finalidade do fármaco nos experimentos de fisiologia, a escolha da droga e da dose são componentes importantes a ser considerados para induzir a sedação ou anestesia profunda dos animais a serem estudados. O objetivo deste capítulo foi criar um protocolo anestésico para *P. geoffroanus* que possa ser usado em diferentes condições experimentais e clínicas, visto a dificuldade de induzir um quadro anestésico nessa espécie, devido a baixo metabolismo associada a ela. A escolha das drogas que foram usadas nesta investigação levou em consideração aplicações de diferentes drogas anestésicas e analgésicas, para se assegurar a presença dos efeitos das drogas em *P. geoffroanus*. O protocolo anestésico testou a combinação de cetamina e do midazolam em três diferentes doses. Parâmetros físicos e a frequência cardíaca foram monitorados após a aplicação de cada protocolo anestésico. Os parâmetros físicos sugeriram que as combinações anestésicas que usaram 40 mg.kg^{-1} de cetamina foram mais vantajosas em estabelecer um plano anestésico suficiente para a realização procedimentos invasivos que não tenham tempo prolongado. O tempo de indução e recuperação foram menores para as combinações que usaram 40 mg.kg^{-1} de cetamina, porém a dose de midazolam usada na combinação 2 foi menor (2 mg.kg^{-1}), determinando então o uso da combinação 2 (cetamina 40 mg.kg^{-1} e 2 mg.kg^{-1}) como a melhor escolha alternativa para o uso em tanto na clínica quanto para estudos experimentais.

2.2 ABSTRACT

Anesthetic drugs are generally applied in reptiles during physiological investigations in order to physically contain the animal to set it up for the experimental protocol. These procedures may involve the insertion of the animal into the experimental setup, the cannulation of some blood vessel for blood collection or drug injection, catheter insertion to collect biological material or surgical implantation of a sensor to measure body temperature or/and cardiovascular parameters. Depending on the purpose of the drug in physiology experiments, the choice of drug and dose are important components to be considered to induce sedation or deep anesthesia of the animals to be studied. The objective of this chapter was to create an anesthetic protocol for *P. geoffroanus* that could be used under different experimental and clinical conditions, given the difficulty of inducing an anesthetic condition in this species due to the low metabolism associated with it. The choice of drugs that were used in this investigation took into consideration applications of different anesthetic and analgesic drugs to ensure the presence of the effects of the drugs on *P. geoffroanus*. The anesthetic protocol tested the combination of ketamine and midazolam in three different doses and physical parameters and heart rate were monitored for five hours after drug application. Physical parameters suggested that anesthetic combinations using 40 mg.kg⁻¹ ketamine were more advantageous in establishing a sufficient anesthetic plan for invasive procedures of short duration. Induction and recovery times were shorter for combinations using 40 mg.kg⁻¹ of ketamine, but the midazolam dose used in combination 2 was shorter (2 mg.kg⁻¹), thus determining the use of combination 2 (ketamine 40 mg.kg⁻¹ and midazolam 2 mg.kg⁻¹) as the best alternative choice for use in both clinical and experimental studies.

2.3 INTRODUÇÃO

O manejo anestésico de répteis, apesar de ser atualmente mais estudado do que alguns anos atrás, ainda enfrenta desafios que permeiam três pontos principais: 1) Reptília, que engloba mais de 7800 espécies, abrange um grupo de animais amplamente diverso em tamanho, forma e história filogenética, o que pode refletir na diversidade do uso de diferentes fármacos e doses para sedação/anestesia desse grupo; 2) Ainda há muitas lacunas sobre os efeitos dos diferentes fármacos nos répteis, com a ausência de estudos sistemáticos e contínuos, desconhecimento sobre farmacodinâmica e farmacocinética dessas drogas nas diferentes espécies de répteis, além de muitas dessas informações não estarem formalmente documentadas na literatura especializada (READ, 2004; GUIRRO *et al.*, 2010); 3) Aspectos morfofisiológicos dos répteis devem ser levados em consideração no momento da escolha do sedativo/anestésico a ser aplicado, devido às especializações do grupo como a ectotermia do grupo, o *shunt* cardíaco, o sistema porta renal e a respiração intermitente (BENNET, 1991; READ, 2004; SLADKY; MANS, 2012).

A temperatura corpórea dos répteis reflete na sua taxa metabólica, devido à condição ectotérmica desses organismos. A temperatura ótima preferida (TOP) dos répteis varia entre 20-38°C e cada espécie tem a sua faixa de TOP. A TOP deve ser levada em consideração na hora da aplicação do protocolo anestésico, pois no intervalo de temperatura onde o metabolismo do animal é mais elevado, a anestesia será metabolizada mais rápida e o tempo de ação será reduzida e mais eficiente (MOSLEY, 2005; O'MALLEY, 2005). O *shunt* cardíaco também pode influenciar na termorregulação corpórea dos répteis. O coração dos répteis tem um único ventrículo, mas funcionalmente possui 3 câmaras que direcionam o sangue para a circulação sistêmica e pulmonar, conforme a demanda do animal (MOSLEY, 2005; O'MALLEY, 2005; LONGLEY, 2008). Se o *shunt* estiver direcionado da direita para a esquerda no momento da aplicação do protocolo anestésico, o sangue será conduzido para a circulação sistêmica, promovendo melhor distribuição dos fármacos por todo o organismo.

Ainda em relação ao sistema circulatório, nos répteis é encontrado o sistema porta-renal. Alguns trabalhos sugerem que seja melhor evitar aplicar o protocolo anestésico nos membros posteriores, devido à presença do sistema porta-renal, enquanto outros trabalhos afirmam que a validade desta informação ainda não pode ser validade pela ausência de estudos (HOLZ *et al.*, 1997B; MOSLEY, 2005; KIRCHGESSNER; MICHELL 2009). O sistema porta-renal é formado pelas veias da região caudal e que encontram próximo aos rins, onde passam pelo processo de ultrafiltração antes de retonarem ao coração (HOLZ *et al.*, 1997a). Enquanto

alguns fármacos já mostraram ter uma alta taxa de eliminação na primeira passagem pelos rins, a eficiência da indução anestésica pode ser limitada (HEARD, 2001). Por fim, os répteis realizam respiração intermitente, com períodos ventilatórios intercalados por períodos de apnéia (BURGGREN; SHELTON, 1979). A fisiologia respiratória dos répteis pode refletir em algumas questões no momento da aplicação do protocolo anestésico: o maior tempo de indução quando se faz uso da anestesia inalatória e o cuidado que se deve ter quando o animal está sob o efeito de anestesia que promovem o relaxamento muscular e, conseqüentemente, deprimem o trabalho dos músculos que promovem a expiração e inspiração dos pulmões (MOSLEY, 2005; SLADKY; MANS, 2012).

O uso dos fármacos em répteis durante protocolos experimentais em investigações fisiológicas geralmente está relacionado à contenção física do animal para a preparação do mesmo para o protocolo experimental. A contenção animal pode ter como finalidade a inserção do animal no *setup* experimental (GREUNZ, *et al.*, 2018), a canulação de algum vaso sanguíneo para posterior coleta de sangue ou injeção de alguma droga (CROSSLEY *et al.*, 1998; HICKS; WANG, 1999; JACKSON *et al.*, 2004; JOYCE *et al.*, 2018), a inserção de cateter para coleta de material, introdução de sensor de medição de temperatura ou/e pressão cardíaca (SKOVGAARD *et al.*, 2005; SANDERS *et al.*, 2015), manipulação experimental *in vivo* ou *in vitro* (JOHNSON *et al.*, 1998) etc.

Dependendo da finalidade do fármaco nos experimentos de fisiologia, a escolha da droga e da dose é importante para induzir a sedação ou anestesia profunda do modelo experimental. A principal diferença entre sedação e anestesia é o grau de autonomia fisiológica em que será mantido o organismo durante a realização dos procedimentos ao qual o animal será submetido. A sedação não deve deprimir os reflexos protetores das vias aéreas ou ter efeito depressor cardiovascular (SLADKY; MANS; 2012), enquanto que a anestesia é alcançada quando há perda da sensibilidade devida à depressão do sistema nervoso central (ACKERMAN *et al.*, 2005). Levando essas definições em consideração, protocolos que só necessitem da restrição física podem fazer uso de fármacos que provoquem a sedação do animal, ao passo que em procedimentos mais prolongados e que podem causar dor, os animais devem ser contidos com substâncias e doses que provoquem a anestesia, esta podendo ser local ou geral.

Na prática veterinária, uma grande variedade de drogas tem sido usada para provocar anestesia ou sedação em répteis, em diferentes doses, aplicada sozinha ou combinada com outros fármacos (BENNETT, 1991; PARRA *et al.*, 2009; EATWELL, 2010; SLADKY; MANS, 2012; REGO, 2013; SEABRA *et al.*, 2015). Essas drogas podem ser administradas na

forma injetável, quando a droga entra no organismo por meio de injeção do fármaco na forma líquida via intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) ou intravenoso (IV), ou inalatória, quando a droga na sua forma gasosa entra no organismo por meio do trato respiratório do animal. Alguns exemplos de fármacos que podem ser citados por fazer parte da rotina veterinária de répteis são propofol, medetomidina, cetamina, butorfanol, midazolam, atipamezole, morfina, acepromazina, etomidato, rocunório, isoflurano e halotano (HELMICK *et al.*, 2000; CHITTICK *et al.*, 2002; KAUFMAN *et al.*, 2003; JUNIOR, 2005; CAVALCANTI *et al.*, 2007; FLÔRES *et al.*, 2008; BOSSO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; BORTOLINI, 2011; SANTOS ET AL., 2012; HARMS *et al.*, 2014; MCGUIRE *et al.*, 2014).

Em contraposição, uma reduzida variedade de drogas é usada para sedação e anestesia de répteis na área da pesquisa em fisiologia animal comparada. Muitos dos trabalhos que investigam a fisiologia cardiorrespiratória, por exemplo, por meio da experimentação animal fazem uso apenas de pentobarbital sódico, propofol, isoflurano e halotano para manipulação dos animais anestesiados (POWELL; GRAY, 1989; HOPKIN *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2000; AXELSSON *et al.*, 2007; SKOVGAARD *et al.*, 2007; MARSCHAND *et al.*, 2014). Algumas das justificativas ao uso desses fármacos com maior frequência diz respeito ao acesso menos burocrático a essas drogas, aos efeitos farmacológicos durante e após o tempo de anestesia e à facilidade de manipulação e aplicação da droga.

Em quelônios, testes de novos protocolos anestésicos são recorrentes, assim como a investigação dos efeitos que os fármacos sedativos e anestésicos causam nas diferentes espécies ao longo tempo. Esses testes tem o objetivo de encontrar novas combinações e doses de fármacos que possam ser usados em diferentes contextos, como trabalhos de campo e em laboratório.

A demanda por esse tipo de investigação se apresenta por inúmeros motivos. Em um trabalho de campo onde é necessária a manipulação dos animais, o uso do isoflurano é dificultado devido à necessidade de deslocamento do equipamento de inalação para o campo (MCGUIRE *et al.*, 2014). Além disso, os aparelhos de inalação anestésica tem alto valor de mercado, sendo trocadas por alternativas menos custosas. Com quelônios também é observado que muitas vezes a anestesia com anestésicos inalatórios não é tão eficiente porque esses animais podem permanecer longos períodos em pausa pós-inspiratória (JACOBSON, 1984; BIENZLE *et al.*, 1992; EMERY *et al.*, 2014; KNOTEK, 2014). Também pode ser destacado que muitos dos agentes farmacológicos que já possuem protocolos anestésicos para outros répteis não podem aplicados para quelônios sem que antes sejam testados, devido à alta variabilidade dos seus diferentes efeitos nas diferentes espécies (JACOBSON, 1984; BIENZLE *et al.*, 1992;

EMERY *et al.*, 2014). Essa alta variabilidade pode ser consequência de um fator ecofisiológico como a taxa metabólica da espécie (BIENZLE *et al.*, 1992; HIRANO, 2011). Ou seja, se determinada espécie apresenta baixa taxa metabólica, a anestesia tende a demorar mais tempo para começar a fazer efeito e mais tempo é necessário para o animal retornar à condição inicial.

A investigação de protocolos anestésicos em quelônios advém desde a década de 1980 (BENNETT, 1991), mas muitos trabalhos desse tipo têm sido publicados após a virada do século (CHITTICK *et al.*, 2002; MCGUIRE *et al.*, 2014). O uso da hipotermia para anestésias em quelônios foi uma prática cotidiana tanto na prática veterinária quanto para estudo desses animais por muitas décadas do século passado (BENNETT, 1996; THURMON *et al.*, 1996), mas hoje é uma prática eticamente questionável, pois não elimina os reflexos dolorosos. O desenvolvimento e aplicação de novas drogas, primeiramente em mamíferos, ampliou a opção de fármacos que poderiam ser testados nos quelônios.

Dessa forma, atualmente é possível encontrar trabalhos que tenham testado diferentes protocolos anestésicos em inúmeras espécies de quelônios, como o uso de agente injetáveis únicos como o propofol (*Cheolonoidis carbonaria*, BORTOLINI, 2011; *Podocnemis unifilis*, HIRANO *et al.*, 2009; *Trachemys scripta*, JACOBSEN *et al.*, 2012), midazolam (*Dermochelys coriacea*, HARMS *et al.*, 2014; *Chelydra serpentina*, BIENZLE *et al.*, 1996; *Trachemys scripta elegans*, OPPENHEIM; MOON, 1995), cloreto de succinilcolina (*Lepidochelys kempi*, MOON; STABENAU, 1996), cetamina (*Trachemys scripta*, RIVERA, 2012; *Trachemys scripta elegans*, HOLZ; HOLZ, 1994; *Chelydra serpentina*, BIENZLE, 1996), rocunório (*Terrapene carolina major*, KAUFMAN, 2003), alfaxalona (*Trachemys scripta elegans*, KNOTEK, 2014) entre outros (APÊNDICE A).

Porém, a maior parte dos trabalhos que propõe novos protocolos anestésicos para quelônios investigaram os efeitos da combinação de um ou mais agentes farmacológicos, como as combinações entre etomidato e butorfanol (*Podocnemis expansa*, ÁVILA JUNIOR, 2005), etomidato e fentanila (*Podocnemis expansa*, ÁVILA JUNIOR, 2005), propofol e xilazina (*Podocnemis expansa*, SANTO *et al.*, 2008), dextomedetomidina e midazolam (*Trachemys scripta scripta*, SCHNELBACHER *et al.*, 2012), rocunório e neostigmina (*Podocnemis expansa*, BOSSO *et al.*, 2009), alfaxalona, meloxicam e butorfanol (*Trachemys scripta elegans*, *Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Testudo marginata*, *Testudo horsfieldii*, KNOTEK, 2014), cetamina e medetomidina (*Chelonia mydas*, HELMICK *et al.*, 2007; *Caretta caretta*, CHITTICK *et al.*, 2012), cetamina e butorfanol (*Caretta caretta*, CAVALCANTI *et al.*, 2007), cetamina e dexmedetomidina (*Dermochelys coriacea*,

HARMSN *et al.*, 2014; *Trachenys scripta scripta*, MORICI *et al.*, 2017), cetamina, dexmedetomidina e morfina (*Gopherus polyphemus*, MCGUIRE *et al.*, 2014), cetamina e xilazina (*Trachemys scripta elegans*, HOLZ; HOLZ, 1994) e cetamina e midazolam (*Chelydra serpentina*, BIENZLE *et al.*, 1992; *Trachemys scripta elegans*, HOLZ; HOLZ, 1994; *Trachemys dorbigny*, FLÔRES *et al.*, 2008) (APÊNDICE A).

A investigação do uso de diferentes protocolos anestésicos em *Phrynosoma geoffroanus* ainda é escassa, visto que atualmente existem apenas três trabalhos na literatura. Em 2009 e 2012 Santos e colaboradores investigaram os efeitos da associação entre midazolam e propofol e em diferentes doses de etomidatos, respectivamente. Os efeitos do uso da lidocaína e bupivacaína foram investigados em 2011 por Ribeiro. Apesar do rápido tempo de indução observado nesses protocolos, nenhum deles era eficiente em garantir um grau de anestesia profunda por tempo suficiente para se realizar procedimentos cirúrgicos mais evasivos e demorados. Como alguns dos procedimentos dentro da experimentação em fisiologia animal requerem intervenções cirúrgicas de médio e/ou grande porte, se faz necessário o desenvolvimento de um protocolo anestésico que cumpra o papel de anestésicar o animal por tempo satisfatório. Além disso, *P. geoffroanus* apresentou o menor valor de taxa metabólica dentre os quelônios (CORDEIRO *et al.*, 2016). Essa característica fisiológica também deve ser levada em consideração na hora de se determinar um protocolo anestésico para a espécie. Com base no que foi apresentado anteriormente, o objetivo deste capítulo foi criar um protocolo anestésico para *P. geoffroanus* que possa ser usado em diferentes condições experimentais e clínicas.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Animais

Espécimes de *P. geoffroanus* (N = 7) foram cedidos pelo Bosque Zoológico Fábio Barreto, em Ribeirão Preto. Os animais foram transportados até o Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo) e foram mantidos no Biotério de Tetrápodes Silvestres. Todos os indivíduos eram adultos, sem sexo determinado e massa corpórea de $1,864 \pm 0,362$ kg. Durante o período de aclimação os animais foram condicionados em caixas de polietileno (69 x 51,5 x 39 cm) inclinadas com água, permanecendo duas áreas, alagada e seca, por onde os animais poderiam circular. O fotoperíodo da sala acompanhava o regime de dia e noite de Ribeirão Preto. A temperatura da sala era mantida em $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e durante o inverno foi usado um aquecedor portátil (Mallory, Brasil) para manter a constância de temperatura no ambiente. A alimentação foi fornecida pelo menos 2 vezes por semana, composta por ração para peixe, carne vermelha e frutas. A água foi fornecida *ad libitum*. A alimentação dos animais foi suprimida no prazo mínimo de 2 dias antes dos protocolos experimentais, visando minimizar a interferência da digestão sobre as respostas investigadas.

2.4.2 Protocolo experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (nº 16.5.818.59.8). Os animais foram atestados aptos para participarem do estudo pela aparência física geral, massa corpórea e alimentação. Todos os indivíduos participaram dos testes de todos os protocolos anestésicos. A escolha das drogas que foram usadas nesta investigação levou em consideração aplicações de diferentes drogas anestésicas e analgésicas, para se assegurar a presença dos efeitos das drogas em *P. geoffroanus*. Com base nessas observações prévias, foram selecionados protocolos anestésicos com a combinação entre cloridrato de cetamina 10% (50 mg/ml; Syntec, SP) e midazolam (5mg/ml; Teuto, GO), nas seguintes doses: combinação 1: Cetamina (60 mg/kg) e Midazolam (2 mg/kg); combinação 2: Cetamina (40 mg/kg) e Midazolam (2 mg/kg); combinação 3: Cetamina (40 mg/kg) e Midazolam (3 mg/kg).

Os procedimentos foram realizados na Nucleon Diagnósticos Veterinários (Ribeirão Preto, SP). No dia anterior à aplicação do protocolo anestésico os animais eram transportados até o local. Nos dias que os procedimentos foram realizados a temperatura da cidade teve uma máxima de 28°C . A temperatura da sala na clínica variou entre 25 e 30°C ao longo das horas de avaliação. Lâmpadas acopladas às caixas foram usadas para manter os animais aquecidos

após a aplicação dos protocolos anestésicos. A dose anestésica foi administrada sempre pela manhã. A massa corpórea de cada animal foi considerada para o cálculo do volume anestésico aplicado. A via de administração foi intramuscular (seringa de 3 mL, agulha 0,7x25 mm), aplicada nos membros anteriores e a ordem de aplicação foi randomizada para cada dia de teste. Foi estabelecido um intervalo mínimo de sete dias entre as aplicações dos diferentes protocolos anestésicos.

Com os animais em decúbito ventral foram monitorados parâmetros fisiológicos e físicos imediatamente antes e durante 5 horas após a aplicação da anestesia. Os batimentos cardíacos foram monitorados periodicamente por meio de ultrassonografia (Vivid S5, GE, EUA). As variáveis físicas foram monitoradas seguindo métodos adaptados de Ziolo e Bertelsen (2009): os movimentos espontâneos, reflexos palpebral corneal e do toque das patas, e estímulo doloroso foram classificados em presente (0) ou ausente (1), enquanto que para o tônus muscular foi usado um escore subjetivo (0 a 3). As variáveis físicas foram observadas a cada 10 minutos, na primeira hora de observação, e a cada 30 minutos entre a segunda e a quinta hora de observação. Todas as variáveis foram medidas e anotadas por um único observador em uma ficha (APÊNDICE B).

Para notificar nas fichas essas observações, se fez necessário o conhecimento prévio de parâmetro que estava sendo investigado. Os movimentos espontâneos são movimentos do corpo gerados pelo animal de forma coordenada, sem a necessidade de um estímulo anterior; o reflexo é definido como reação muscular esquelética a partir do toque; e estímulo doloroso é a resposta do animal à dor com retirada do membro do local que provoca a dor (ZIOLO; BERTELSEN, 2009). Já o tônus muscular é a resistência do animal à manipulação, no caso, do membro posterior e foi pontuado com escore de 0 a 3, onde 0 significou o tônus muscular do indivíduo não anestesiado e 3 significava a ausência de qualquer tipo de resistência. Os reflexos foram estimulados por uma pinça de dissecação anatômica sem dente, sendo que o toque nas patas se deu na porção dorsocaudal do metatarso. O estímulo doloroso foi acessado com uma beliscada com a pinça nas membranas interdigitais do membro posterior. Ao final das 5 horas de avaliação dos efeitos das diferentes doses de cetamina e midazolam, os animais retornaram ao biotério e foram monitorados por até 36 horas após a aplicação da combinação anestésica. Durante esse monitoramento, os animais foram mantidos em caixas individuais, com água numa profundidade segura para que não houvesse afogamento durante o reestabelecimento total da anestesia. Após 48 horas os animais eram devolvidos às caixas de manutenção no biotério.

2.4.3 Análise dos dados

A partir das avaliações físicas dos efeitos anestésicos e analgésicos das diferentes combinações anestésicas foram calculados os escores anestésicos, que foi a soma das pontuações dadas às respostas dos parâmetros físicos durante a avaliação, os tempos de indução, de platô e de recuperação dos protocolos, além dos tempos de indução de recuperação de cada um dos parâmetros físicos avaliados.

A soma dos “pontos” que eram aplicadas às variáveis físicas, foi determinada escores para cada tempo de avaliação. O escore máximo que poderia ser alcançado neste trabalho foi 7. Os animais que alcançaram essa pontuação foram considerados totalmente anestesiados. O escore 0 significava a ausência dos efeitos anestésicos e qualquer valor entre 0 e 7 foi considerado um estado intermediário, com a presença de alguns dos efeitos das combinações anestésicas.

Os tempos de indução, fase de platô ou duração da ação da anestesia e o tempo de recuperação do animal da anestesia foram calculados. O tempo de indução foi determinado quando pelo menos 3 parâmetros físicos mudavam de escore e se mantinham por pelo menos 10 minutos. O tempo de platô era a fase estável da indução máxima alcançada até que quaisquer 3 dos parâmetros aumentaram. O tempo de recuperação se deu quando todos os reflexos avaliados e um mínimo de 50% do tônus muscular retornaram à condição pré-anestésica. No caso dos tempos de indução e recuperação de cada parâmetro físico, o primeiro foi calculado seguindo uma lógica parecida ao tempo de indução do protocolo anestésico; foi determinado quando a avaliação alcançava o escore máximo e se mantinha pelo menos por duas avaliações seguidas. Enquanto isso, o tempo de recuperação foi determinado quando foi observada pelo menos uma mudança do score ao longo do tempo de avaliação.

2.4.4 Análise estatística

Os parâmetros físicos foram testados estatisticamente com ANOVA *one-way* e *pos-hoc* Tukey ou test-t para testar se houve diferença entre as diferentes combinações anestésicas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os valores foram apresentados com média $\pm$ desvio padrão.

2.5 RESULTADOS

Os tempos de indução, da fase de platô e de recuperação são apresentados na Tabela 1. Foi possível observar que os tempos de indução, fase platô e recuperação apresentaram valores muito variáveis. O tempo de indução para todas as combinações anestésicas foi entre 10 e 50 minutos, sendo que o tempo de indução da combinação 1 foi estatisticamente maior que a combinação 2 ($P = 0,0305$). O tempo da fase de platô apresentou diferenças significativas entre as combinações 1 e 2 ($P < 0,001$) e entre as combinações 1 e 3 ($P = 0,0337$), e o tempo de recuperação entre as combinações 1 e 2 ($P < 0,001$), sendo que para os três tempos avaliados, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre os resultados, a combinação 2 apresentou menores valores de tempo indução, platô e recuperação que a combinação anestésica 3.

Tabela 2.1. Efeitos das diferentes combinações de cetamina e midazolam sobre os tempos de indução, fase platô e tempo de recuperação.

Dados apresentados como média e desvio padrão.* aponta a diferença estatística da combinação 1 (Cetamina (60 mg/kg) e Midazolam (2 mg/kg)) em relação às outras combinações.

	Tempo de indução (min)	Fase Platô (min)	Tempo de recuperação (min)
Cetamina (60 mg/kg) Midazolam (2 mg/kg)	37,14 ± 4,88	285,71 ± 25,07	295,71 ± 11,34
Cetamina (40 mg/kg) Midazolam (2 mg/kg)	25,71 ± 12,72*	137,14 ± 70,643*	162,86 ± 64,48*
Cetamina (40 mg/kg) Midazolam (3 mg/kg)	27,14 ± 13,80*	204,29 ± 75,91*	231,43 ± 82,54*

Os escores máximos obtidos para as combinações anestésicas 1, 2 e 3 foram respectivamente 5 ($3,86 \pm 0,42$), 6 ($4,05 \pm 0,31$) e 6 ($4,04 \pm 0,32$) (Figura 2.1). Os escores máximos para as combinações 2 e 3 foram obtidos pelos mesmos indivíduos (APÊNDICE C) e em um intervalo de tempo de 10 a 30 minutos (exceto por um indivíduo, que obteve escore 6 após 90 minutos da aplicação da anestesia). Em nenhuma das combinações anestésicas aplicadas, os animais retornaram a um estágio físico observado antes da aplicação da anestesia durante o tempo de avaliação. Ao final das cinco horas de avaliação, os escores das combinações 1, 2 e 3 foram $4 \pm 0,53$, $4 \pm 0,31$ e $3 \pm 0,34$, respectivamente. O escore máximo do tônus muscular (Figura 2.2) foi alcançado em 30 minutos após as aplicações, para as três combinações

anestésicas, sendo observado um retorno ao nível intermediário do tônus muscular ao final do tempo da avaliação apenas para a combinação anestésica 3.

Os tempos de indução e recuperação foram analisados para cada parâmetro físico e analisados separadamente (Tabela 3). Os movimentos espontâneos dos animais não apresentaram diferença estatística no tempo de indução e apresentaram valores entre 20 e 40 minutos para a combinação 1, 10 e 90 minutos para a combinação 2 e 10 e 30 minutos para a combinação 3. Para o tempo de recuperação, a combinação 2 foi menor ($P = 0,0278$) que a combinação 1. Os tempos de indução e recuperação das combinações anestésicas 1, 2 e 3 foram estatisticamente iguais para tônus muscular, enquanto que para reflexo ao toque das patas, foi observada diferença para o tempo de indução, onde o início da perda da sensibilidade ao toque das patas foi significativamente mais rápido na aplicação da combinação anestésica 2 em relação à combinação 1 ($P = 0,0142$).

Para o tempo de indução à perda da dor e o tempo de recuperação ao estímulo doloroso, foram excluídos os animais que não perderam o estímulo doloroso durante o tempo de avaliação. Dessa forma, todos os resultados da combinação 1 foram excluídos e não houve diferença entre os tempos de indução à perda da dor e de recuperação ao estímulo doloroso nas combinações 2 e 3. O parâmetro “Reflexo corneal e palpebral” não entrou nas análises estatísticas porque as combinações anestésicas manejadas neste trabalho não fizeram efeito.

Figura 2.1 Escore total (0 a 7) dos efeitos das diferentes combinações anestésicas sobre os parâmetros físicos de *P. geoffroanus*.

Dados apresentados como média e erro padrão. Fonte: Cordeiro, 2019

Figura 2.2 Escore do efeito das diferentes combinações anestésicas sobre o tônus muscular (0 a 3) de *P. geoffroanus*.

Dados apresentados como média e erro padrão. Fonte: Cordeiro, 2019

Os dados referentes à frequência cardíaca são apresentados na Figura 2.3. As análises estatísticas não foram rodadas para esses dados devido à ausência de alguns resultados. Os testes dos protocolos anestésicos foram realizados durante o horário comercial na clínica e, por esse motivo, os intervalos de tempo propostos para a realização dos procedimentos não puderam ser seguidos à risca. No tempo antes da aplicação da anestesia foi observada uma tendência à diferença da frequência cardíaca entre as combinações anestésicas 1 e as demais combinações. Na combinação 1, houve um aumento da frequência após 60 minutos seguido por retorno aos valores registrados antes da aplicação da combinação anestésica. Para as combinações 2 e 3, a frequência cardíaca se manteve sem alterações após as primeiras duas horas e depois diminuiu, sem sinal de recuperação até o final do tempo de experimento.

Figura 2.3 Efeitos das combinações anestésicas sobre a frequência cardíaca de *P. geoffroanus*.

Dados apresentados como média e desvio padrão. Fonte: Cordeiro, 2019

Tabela 2.2. Efeitos das combinações anestésicas sobre o tempo de indução e recuperação dos diferentes parâmetros físicos de *P. geoffroanus*. Dados apresentados como média e desvio padrão.

	Movimento espontâneo		Tônus muscular		Reflexo ao toque das patas		Reflexo corneal e palpebral		Estímulo doloroso	
	Tempo de indução (min)	Tempo de recuperação (min)	Tempo de indução (min)	Tempo de recuperação (min)	Tempo de indução (min)	Tempo de recuperação (min)	Tempo de indução (min)	Tempo de recuperação (min)	Tempo de indução (min)	Tempo de recuperação (min)
Cetamina (60 mg/kg)	25,71	217,14	28,57	248,57	28,57	244,29	NA	NA	NA	NA
Midazolam (2 mg/kg)	± 7,87	± 107,50	± 6,90	± 70,81	± 6,90	± 87,34				
Cetamina (40 mg/kg)	27,14	87,14	25,71	244,29	15,71	150,00	NA	NA	30,00	56,00
Midazolam (2 mg/kg)	± 29,28	± 66,01 ¹	± 13,97	± 55,93	± 7,87 ²	± 54,77 ²			± 34,64 ^{*2}	± 40,99 ^{*2}
Cetamina (40 mg/kg)	20,00	197,14	22,86	198,57	22,86	168,57	NA	NA	16,00	46,00
Midazolam (3 mg/kg)	± 10,00	± 105,15	± 12,7,74	± 102,54	± 11,13	± 105,90			± 5,48 ^{*2}	± 11,40 ²

¹ aponta a diferença estatística da combinação anestésica 2 em relação às outras combinações.

² aponta a diferença estatística da combinação anestésica em relação à combinação 1.

NA se aplica quando o tempo de indução/recuperação excedeu o tempo de avaliação.

* valores que excederam o tempo de avaliação foram retirados da análise.

2.6 DISCUSSÃO

Protocolos experimentais podem exigir diferentes níveis de sedação ou anestesia, dependendo do tipo de procedimento que será realizado e o grau de invasão sobre o animal. A escolha da droga e a dose que serão utilizadas são determinantes para promover a sedação ou um bom plano anestésico. Além da escolha do fármaco, a temperatura do animal e o local de aplicação também são fatores relevantes para provocar o melhor efeito da droga (BENNET, 1991).

Répteis são animais ectotérmicos e precisam de uma fonte de calor externa para regular a temperatura corpórea. Por essa razão, durante a aplicação de um protocolo anestésico é importante que a temperatura do animal esteja dentro da zona de temperatura ótima preferida (SLADKY; MANS, 2012). Para répteis, essa temperatura normalmente é considerada entre 20°C e 25°C para espécies aquáticas e entre 25°C e 35°C para espécies de climas tropicais (VAGA, 2004; SLADKY; MANS, 2012). Para *Phrynosoma geoffroanus* a faixa térmica preferencial fica entre 24,31°C e 30,61°C (EMIDIO JÚNIOR; BARRADAS, 2017). A aplicação das diferentes combinações anestésicas se deu em dias em que a temperatura média registrada na cidade de Ribeirão Preto foi de 28°C e os animais permaneceram em caixas com lâmpadas incandescentes para manter o local aquecido, antes da aplicação e durante o tempo de avaliação das combinações anestésicas.

O sistema porta renal é um sistema de veias que passa no entorno dos rins, provindos das veias ilíacas e epigástricas (SLADKY; MANS, 2012; SILVA, 2008; O'MALLEY, 2005; SLADKY; MANS, 2012). Apesar de Kirchgeßner e Michell (2009) constatarem que o local da aplicação da anestesia não tem influência nos efeitos anestésicos, ainda é indicado que a aplicação de drogas para causar anestesia ou sedação seja aplicada em regiões craniais em répteis (FERNANDES, 2010; BENNET, 1991). Outra justificativa para a aplicação desses fármacos na região cranial é a relação entre alta taxa de eliminação, elevada toxicidade renal e o tipo de fármaco que está sendo administrado (HEARD, 2001). Neste trabalho a aplicação das combinações anestésicas foi realizada em um dos membros anteriores.

A escolha da combinação da cetamina e do midazolam para se criar um novo protocolo anestésico para *P. geoffroanus* se deu como uma alternativa ao uso de barbitúricos, como o pentobarbital sódico, durante procedimentos na fisiologia animal (DUPRAS *et al.*, 2001; ALVES-JÚNIOR *et al.*, 2012). Em relação ao pentobarbital sódico, a combinação de cetamina e midazolam apresenta poucos efeitos colaterais fisiológicos, menor tempo de indução e/ou recuperação (KAPLAN; TAYLOR, 1957; WOOD *et al.*, 1992; BENNETT,

1991), além de contar com um menor custo e menores dificuldades ao acesso a esses fármacos em território brasileiro.

A cetamina é um anestésico dissociativo que atua em áreas corticais e suprime a transmissão de impulsos nociceptivos da região da formação reticular mesencéfala e do núcleo medial do tálamo (VALADÃO, 2002). Por essa razão, a cetamina possui propriedades analgésicas e de paralisia do movimento e amnésia sem a perda da consciência (THURMON *et al.*, 1996; LUFT; MENDES, 2005). Seu uso isolado já foi bem disseminado, mas não é mais indicado, devido às suas limitações como relaxamento muscular e analgesia insuficientes, longos períodos para a total recuperação da anestesia e mudanças nas frequências cardíaca e respiratória (BONATH, 1979; SEDGEWICK, 1980; FRYE, 1981; COOPER; SAINSBURY, 1997; ROJAS, 2002). O midazolam é um benzodiazepínico que possui atributos hipnóticos, ansiolíticos e miorrelaxantes (BROWN *et al.*, 1997; VALADÃO, 2002). Essas características causam sedação e relaxamento muscular, sem gerar alta toxicidade e alterações da frequência cardíaca (BIENZLE; BOYD, 1992). Dessa forma, a associação da cetamina com o midazolam pode garantir ótima sedação e um bom plano anestésico sem a necessidade de aplicação de altas doses e sem causar alterações fisiológicas severas.

As diferentes doses da combinação entre cetamina e midazolam se mostraram eficientes em promover sedação e anestesia, dependendo da dose que foi testada. Os resultados mostram uma alta variabilidade dos tempos de indução, fase platô e tempo de recuperação para todas as combinações testadas. Essa alta variabilidade é consequência da variação da própria espécie (BENNETT, 1991). Cada animal pode variar sua taxa metabólica individualmente, produzindo diferentes taxas de absorção, metabolização e eliminação dos anestésicos. Resultados como o encontrado neste estudo são facilmente encontrados na literatura e refletem a dificuldade de se encontrar um protocolo anestésico que seja seguro e hábil para diferentes espécies de répteis.

A frequência cardíaca pré-anestésica em *P. geoffroanus* variou entre 11,00 e 44,40 batimentos por minuto (bpm). Porém, valores mais altos no momento pré-anestésico foram mensurados na combinação 1 ($26,91 \pm 11,32$ bpm) quando comparado às combinações 2 ($17,26 \pm 4,82$) e 3 ($18,00 \pm 2,83$). Santos e colaboradores (2012) mediram a frequência cardíaca pré-anestésica em *P. geoffroanus*, encontrando valores entre 35,2 e 39 bpm. As diferenças entre as frequências cardíacas observadas antes da aplicação das condições 1 e 2 e 3 podem ter sido causada pela habituação dos animais ao transporte até a clínica e a manipulação do animal para a aplicação dos protocolos anestésicos. Ao longo do tempo de ação das combinações anestésicas, foi possível observar como padrão uma tendência à queda da frequência cardíaca.

A mesma tendência foi encontrada em *Podocnemis unifilis*, após um aumento na frequência cardíaca dez minutos após a aplicação do protocolo anestésico (ALVES-JÚNIOR, 2012). Montenegro (2004) também registrou um aumento inicial na frequência cardíaca e posteriormente gradual redução entre 30 e 60 minutos. Essa observação vai de encontro às outras investigações que propuseram protocolos anestésicos com cetamina e midazolam e não encontraram mudanças nas respostas fisiológica cardíaca e respiratória em seus resultados (BIENZLE; BOYD, 1992; HOLZ; HOLZ, 1994; SCHUMACHER, 1996; HERNANDEZ-DIVER *et al.*, 2007).

Dentre as diferentes combinações testadas, a combinação 1 (Cetamina 60 mg/kg e Midazolam 2 mg/kg) apresentou maiores tempos de indução, platô e recuperação. Quando comparado com os efeitos de cetamina e midazolam na mesma dose, para *Trachemys scripta elegans*, observou-se que os tempos de indução, platô e recuperação foram menores para *T. scripta*, mesmo com os animais sendo mantidos em temperaturas entre 23-25 °C (HOLZ; HOLZ, 1994). Quando submetidos ao mesmo protocolo anestésico da combinação 2, *Caiman crocodilus* obteve um tempo de indução da anestesia três vezes menor do que os relatados neste trabalho (HIRANO, 2011). A relação encontrada entre o aumento da dose de cetamina e diminuição dos tempos de indução também não foram encontrados no presente trabalho. Essas diferenças podem ser consequência da menor taxa metabólica apresentada por *P. geoffroanus* (CORDEIRO *et al.*, 2016), que descaracterizariam uma dose-dependência para a ocorrência de um bom plano anestésico.

Em relação às combinações 2 e 3, apesar de não ter apresentado diferença estatística, foi possível constatar que o tempo da fase platô e o tempo de recuperação foram maiores na combinação 3. Apesar do uso isolado do midazolam em protocolos anestésicos já ter sido testado e comprovado ser inviável para causar sedação ou anestesia em répteis (HARVEY-CLARK, 1993), a combinação com a cetamina e em doses mais altas tendeu a retardar o tempo de ação do plano anestésico e o tempo de recuperação sobre os indivíduos de *P. geoffroanus*.

O escore máximo que poderia ser obtido neste trabalho não foi alcançado porque em todos os protocolos anestésicos testados, os reflexos palpebral e corneal não foram cessados. A perda dos reflexos palpebral e corneal são um indicativo da anestesia profunda excessiva em répteis (BENNETT, 1996; MOSLEY *et al.*, 2003) e, por esse motivo, devem ser evitados. A cetamina pode promover uma boa sedação, no entanto, sem haver perda de consciência do animal (BENNETT, 1996). O retorno dos animais às condições pré-anestésicas não foi observado neste trabalho (escore 0), após um intervalo de cinco horas de avaliações. O

protocolo que injetou 60 mg/kg de cetamina 2 mg/kg de midazolam foi o que manteve os animais mais letárgicos ao final do tempo de avaliação, seguido da combinação 2, e da combinação 3, respectivamente. Isso pode ser explicado pela alta dose de cetamina aplicada na combinação 1, que pode prolongar o retorno à condição pré-anestésica (HOLZ; HOLZ, 1994; ALVES-JUNIOR, 2006; RIVERA, 2012).

O impedimento do retorno dos animais às condições pré-anestésicas se deu por diferentes parâmetros físicos, dependendo de qual protocolo anestésico era testado. As combinações anestésicas 1 e 2 não diminuíram os escores de tônus muscular e apenas dois indivíduos realizavam movimentos espontâneos ao final do tempo de observação. Para a combinação anestésica 3, três animais não apresentaram movimentos espontâneos ao final do teste, porém cinco animais já apresentavam sensibilidade ao toque nas patas.

O escore 6 foi atingido nas combinações 2 e 3, devido, em sua maioria, à ausência de resposta ao estímulo doloroso. Entre os protocolos que usaram midazolam nas doses 2 e 3 mg/kg (cetamina na dose 40 mg/kg), ambas as combinações mantiveram os animais sem estímulo doloroso entre 10 e 40 min. Bienzle e Boyd (1992) testaram a combinação de cetamina (40 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg) em *Chelydra serpentina* e concluíram que, apesar da combinação ter promovido a ausência do estímulo doloroso em quatro dos seis animais testados, ocorreu por um período muito curto para se fornecer analgesia para um procedimento cirúrgico. A mesma combinação do protocolo anestésico foi testada em *Caiman crocodilos*, mas não interrompeu o estímulo doloroso (HIRANO, 2012). Santos e colaboradores (2012) alcançaram um plano anestésico com ausência de resposta ao estímulo doloroso em três espécimes de *Podocnemis expansa*, quando submetidos à combinação anestésica de cetamina (60 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg), mas os autores concluíram que esse resultado não foi suficiente para estabelecer um novo protocolo anestésico para procedimentos cirúrgicos na espécie. Em *P. geoffroanus*, cinco dos sete animais testados perderam a nocicepção nas combinações 2 e 3, com tempo de recuperação variando entre 10 e 50 minutos, tempo suficiente para a realização de cirurgias de pequeno e médio porte.

A dor é uma sensação que, apesar de subjetiva, pode ser definida como uma experiência desagradável que causa uma reação repulsiva ou agressiva (BENNETT, 1998; MOSLEY, 2011). Os mesmos neurotransmissores documentados como moduladores da dor em mamíferos já foram identificados em anfíbios e répteis (DAVIDOFF *et al.*, 1973; GANS; ULINSKI, 1992; BENNETT, 1998). A reação comportamental a um estímulo doloroso se torna um parâmetro objetivo e mensurável importante para se avaliar um protocolo anestésico. A presença do midazolam neste trabalho teve o objetivo de se estabelecer um protocolo

anestésico que provocasse analgesia satisfatória para *P. geoffroanus*, uma vez que o uso da cetamina isolado não promove esse aspecto (BIENZLE; BOYD, 1992; HOLZ; HOLZ, 1994). A combinação 2 apresentou vantagens de aplicação em relação às demais combinações. Os movimentos espontâneos retornaram mais rápidos em relação às combinações 1 e 3, e o tempo de indução e recuperação no que se refere ao toque das patas foi menor em relação à combinação 1. Esses resultados foram alcançados fazendo uso de menores doses tanto de cetamina quanto de midazolam. Combinação 2 aparenta ser a melhor escolha tanto para procedimentos mais simples como para realizar cirurgias mais invasivas e que não tenham duração tão longa. Enquanto isso, a combinação 3 apresentou um retorno às condições do pré-anestésicas mais rápido do que as outras combinações, se mostrando ideal para aplicação clínica ou experimental que possam envolver procedimentos invasivos mais curtos, a manipulação do animal pré-experimento ou até indução anestésica para canular o animal para manutenção da cirurgia em anestésicos inalatórios.

3. CAPÍTULO 3 - COMPORTAMENTO SUBAQUÁTICO DE *PHRYNOPS GEOFFROANUS* FRENTE À RESPOSTAS FISIOLÓGICAS

3.1 RESUMO

Desde que fisiologia e comportamento de um animal têm que se integrar para manter a homeostase corpórea, estudos conjuntos da fisiologia e do comportamento são fundamentais para entender a biologia de um organismo. Para tanto, se faz importante o padrão de atividade da espécie que se deseja estudar, demarcando sua história natural e níveis de atividades ao longo de um dia ou ao longo do ano e, poder acessar essas informações para mensurar os tempos e frequências dos diferentes padrões comportamentais e fazer perguntas acerca dos diferentes aspectos da biologia da espécie que possam envolver as respostas comportamentais, incluindo investigações fisiológicas. A respiração bimodal, uma estratégia bem documentada na literatura, pode aumentar o tempo submerso e promover diferentes padrões comportamentais em quelônios aquáticos. *P. geoffroanus* foi exposta a diferentes pressões parciais de oxigênio aquático enquanto que diferentes partes do corpo eram isoladas mecanicamente do meio aquático, com o objetivo de se analisar as mudanças comportamentais e se estas são resultado da presença de respiração bimodal na espécie. Os comportamentos dos indivíduos foram analisados em períodos de medição ao longo de duas horas. A partir da observação dos comportamentos subaquáticos de *P. geoffroanus* foi gerado um etograma composto por 18 categorias comportamentais. A frequência desses comportamentos mostrou que *P. geoffroanus* passou a maior parte do tempo em repouso e submerso. Os tempos de atividade e submerso foram diferentes quando os animais tinham a cabeça e a cabeça e a cloaca isolada, em relação à ausência de intervenção e a intervenção na cloaca e na pele, evidenciando que as vias extrapulmonares são as vias mais importantes para as trocas e que estruturas extrapulmonares de trocas gasosas estão ausentes ou não atuam o suficiente para manter o nível de atividades nesses animais.

3.2 ABSTRACT

Since an animal's physiology and behavior have to be integrated to maintain bodily homeostasis, joint studies of physiology and behavior are critical to understand an organism's biology. Therefore, it is important to study the activity pattern of a species, investigating its natural history and activity levels over a day or throughout the year. This will allow to access the times and frequencies of different behavioral patterns and to ask questions about different aspects of a species biology that may involve behavioral responses, including physiological investigations. Bimodal breathing, a well-documented strategy in the literature, can increase submergence time and promote different behavioral patterns in aquatic turtles. *P. geoffroanus* was exposed to different partial pressures of aquatic oxygen while different body parts were isolated from the aquatic environment in order to analyze behavioral changes and whether they could be associated to bimodal respiration in the species. The behaviors of individuals were monitored for two hours and analyzed at four different time point (0-10, 30-40, 60-70 e 110-120 min). From the observation of the underwater behavior of *P. geoffroanus* an etogram composed of 18 behavioral categories was generated. The frequency of these behaviors showed that *P. geoffroanus* spent most of its time resting underwater. The times of activity and submergence were different when the animals had head or head and cloaca isolated, when compared to the absence of intervention or intervention in cloaca and skin. This indicates that the lungs represent the most important pathway for gas exchange and that extrapulmonary gas exchange structures seems to be absent or may not be sufficiently well developed to maintain the level of aerobic activity in this species.

3.3 INTRODUÇÃO

Tinbergen (1963) considerou a fisiologia uma causa proximal do comportamento animal. Na fisiologia comparada, contudo, estudos de mecanismos celulares ou sistêmicos são mais comuns, enquanto etólogos geralmente desconsideram as bases fisiológicas do comportamento. Desde que fisiologia e comportamento de um animal têm que se integrar para manter a homeostase corpórea, estudos conjuntos da fisiologia e do comportamento são fundamentais para entender a biologia de um organismo.

A observação de padrões comportamentais já é considerada uma importante ferramenta de orientação para a compreensão do comportamento animal, do estudo da neurobiologia, das questões emergentes sobre conservação do meio ambiente e manejo de recursos naturais e do bem-estar animal (BECK *et al.*, 1991; RUBICK; NIBLICK, 1994; YAMAMOTO, 2011; SMART *et al.*, 2014). A investigação de questões ecofisiológicas e evolutivas, como preferência térmica, relações sociais e o uso de padrões comportamentais como caracteres filogenéticos também são cada vez mais frequentes (ANGILLETTA *et al.*, 2002; SENTER *et al.*, 2014). A construção de um etograma, que consiste numa lista de padrões comportamentais e suas descrições (ARAÚJO, 1996), é importante por dois motivos a formulação e estudo dos repertórios comportamentais, por meio dos quais é possível, em primeiro lugar, conhecer o padrão de atividade da espécie que se deseja estudar, demarcando sua história natural e níveis de atividades ao longo de um dia ou ao longo do ano e, poder acessar essas informações para mensurar os tempos e frequências dos diferentes padrões comportamentais e fazer perguntas acerca dos diferentes aspectos da biologia da espécie que possam envolver as respostas comportamentais, incluindo investigações fisiológicas.

Trabalhos que construíram inventários comportamentais, no intuito de gerarem um etograma em espécies de quelônios ainda são incipientes na literatura (RUBY; NIBLICK, 1994; ARAÚJO, 1996; KAXMAIER *et al.*, 2001; SCHNEIDER *et al.*, 2010; SMART *et al.*, 2014), mas diversas espécies de quelônios já tem repertórios bem descritos sobre o comportamento alimentar (PRITCHARD, 1984, 1989; LEGLE, 1993; CLOUDSLEY-THOMPSON, 1994; PRITCHARD; TREBBAU, 1994, SOUZA E ABE, 1995; MOLINA *et al.*, 1998; MALVASIO *et al.*, 2003), comportamento reprodutivo (BELS; CRAMA, 1994) e relações agonísticas (AUFFENBERG, 1977; BURY, 1979; RUBY; NIBLICK, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 2010). Em contraste, raros são os trabalhos que se propuseram a descrever alguns padrões comportamentais subaquáticos (FORMANOWICZ *et al.*, 1989; ARAÚJO, 1996; PRIEST; FRANKLI, 2002; CLARK *et al.*, 2008). Espécies de quelônios podem permanecer longos

períodos submersos (SANTOS *et al.*, 1990), e o comportamento de mergulho dentro desse clado pode ter relação com aspectos ecológicos, como o perigo da predação (KRAMER *et al.*, 1983; KRAMER, 1988; HEITHAUS; FRID, 2003) e a temperatura do ambiente (HERBERT; JACKSON, 1985; ULSTCH, 1985; PRASSACK *et al.*, 2001; PRIEST; FRANKLIN, 2002; GORDOS *et al.*, 2003a, 2003b), e aspectos fisiológicos (GORDOS; FRANKLIN, 2002; MATHIE; FRANKLIN, 2006; CLARK *et al.*, 2008).

Os aspectos fisiológicos que podem levar a diferentes tempos de submersão em quelônios aquáticos são inúmeros, como o volume pulmonar, a capacidade de reduzir o metabolismo aeróbico, produção de ATP por vias anaeróbicas e habilidade de absorver oxigênio do meio aquático por vias extrapulmonares (NIELSEN, 1983). Dessa forma, um determinado nível de atividade subaquática pode assegurar a manutenção da vida do organismo, resultando no mínimo de suprimento de oxigênio necessário para sistema nervoso central e o coração (SANTOS ET AL, 1990; GORDOS; FRANKLIN, 2002).

A respiração bimodal, uma estratégia bem documentada na literatura, pode aumentar o tempo submerso e promover diferentes padrões comportamentais em quelônios aquáticos (BELKIN, 1968; ULTSCH *et al.*, 1984; STONE *et al.*, 1992A; PRIEST; FRANKLIN, 2002). Muitos trabalhos mostram uma correlação positiva entre a concentração de oxigênio dissolvido na água e o tempo de submersão de quelônios (ULTSCH *et al.*, 1984; ULTSCH, 1985; STONE *et al.*, 1992b). Por exemplo, espécies da família Trionychidae são eficientes trocadores dos gases oxigênio e dióxido de carbono, podendo se manter submersos por várias horas ininterruptamente (ULTSCH *et al.*, 1984; ULTSCH, 1985; STONE *et al.*, 1992b), enquanto espécies como *Kinosternon subrubrum* emergem até à superfície com mais frequência (STONE *et al.*, 1992a).

A pele, o epitélio bucofaringeal, o epitélio da cloaca e/ou a bolsa cloacal podem ser responsáveis pelas trocas gasosas aquáticas em quelônios (GAGE; GAGE, 1886; WANG *et al.*, 1989; STONE *et al.*, 1992a; KING; HEATWOLE, 1994; GORDOS; FRANKLIN, 2002; JACKSON *et al.*, 2004). Para irrigar os tecidos da cavidade bucofaringeal e das bolsas cloacais, os animais precisam produzir fluxo de água por meio de atividade muscular, que age como uma bomba (BELKIN, 1968; LEGLER; CANN, 1980; WANG *et al.*, 1989; BAGATTO; HENRY, 1999; DRUZISKY; BRAINERD, 2001; GORDOS; FRANKLIN, 2002), enquanto que as trocas gasosas pelo epitélio podem ocorrer através da difusão passiva (ROOT, 1949; GIRGIS, 1961; BELKIN, 1968; STONE *et al.*, 1992; CROCKER *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2004). O acesso da água a essas estruturas depende de posturas e padrões comportamentais. *Chrysemys picta bellii* e *Graptemys geographica* mantêm a cabeça e os

membros estendidos quando está submerso em contato com o substrato ou flutuando, aumentando a superfície de contato do epitélio com a água oxigenada (CROCKER *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2004). A ação da bomba bucal foi observada em *Chelydra serpentina*, *Sternotherus minor* e *Platysternum megacephalum* e depende da abertura e fechamento da boca e posterior movimento gular (BELKIN, 1968; BAGATTO; HENRY, 1999; DRUZISKY; BRAINERD, 2001). A bomba cloacal já foi observada em muitas espécies de quelônios, como *Rheodytes leukops* e *Elseya albagula*, por meio da ação das bolsas cloacais (GORDOS; FRANKLIN, 2002; STOREY *et al.*, 2008)

Como consequência dos ajustes fisiológicos necessários para a manutenção do mergulho nas espécies aquáticas de quelônios, é imprescindível uma mudança comportamental complementar a esses ajustes, a qual pode ser acessada por meio da observação da mudança das frequências dos comportamentos. Alguns trabalhos já vêm investigando a relação entre o nível de respiração bimodal e o tempo de mergulho em diferentes espécies (GATTE, 1984; PRIEST; FRANKLIN, 2002; GORDOS *et al.*, 2003; MATHIE; FRANKLIN, 2006; CLARK *et al.*, 2008), mas nenhum deles buscou relacionar o tempo de submersão com o nível de atividade subaquática e a hipótese da respiração bimodal.

Em trabalho publicado por Cordeiro e colaboradores (2016), os valores de consumo de oxigênio aéreo em *Phrynops geoffroanus* foram os menores já mensurados para quelônios (JACKSON, 1985; GLASS *et al.*, 1985; VITALIS; MILSOM, 1986a,b; BAGATTO; HENRY, 1999). A partir desse resultado, foi proposta a hipótese de que *P. geoffroanus* seria capaz de realizar respiração bimodal. Uma das estratégias para se responder a essa pergunta é investigar os padrões comportamentais da espécie. Para verificar se há relação entre tempo de submersão e níveis de atividade e as mudanças nos níveis de oxigênio na água, *P. geoffroanus* foi exposta a diferentes pressões parciais de oxigênio aquático enquanto que diferentes partes do corpo eram isoladas mecanicamente do meio aquático. Se *P. geoffroanus* tiver um nível considerável de trocas gasosas com o meio aquático, o mesmo responderia às mudanças do nível de oxigênio aquático mudando as frequências de determinados padrões comportamentais. O isolamento de partes do corpo possibilita o esclarecimento sobre qual estrutura do corpo seria responsável pela captação do oxigênio do meio aquático.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Animais

Espécimes de *P. geoffroanus* (N = 6) foram cedidos do Bosque Zoológico Fábio Barreto, em Ribeirão Preto. Os animais foram transportados até o Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo) e foram mantidos no Biotério de Tetrápodes Silvestres. Todos os indivíduos eram adultos de sexo indeterminado. Durante o período de aclimação os animais foram condicionados em caixas de polietileno (69 x 51,5 x 39 cm) mantidas inclinadas com água, permanecendo duas áreas, alagada e seca, por onde os animais poderiam circular. O fotoperíodo da sala acompanhava o regime de dia e noite de Ribeirão Preto. A temperatura da sala era mantida em $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão) e durante o inverno foi usado um aquecedor portátil (Mallory, Brasil) para manter a constância de temperatura no ambiente. A alimentação foi fornecida pelo menos 2 vezes por semana, composta por ração para peixe, carne vermelha, frutas e legumes. A água foi fornecida *ad libitum*. A alimentação dos animais foi suprimida no prazo mínimo de 2 dias antes da coleta de dados comportamentais, visando reduzir as interferências da digestão sobre as respostas investigadas.

3.4.2 Filmagens

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (n° 16.5.818.59.8). A sala onde foram realizadas as filmagens teve o acesso restrito, para que movimentos externos não interferissem no comportamento do animal que estava sendo filmado. As temperaturas da sala e da água do aquário eram controladas para se manterem a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram filmados individualmente em um aquário (150 x 50 x 60 cm) contendo duas plataformas de diferentes alturas, permitindo que o animal tivesse acesso à superfície mantendo o contato das patas com o substrato (Figura 3.1). Cada indivíduo foi habituado anteriormente ao aquário em sessões de filmagens piloto. Uma câmera filmadora (Canon SX510 HS) registrou o repertório comportamental dos animais para análise posterior. As filmagens foram realizadas entre os meses de setembro e dezembro de 2017, entre 9 e 17 horas. Para cada animal foram registradas sessões com duração de duas horas para cada tratamento ao qual o animal foi submetido.

Os animais foram expostos a dois fatores, com diferentes tratamentos: intervenções em diferentes estruturas corpóreas (controle, cabeça, cloaca, cabeça e cloaca, pele), que eram bloqueadas para impedir a troca gasosa com o meio aquático, e diferentes misturas de gases

na água (normóxia – 21%O₂, hipóxia – 3±1%O₂, e anóxia – 0%O₂), totalizando 15 combinações de tratamentos. Todos os indivíduos passaram por todas as combinações de tratamentos e a ordem das filmagens foi aleatorizada. Após o termino de uma bateria de filmagens para todos os indivíduos, se iniciava a próxima, tomando-se o cuidado, no momento da aleatorização da ordem dos animais a serem filmados, garantir pelo menos 48 horas entre duas filmagens.

O isolamento das diferentes partes do corpo se deu como descrito a seguir. A cabeça foi isolada com a colocação de preservativos e luvas de látex na cabeça do animal. A base do preservativo exercia fricção suficiente para se prender ao pescoço do animal sem a necessidade de amarrar e sem causar estrangulamento no animal. Para evitar que os animais rasgassem o preservativo, as unhas foram cortadas e lixadas. O isolamento da cloaca ocorreu com a sutura da saída da cloaca. O animal foi anestesiado no local com lidocaína (cloridrato de lidocaína 2% e fenilefrina 1:2500, S.S. White 100, Brasil) e após a sutura, foi colocado um dedo de látex, para garantir o isolamento da abertura da cloaca. Por fim, para o isolamento da pele foi usado silicone acético para aquário (Selamais, Brasil), um tipo de silicone não tóxico ao animal e a manipuladora.

Para se alcançar a saturação de oxigênio no aquário durante a hipóxia e anóxia, foi bombeado gás nitrogênio no meio aquático até se alcançar 3% e 0% de O₂, respectivamente. Para a manutenção do meio normóxico, foi bombeado ar ambiente para dentro do aquário. Os espaços aquático e aéreo do aquário foram isolados do meio externo, evitando o escape de nitrogênio. A injeção do nitrogênio ocorria antes de se colocar o animal no aquário. Era aceito o decaimento ou o aumento de no máximo 1% de O₂ na água durante a sessão de filmagem. Para o acompanhamento da saturação de O₂ na água foram utilizados dois sensores de oxigênio aquático (Witrox 1, Loligo System, Dinamarca) em diferentes locais do aquário durante as filmagens. Se houvesse necessidade, mais nitrogênio era adicionado ao aquário durante as filmagens para que os níveis de oxigênio retornassem ao desejado.

Figura 3.1 Esquema ilustrando o aquário (medidas) onde os animais eram filmados, com a localização das plataformas (medidas) e a altura do nível de água

As condições de normóxia, hipóxia e anóxia foram alcançadas conectando mangueiras do aquário a uma bomba de ar ou à entrada de um cilindro de nitrogênio, respectivamente. O nível de oxigênio e a temperatura do aquário foram acompanhados com a introdução de sensores de oxigênio e temperatura. Fonte: Cordeiro, 2019

3.4.3 Coleta e análise dos dados

Os padrões comportamentais dos espécimes de *P. geoffroanus* foram observados por análise focal (ALTMANN, 1973). Os padrões comportamentais observados foram identificados e descritos, gerando um repertório de comportamentos subaquáticos. O programa EthoLog 2.2 (OTTONI, 2000) foi utilizado para quantificação e temporização dos comportamentos observados.

Os comportamentos descritos foram categorizados entre ativo e inativo, emerso e submerso. Para cada uma dessas categorias, foi somado o tempo que o animal passava exibindo cada comportamento componente nos períodos de observação. Foram analisados quatro intervalos de dez minutos separadamente: os primeiros dez minutos, o intervalo entre 30 e 40 minutos, o intervalo entre 60 e 70 minutos e os dez últimos minutos de filmagem, somando um total de quarenta minutos de observação, com o intuito de se investigar se o repertório comportamental de *P. geoffroanus* se modifica quando exposto às diferentes combinações de tratamento ao longo do tempo.

3.4.4 Análises estatísticas

Para analisar o efeito dos fatores *Intervenções no corpo*, *Misturas de gases* e *Períodos de medição* (variáveis independentes) sobre *tempo de atividade* e *tempo submerso* (variáveis dependentes). Para isso, foi desenvolvido no software R (R CORE TEAM, 2017), utilizando RStudio (2015), com os pacotes base (R Core Team 2019) emmeans (Lenth 2019), lme4 (BATES *et al.* 2015), lmerTest (KUZNETSOVA; BROCKHOFF; CHRISTENSEN 2017), multcomp (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL 2008), psycho (MAKOWSKI 2018), purrr (HENRY; WICKHAM 2019), tidyverse (WICKHAM 2017), um modelo linear misto, considerando a interação entre os fatores, com o indivíduo como fator aleatório, para controlar para o uso do mesmo animal em diferentes situações. Foi feito um teste *post hoc* de Tukey, para verificar as diferenças entre os diferentes tratamentos e combinações de tratamentos. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, e foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Etograma e aspectos gerais do comportamento subaquático

No total, as quatro sessões de 10 minutos para cada combinação de tratamentos levaram à análise de aproximadamente 70 horas de vídeos. Os comportamentos subaquáticos observados em *P. geoffroanus* foram classificados em 18 categorias comportamentais e descritos conforme apresentado na Tabela 1, no formato de etograma para a espécie. Esses comportamentos foram agrupados nas categorias “Deslocamento”, “Mergulho”, “Exploração”, “Repouso” e “Tocar a cabeça”.

P. geoffroanus se mostrou pouco ativa debaixo d’água. Muitos dos comportamentos descritos são posturas em que o animal permanece quando está em repouso. O repouso pode ser observado em diferentes condições, quando o animal está emerso e submerso, flutuando, em contato com o substrato, perpendicular à coluna d’água ou em ângulo de 45°. Quando os animais estavam ativos, nadavam na coluna d’água e com diferentes mudanças de direção, tanto no eixo horizontal quanto no eixo vertical. O nado e o afundar foram os comportamentos exercidos quando o animal ia ao encontro do substrato. Para entrar em contato com a superfície da água, *P. geoffroanus* podia caminhar até alcançar as plataformas e depois escalá-las, além da possibilidade de realizar nado vertical.

Além dos padrões comportamentais apresentados no etograma, *P. geoffroanus* realizou periódicas aberturas de boca, seguidas ou não de movimentação gular, além de movimentos gulares isoladas. Em alguns animais também foi possível observar a presença de fluxo de água próximo à cloaca. Porém, essas observações não foram quantificadas devido à resolução da câmera, que não permitiu que esses comportamentos fossem observados com detalhes sempre que executados.

Foi observado que os indivíduos de *P. geoffroanus* apresentaram alta variabilidade nas frequências absolutas (número de vezes que determinado comportamento foi observado) e relativas (%) dos diferentes comportamentos realizados (Tabela 2). Enquanto que para as frequências absolutas houve uma tendência ao aumento dos diferentes comportamentos observados, para as frequências relativas observou-se que a frequência com que os animais permaneciam em repouso diminuiu ao longo do tempo, ou seja, houve um aumento na variedade de categorias comportamentais.

Tabela 3.1 Etograma dos comportamentos subaquáticos observados em *P. geoffroanus*

<i>Deslocamento</i>	
<i>Nadar</i>	
Nado vertical	Deslocamento perpendicular do animal em relação à superfície.
Nado horizontal emerso	Deslocamento horizontal do animal em relação à superfície, com a cabeça fora d'água.
Nado horizontal submerso	Deslocamento horizontal do animal em relação à superfície, dentro do corpo d'água.
Caminhar	Deslocamento horizontal do animal em contato com o substrato.
Afundar	Deslocamento passivo do animal da superfície em direção ao substrato.
Escalar	Animal suporta o peso do corpo com as patas posteriores e as patas anteriores se movimentam para alcançar substrato mais alto.
<i>Mergulho</i>	
Explorar	Colocar a cabeça para dentro do corpo d'água. Movimento da cabeça em diferentes direções, com ou sem deslocamento.
<i>Repouso</i>	
Repouso emerso	Ausência de movimentos contínuos na superfície do corpo d'água.
Flutuar	O animal se mantém em equilíbrio na superfície do corpo d'água.
Repouso na parede	O animal dispõe o corpo em um ângulo de aproximadamente 45°, com a exposição total somente da cabeça.
Repouso em pé	O animal dispõe o corpo paralelo à superfície. As quatro patas ficam em contato com o substrato, perpendicular ao mesmo.
Repouso sentado	Apenas as patas posteriores estão em contato com o substrato e o animal fica inclinado. Pode ser observada exposição das narinas, cabeça e/ou parte da carapaça.
Repouso submerso	Ausência de movimentos contínuos no fundo do corpo d'água.
Flutuar	O animal se mantém em equilíbrio no corpo d'água.
Repouso na parede	O animal dispõe o corpo em um ângulo de aproximadamente 45°.
Repouso em pé	O animal dispõe o corpo paralelo à superfície. As quatro patas ficam em contato com o substrato, perpendicular ao mesmo.
Repouso sentado	Apenas as patas posteriores estão em contato com o substrato.
Repouso com plastrão no substrato	O plastrão está em contato com o substrato, os membros e a cabeça podem ou não ficar recolhidos na carapaça.
<i>Tocar a cabeça</i>	Contato das patas dianteiras com a cabeça.

Tabela 3.2 Frequência absoluta de ocorrência dos padrões comportamentais registrados em *P. geoffroanus*

Para cada período de medição analisado, para a situação controle (sem intervenções no corpo) em normóxia. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mínimo e máximo).

	0'-10'	30'-40'	60'-70'	110'-120'
Nado	4,17 $\pm$ 9,72 (0 – 24)	5,83 $\pm$ 6,71 (0 – 14)	4,83 $\pm$ 6,43 (0 – 17)	11 $\pm$ 5,48 (4 – 18)
Caminhar	1,50 $\pm$ 1,76 (0 – 4)	3,67 $\pm$ 5,24 (0 – 14)	0,33 $\pm$ 0,52 (0 – 1)	1,33 $\pm$ 1,86 (0 – 5)
Afundar	0,83 $\pm$ 1,60 (0 – 4)	0,67 $\pm$ 0,52 (0 – 1)	1,67 $\pm$ 2,25 (0 – 6)	1,00 $\pm$ 1,09 (0 – 3)
Escalar	0,50 $\pm$ 0,84 (0 – 2)	0,83 $\pm$ 1,60 (0 – 4)	1,17 $\pm$ 1,17 (0 – 3)	0,33 $\pm$ 0,82 (0 – 2)
Mergulho	0,33 $\pm$ 0,82 (0 – 2)	2,00 $\pm$ 1,55 (0 – 4)	1,00 $\pm$ 0,63 (0 – 2)	3,33 $\pm$ 2,16 (0 – 6)
Explorar	2,83 $\pm$ 4,66 (0 – 11)	4,50 $\pm$ 6,06 (0 – 16)	6,67 $\pm$ 4,50 (2 – 10)	5,67 $\pm$ 4,23 (0 – 12)
Repouso	3,00 $\pm$ 2,10 (1 – 6)	5,83 $\pm$ 5,00 (1 – 13)	5,833 $\pm$ 2,56 (3 – 9)	8,00 $\pm$ 4,29 (3 – 15)

A tendência dos espécimes de *P. geoffroanus* em permanecer em repouso (Figura 3.2) foi evidente ao longo dos três períodos de análise, principalmente nos primeiros minutos em que os animais foram inseridos no aquário. Esse resultado indica que *P. geoffroanus* pode passar por um período de *freezing* comportamental. Porém, conforme o tempo foi passando, a frequência relativa do repouso diminuiu quase pela metade. As categorias “Explorar” e “Nado” foram mais frequentes quando os animais estavam submersos e ativos, com as frequências variando respectivamente de $10,16 \pm 15,90$ a $23,04 \pm 19,35\%$ e $9,47 \pm 21,43$ a $30,14 \pm 18,88\%$, entre o início e o final das filmagens.

Figura 3.2 Frequência relativa (%) de ocorrência das categorias comportamentais registradas em *P. geoffroanus*

Para cada período de medição analisado, para a situação controle (sem intervenções no corpo) em normóxia. Valores apresentados com média. Fonte: Cordeiro, 2019

3.5.2 Respostas comportamentais a diferentes situações de disponibilidade de oxigênio

Os comportamentos foram agrupados em quatro categorias: *ativo* e *inativo*, *emerso* e *submerso* (Tabela 3). Dessa forma, oito padrões comportamentais foram classificados como *ativo* e dez como *inativo*, enquanto que cinco padrões comportamentais foram classificados como *emerso* e treze como *submerso* (Tabela 3). Essa classificação teve como objetivo avaliar se houve diferença estatística entre padrões comportamentais que podem estar diretamente relacionados às trocas gasosas, ao nível de atividade e tempo de submersão ao longo do tempo de filmagem. Os valores do período de medição entre 110 e 120 minutos foram excluídos da análise devido à perda de alguns arquivos de filmagem.

A alta variabilidade de tempo entre os indivíduos, tanto no tempo de atividade quanto no tempo de permanência emerso ou submerso, prevaleceu mesmo quando os mesmos foram submetidos aos diferentes tratamentos. Na maior parte do tempo, *P. geoffroanus* permaneceu em repouso e submerso (Figura 3.2).

Tabela 3.3 - Classificação dos padrões comportamentais de *P. geoffroanus* em categorias.

PADRÃO COMPORTAMENTAL	CATEGORIAS COMPORTAMENTAIS	
Deslocamento		
Nadar		
Nado vertical	Ativo	Submerso
Nado horizontal emerso	Ativo	Emerso
Nado horizontal submerso	Ativo	Submerso
Caminhar	Ativo	Submerso
Afundar	Inativo	Submerso
Escalar	Ativo	Submerso
Mergulho	Ativo	Submerso
Explorar	Ativo	Submerso
Repouso		
Repouso emerso		
Flutuar	Inativo	Emerso
Repouso na parede	Inativo	Emerso
Repouso em pé	Inativo	Emerso
Repouso sentado	Inativo	Emerso
Repouso submerso		
Flutuar	Inativo	Submerso
Repouso na parede	Inativo	Submerso
Repouso em pé	Inativo	Submerso
Repouso sentado	Inativo	Submerso
Repouso com plastrão no substrato	Inativo	Submerso
Tocar a cabeça	Ativo	Submerso

3.5.3 Tempo de atividade

O tempo de atividade de *P. geoffroanus* tendeu ao aumento ao longo do tempo quando ambiente esteve em situação de normóxia aquática e sem nenhum tipo de intervenção no corpo ($146,23 \pm 224,88$, para o início da filmagem; $224,35 \pm 212,01$, para o intervalo de 30 a 40 minutos; $266,66 \pm 179,80$, para o intervalo de 110 a 120 minutos; e $356,36 \pm 137,24$ minutos, para o final da filmagem). Ao contrário, quando os animais foram submetidos a um ambiente aquático hipóxico ($244,22 \pm 102,62$, para o início da filmagem; $186,24 \pm 81,29$, para o intervalo de 30 a 40 minutos; $178,21 \pm 161,25$, para o intervalo de 110 a 120 minutos; e $66,81 \pm 160,40$ minutos, para o final da filmagem) e anóxico ($350,89 \pm 190,52$, para o início da filmagem; $375,69 \pm 116,80$, para o intervalo de 30 a 40 minutos; $366,97 \pm 162,94$, para o intervalo de 110 a 120 minutos; e $290,24 \pm 170,82$ minutos, para o final da filmagem), se tornaram menos ativos.

A análise estatística mostrou que as misturas de gases ($P < 0,05$) e os períodos de medição ($P < 0,01$) tiveram efeito sobre o tempo de atividade de *P. geoffroanus*. Ou seja, com a diminuição do O_2 aquático, os animais se tornaram menos ativos, enquanto que à medida que os animais mais permaneciam mais tempo no aquário, diminuiu o tempo de atividade, exceto quando os animais não tinham nenhuma parte do corpo isolada e o aquário era oxigenado com ar ambiente. Além disso, a interação entre as misturas de gases e intervenções do corpo ($P < 0,001$) e a interação entre as misturas de gases e os períodos de medição ($P < 0,001$) também foram estatisticamente significativas. Nesse caso, as misturas de gases potencializaram o efeito de intervenções do corpo e períodos de medição, levando a um menor nível de atividade *P. geoffroanus*.

Todas as diferenças entre as combinações de tratamentos que foram significativas para o tempo de atividade apresentadas na Tabela 4. O período de medição foi o fator mais influente sobre o tempo de atividade.

3.5.4 Tempo submerso

O tempo submerso de *P. geoffroanus* seguiu a mesma tendência para todos os tratamentos, mantendo-se mais ou menos estável ao longo do tempo e dos tratamentos. Os períodos de medição se mostraram estatisticamente diferentes ($P < 0,001$), ao longo do tempo de filmagem *P. geoffroanus* diminuiu o tempo submerso. A interação entre misturas de gases e intervenções no corpo ($P < 0,01$) também foram estatisticamente significativas, o que levou a uma diminuição do tempo submerso conforme os animais eram submetidos a menores concentrações de oxigênio aquático.

Todas as diferenças entre as combinações de tratamentos que foram significativas para o tempo de atividade apresentadas na Tabela 4. *P. geoffroanus* acessou mais a superfície quando os indivíduos não tinham intervenções no corpo ou quando estava com cloaca ou a pele isolada.

Tabela 3.4 Diferenças estatísticas para o tempo de atividade de *P. geoffroanus*, considerando as diferentes combinações de tratamentos.

Valores $P < 0,05$ para diferenças entre misturas de gases, período de medição, intervenções do corpo e a interação entre os fatores.

Mistura de gases	Intervenções do corpo	Período de medição	Mistura de gases	Intervenções do corpo	Período de medição	Valor de P
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Normóxia	Cabeça	60' – 70'	0,02
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Normóxia	Cabeça + cloaca	0' – 10'	Anóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	0,01
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Normóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	60' – 70'	0,01
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,01
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça	60' – 70'	0,02
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Pele	30' – 40'	0,02
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Pele	30' – 40'	0,04
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Normóxia	Controle	0' – 10'	0,04
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Normóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Anóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça	60' – 70'	0,02
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Normóxia	Cabeça	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Anóxia	Cabeça	60' – 70'	0,02
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça	60' – 70'	0,01
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Normóxia	Cabeça	60' – 70'	0,02
Anóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	0,02
Anóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	0,03
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Anóxia	Cabeça	60' – 70'	0,05
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	60' – 70'	0,02
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,03
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,03
Anóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	60' – 70'	0,04

Tabela 3.5 Diferenças estatísticas para o tempo submerso de *P. geoffroanus*, considerando as diferentes combinações de tratamentos. Valores $P < 0,05$ para diferenças entre misturas de gases, período de medição, intervenções do corpo e a interação entre os fatores.

Mistura de gases	Intervenções do corpo	Período de medição	Mistura de gases	Intervenções do corpo	Período de medição	Valor de P
Normóxia	Cabeça + Cloaca	30' – 40'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	< 0,01
Normóxia	Cabeça	60' – 70'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,02
Normóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,03
Normóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	< 0,01
Normóxia	Cabeça + Cloaca	30' – 40'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,04
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Hipóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Hipóxia	Cabeça	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	0,03
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	30' – 40'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	0,03
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Anóxia	Controle	30' – 40'	0,04
Hipóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,01
Hipóxia	Cabeça	60' – 70'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,02
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Normóxia	Cloaca	30' – 40'	0,02
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Normóxia	Cabeça	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Normóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Normóxia	Cabeça	60' – 70'	< 0,01
Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	Anóxia	Cabeça + Cloaca	60' – 70'	0,05
Anóxia	Cabeça	30' – 40'	Anóxia	Pele	60' – 70'	0,03
Anóxia	Cabeça	30' – 40'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	< 0,01
Anóxia	Cabeça + Cloaca	30' – 40'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	0,01
Anóxia	Cabeça + Cloaca	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	0,01
Anóxia	Cabeça	30' – 40'	Hipóxia	Pele	60' – 70'	0,02
Anóxia	Cabeça	0' – 10'	Hipóxia	Cloaca	30' – 40'	0,04

Figura 3.3 Tempos de atividade (A) e submerso (B) ao longo tempo (0' – 10', 30' – 40', 60' – 70', 110' – 120')

Quando *P. geoffroanus* foi exposto às diferentes concentrações de oxigênio aquático e submetido ao isolamento de diferentes partes do corpo. Os dados são apresentados como média e erro padrão. O erro padrão foi usado nesta figura para a visualização dos dados ser mais clara. Fonte: Cordeiro, 2019

O comportamento de “Tocar a cabeça” só foi registrado quando o animal foi submetido ao tratamento de intervenção na cabeça (cabeça ou cabeça + cloaca), na tentativa de tirar a bolsa de látex da cabeça. Esse comportamento se mostrou mais presente nos tempos iniciais de avaliação do comportamento de *P. geoffroanus*, tanto em normóxia quanto em hipóxia e anóxia ($P < 0,0001$) (Figura 3.4). Após trinta minutos com a cabeça isolada esse

comportamento já se tornou significativamente menos frequente ($P < 0,05$). A frequência desse comportamento não diferiu entre os tratamentos cabeça e cabeça e cloaca.

Figura 3.4 Frequência relativa (min-1) do padrão comportamental “Tocar a cabeça” de *P. geoffroanus*

Ao longo do tempo, exposto às diferentes concentrações de oxigênio aquático e submetido ao isolamento de diferentes partes do corpo. Os dados são apresentados com média e erro padrão. 1 indica diferenças estatísticas ao longo do tempo e em cada %O₂, quando os animais tiveram a cabeça isolada do ambiente. 2 indica diferenças estatísticas ao longo do tempo e em cada %O₂, quando os animais tiveram a cabeça e cloaca isolada do ambiente. Fonte: Cordeiro, 2019

3.6 DISCUSSÃO

As filmagens dos comportamentos subaquáticos foram realizadas em ambiente de laboratório, com os animais habituados ao aquário. O tamanho do aquário era compatível com o tamanho dos animais, que tinham espaço disponível para se deslocar em três dimensões. Foi observado que alguns animais, assim que eram introduzidos no aquário iam de encontro às paredes do local, mas esse comportamento se extinguiu ao longo do tempo das filmagens, levando a crer que os animais se localizaram dimensionalmente dentro do aquário e se acostumaram com o tamanho do mesmo.

O estudo comportamental em cativeiro apresenta vantagens e desvantagens para fazer inferências sobre a história natural de uma espécie no habitat natural em que esta espécie está inserida. Espécies como *P. geoffroanus* tem hábito de vida semi-aquático ou aquático e realizam parte das suas atividades diárias debaixo d'água. Muitos desses habitats oferecem dificuldades para o monitoramento dos comportamentos subaquáticos, devido às características do corpo d'água, como a turbidez e a profundidade, que podem dificultar a visualização do animal (CARPENTER; FERGUSON, 1977; ARAÚJO, 1996), necessárias para observações detalhadas. Portanto, as investigações de padrões comportamentais em laboratório são importantes para responder questões que possuem restrições metodológicas no campo, pois possibilitam uma melhor observação dos animais (MOLINA, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 2010).

Alguns cuidados foram tomados para a realização das observações *in situ* de *P. geoffroanus*. As filmagens foram realizadas entre a primavera e o verão e em período diurno, quando o nível de atividade dos animais é mais alto (MOLINA 1989, SOUZA 1999). Os animais foram filmados sozinhos e os comportamentos subaquáticos descritos neste trabalho se referem aos comportamentos sem considerar as relações intraespecíficas. Além disso, houve uma tentativa de se garantir que esses comportamentos não seriam descritos levando em consideração a relação entre intraespecíficos em razão da alta densidade de animais dentro do aquário, o que poderia alterar os padrões de exibição dos comportamentos. Os comportamentos foram identificados e descritos a partir da observação de filmagens feitas em ambiente fechado, com luz artificial, sem ruídos externos ou presença de observador.

Apesar desses cuidados e da relevância de se realizarem observações comportamentais em cativeiro, a observação das espécies em seus habitats permite identificar se os padrões comportamentais observados em cativeiro estão de acordo com o que é encontrado na natureza e, dessa forma, se os dados produzidos no laboratório permitem fazer extrapolações

(RUBY; NIBLICK, 1994). As tecnologias para ter acesso aos padrões de atividade de quelônios que habitam ambientes aquáticos estão cada vez mais acessíveis (*dataloggers*, telemetria, videografia na água e *softwares* de análise dos comportamentos) e minimizam erros como a sub- ou superestimativa da frequência de determinados comportamentos (GORDOS; FRANKLIN, 2002), mas ainda podem ser limitadas, pois muitas vezes não é possível obter um etograma completo a partir destes dados (PATEL *et al.*, 2016).

Este trabalho se propôs a construir um etograma dos comportamentos subaquáticos de *P. geoffroanus*, ainda não disponível na literatura. Dessa forma, podemos aperfeiçoar os conhecimentos sobre os padrões comportamentais da espécie, somando às descrições comportamentais de alimentação (MEDEM, 1960; MOLINA, 1990; FACHIN-TERAN *et al.*, 1995; MOLINA *et al.*, 1998; SOUZA; ABE, 2000), reprodução (MEDEM, 1960; GUIX *et al.*, 1989; MOLINA, 1989; MOLINA, 1996a; MOLINA, 1998; SOUZA; ABE, 2001), nidificação (MEDEM, 1960; GUIX *et al.*, 1989; MOLINA, 1989), agonísticas (MOLINA 1992b, 1996b) e padrões de atividade no ambiente terrestre (MOLINA, 1989; SOUZA, 1999; SOUZA; ABE, 2001).

O etograma é um inventário que descreve os comportamentos de uma espécie. A descrição desses comportamentos precisa ser feita da forma mais precisa possível, apresentando os movimentos e posturas que compõem cada comportamento, e deve ser compreensível ao leitor (CARPENTER; FERGUNSON, 1977; MARTIN; BATESON, 1993; LEHNER, 1996; ARAÚJO, 1996). Os comportamentos são descritos de modo a esclarecer as causas proximais, mas nem sempre é possível atribuir suas causas finais olhando somente para o comportamento (TINBERGEN, 1963). Por exemplo, identificar um comportamento como “respirar”, pelo fato do animal aquático ter exposto a cabeça no ambiente aéreo não é garantia que o animal estaria de fato respirando. Para se certificar a finalidade comportamental, seria necessário o uso de métodos aplicados da fisiologia da respiração.

Outra qualidade importante a um etograma é a sua padronização. Durante a confecção do etograma de *P. geoffroanus* a literatura já produzida foi consultada, na tentativa de identificar e compilar comportamentos que já haviam sido descritos e estavam presentes entre os padrões comportamentais observados neste trabalho. A preocupação com a padronização permite a comparação entre comportamentos observados entre as diferentes espécies e inferências ecológicas e evolutivas (MCFARLAND, 1987; LIU *et al.*, 2009). O etograma apresentado neste trabalho tenta manter a padronização de padrões comportamentais encontrados anteriormente em outras espécies de quelônios (RUBY; NIBLICK, 1994; LIU, *et al.*, 2009; SMART *et al.*, 2014).

Poucos trabalhos se propuseram a construção de etograma de quelônios. A busca bibliográfica desta tese encontrou somente sete trabalhos na literatura, sendo dois com etograma de jabutis (RUBY; NIBLICK, 1994; HAILEY; COULSON, 1999) e apenas um contemplou a confecção de um etograma para uma espécie de Pleurodira, *Podocnemis erythrocephala*, um cágado encontrado na Amazônia (SCHENEIDER *et al.*, 2010). Muitos dos comportamentos descritos neste trabalho foram encontrados nos demais etogramas. Mesmo quando esses comportamentos foram observados no ambiente terrestre, os movimentos apresentam pouca variação, e, dessa forma, podem ser usados para comparação entre as espécies.

O comportamento “Nadar” foi descrito em todos os trabalhos que investigaram cágados de água que habitam ambientes próximos a corpo d’água. Enquanto que este trabalho destrinchou o nado em relação à direção do movimento e se o animal estava com a cabeça dentro ou fora da água, Schneider e colaboradores (2010) subdividiram o nado levando em consideração o sentido do movimento e Araújo (1996) inseriu o comportamento na categoria “Locomoção na água”.

O “Caminhar” foi observado em todos os trabalhos, sendo que *P. geoffroanus* e *Mauremys leprosa* podem caminhar no fundo do corpo d’água, enquanto que as demais espécies foram observadas caminhando na terra. *Gopherus agassizii* foi descrito por realizar essa marcha em terra em diversas taxas de locomoção, desde o “Caminhar devagar” até o “Correr” (RUBY; NIBLICK, 1994). Carpenter e Ferguson também apresentam o comportamento de deslocamento em terra dividido dependente da mudança de sentido do deslocamento. Souza (1999) descreveu que *P. geoffroanus* pode se deslocar até 250 m/dia em ambiente aquático urbano. Esse valor está bem acima dos 35 metros documentados por Ruby e colaboradores (1994) para *Gopherus agassizii*. Essa diferença de taxa de deslocamento por dia pode estar relacionado com as restrições térmicas impostas à *G. agassizii* pelo ambiente de deserto (ZIMMERMAN *et al.*, 1994), enquanto que o clima ameno e o hábito de vida aquático de *P. geoffroanus* impõem menos limitações térmicas para a realização das atividades ao longo do dia. Mesmo assim, a taxa de deslocamento descrito no trabalho de Souza (1999) foi menor que para *Rhinemys rufipes*, que chega a se deslocar de 1 a 2 km no rio (MAGNUSSON *et al.*, 1997), possivelmente devido a alta disponibilidade de alimento para *P. geoffroanus*, que podem habitar locais com saída de esgoto doméstico, com elevada densidade de matéria orgânica.

O deslocamento realizado por escalamento também foi descrito em *Mauremys leprosa* (ARAÚJO, 1996) e *Sacalia quadriocellata* (LIU *et al.*, 2009). Esse comportamento está relacionado com habitat de vida desses animais, animais semi-aquáticos podem alcançar a

superfície nadando ou escalando o substrato até o ambiente terrestre. Dessa forma, encontramos o comportamento aqui descrito como “Escalar” como “Subida para a margem” em Araújo (1996).

“Explorar” é um comportamento que pode ser estereotipado entre os quelônios, visto que todas as espécies que tiveram esse comportamento descrito de alguma forma, muitas vezes fazendo uso de outras denominações, “Vigilância” (SCHENEIDER *et al.*, 2010), “Observar ao redor” (LIU *et al.*, 2009) e “Cheirar” (BURGHARDT *et al.*, 1996). *P. geoffroanus* apresentou o comportamento típico descrito em “Cheirar”, mas este foi incorporado ao padrão “Explorar”, retirando o sentido de causas finais ao comportamento. “Explorar” foi o padrão comportamental mais frequente em *P. geoffroanus* e *Vijayachelys silvatica* (SMART *et al.*, 2014) quando esses animais estavam ativos.

O repouso em quelônios também é bem documentado, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. A tartaruga do Nilo passa 17,4% do dia em repouso no tronco, valor que pode ter sido subestimado por não ser possível observar o animal em repouso no substrato embaixo d’água. Enquanto isso, *P. geoffroanus* e *Kinixys spekii* chegaram a permanecer quase 80% do tempo em repouso (HAILEY; COULSON, 1999). Este trabalho separou as posturas de repouso em “Repouso emerso” e “Repouso submerso” para as análises posteriores propostas. Outros autores (LIU *et al.*, 2009; SCHENEIDER *et al.*, 2010) também propuseram essa separação, incluindo em seus etogramas os padrões comportamentais “Emergir” e “Submergir”. Além disso, para *Sacalia quadriocellata* (LIU *et al.*, 2009), *Podocnemis erythrocephala* (SCHENEIDER *et al.*, 2010) e *Vijayachelys silvatica* (SMART *et al.*, 2014) foi descrito o comportamento “Dormir”. Esse comportamento não foi descrito para *P. geoffroanus* por dois motivos; a resolução do vídeo não foi suficiente para garantir que os olhos do animal estavam fechados e, as filmagens foram realizadas no período que *P. geoffroanus* estaria mais ativa.

Tanto no repouso emerso quanto no repouso submerso foi observado que *P. geoffroanus* tinha a habilidade de flutuar. Esse comportamento, quando o animal está com parte do corpo emerso se expondo ao sol, pode ser uma resposta para a termorregulação (MOLL; LEGLER, 1971; SPOTILA, 1984). Neste trabalho, a temperatura do ambiente se manteve constante e não era possível aos animais se expor ao sol. Logo, *P. geoffroanus* pode apresentar esse comportamento para ter acesso ao ar atmosférico para realizar as trocas gasosas aéreas sem o gasto energia para se locomover até a superfície. Outra hipótese também pode ter alguma relação com o controle da flutuabilidade, visto que quando os animais tiveram a cloaca isolada, alguns indivíduos aparentemente permaneceram a maior parte do tempo flutuando na

superfície ou corpo d'água, enquanto outros indivíduos passaram a maior parte do tempo em contato com o substrato.

O contato das patas dianteiras com a cabeça foi identificado como “Tocar a cabeça” em *P. geoffroanus* e só foi observado quando os animais tiveram a cabeça isolada com o preservativo. O movimento possivelmente ocorria numa tentativa de deixar a cabeça livre da bolsa de látex, sendo observada uma frequência maior desse comportamento nos primeiros minutos após o início das filmagens. O “*Grooming*” ou “autolimpeza”, como este padrão é chamado em outras espécies, pode ter o papel de limpeza, como descrito em *Chelodina spp.*, removendo a pele morta (LEGLER, 1978).

A partir dos padrões comportamentais listados neste trabalho, dois tipos de agrupamentos foram feitos, separando os comportamentos em ativos e inativos, emersos e submersos. Os padrões comportamentais observados para *P. geoffroanus* foram mais incluídos em inativos e submersos. A variabilidade dos resultados se manteve alta, observando-se indivíduos que permaneceram em repouso ao longo de toda a filmagem e indivíduos bem ativos, mesmo quando submetidos às mesmas combinações de tratamentos.

Embora o pico de atividade em *P. geoffroanus* ocorra durante o dia (MOLINA, 1989; SOUZA, 1999), o fato dos animais estarem sozinhos no aquário, em jejum e em um ambiente com temperatura constante pode ter influenciado na maior ocorrência de observações dos animais inativos. Algumas das atividades diárias executadas por espécies de quelônios observadas na natureza (GORDOS *et al.*, 2003) estão relacionadas com o contato com intraespecíficos, busca por alimento e termorregulação. Como um dos objetivos deste trabalho foi investigar as respostas comportamentais de *P. geoffroanus* aos diferentes níveis de oxigênio aquático, dependendo da parte do corpo que estava exposto a esse ambiente, a prevalência de comportamentos inativos é compreensível.

No que se refere ao predomínio dos comportamentos submersos, é possível justificá-los devido ao fato da plataforma que dava acesso à superfície ocupar aproximadamente um terço do tamanho do aquário e esta não ter uma região totalmente seca. O segundo motivo tem relação com a temperatura da água se manter constante ao longo das filmagens e, dessa forma, os animais não precisaram termorregular por meio de vias comportamentais, se expondo ao ar atmosférico, por exemplo.

Os resultados sugerem que *P. geoffroanus* não realiza respiração bimodal. Sem intervenções no corpo, os animais ficaram mais ativos ao longo do tempo em normóxia e menos ativo em hipóxia e anóxia. O aumento da atividade em normóxia pode estar atrelado ao período de aclimação do animal ao aquário, após passar por um período de *freezing* (RUBY; NIBLICK,

1994). O comportamento de *freezing* pode ser definido como um comportamento de defesa, no qual o animal demora a reagir a determinado estressor, no caso deste trabalho o estresse o ambiente do aquário (KOOLHAAS *et al.*, 1999).

No caso da diminuição do nível de atividade em hipóxia e anóxia, se *P. geoffroanus* tivesse habilidade de realizar trocas gasosas em quantidades consideráveis com o ambiente aquático, era esperado que a diminuição do oxigênio aquático demandasse ao animal mais idas à superfície, ou a sua permanência nela, o que não foi observado. A diminuição do nível de atividade pode ser uma consequência da diminuição do nível de oxigênio aéreo, já que não havia uma barreira que separasse o ar atmosférico da água e a injeção de nitrogênio na água pode ter causado alguma modificação do nível de saturação do oxigênio atmosférico, que não foi quantificado. Fisiologicamente, essa diminuição do nível de atividade pode implicar na diminuição da demanda de energia, o que diminui a necessidade de consumo de oxigênio e, consequentemente, sua taxa metabólica (GATTEN 1974, 1978; STOCKARD; GATTEN 1983; BAGATTO; HENRY 1999b).

A permanência submersa de espécies aquáticas, ou mergulho, é caracterizada pela intermitência da ventilação aérea, comportamento de nado para se afastar da superfície e mudança da pressão hidrostática (KOOYMAN, 1989). Quelônios aquáticos quebram uma dessas premissas, já que podem alcançar o fundo do corpo d'água sem gasto de energia, afundando, e se manter lá por longos períodos em repouso (HOCHSCHEID, 2014). Esses animais são capazes de mudar o volume dos pulmões e o volume de água armazenada nas bolsas cloacais, de modo a corrigir sua gravidade específica mantendo o volume corporal (JACKSON, 1969; MINAMIKAWA *et al.*, 2000).

O nível de atividade pode estar diretamente relacionado com o tempo de submersão em quelônios. Gordos e colaboradores (2007) observaram que *Elseya albagula* diminuía a prevalência de tempo submerso devido ao aumento da atividade.

Quando quelônios aquáticos foram expostos a diferentes níveis de oxigênio na água, dois diferentes padrões foram observados. Espécies que tem alto grau de participação da respiração bimodal para atender à demanda de oxigênio, apresentam respostas comportamentais quando há mudanças nas concentrações de O₂ aquático, enquanto que em espécies que tem menor nível de captação de oxigênio por vias aquáticas, as mudanças comportamentais devido às mudanças de O₂ aquático não são tão importantes (PRIEST; FRANKLIN, 2002). *P. geoffroanus* não apresentou uma correlação entre PO₂ aquático e duração do mergulho, diferente do que foi observado em *Emydura macquarii* e *Sternoterus odoratus* (BELKIN, 1968; ULTSCH *et al.*, 1984; ULTSCH, 1985; STONE *et al.*, 1992b), espécies que apresentam

respiração bimodal. Nesses respiradores aquáticos, há uma menor dependência do oxigênio atmosférico quando a água está bem oxigenada (STONE *et al.*, 1992b; BAGATTO; HENRY, 1999), devido ao grau de eficiência das trocas gasosas aquáticas (Gordos; Franklin, 2002), porém quando o aumento dos níveis de atividade demanda um aumento do consumo de oxigênio, a respiração aérea é requisitada (STOCKARD; GATTEN, 1983; BUTLER, MILSOM; WOAKES, 1984; BAGATTO; HENRY, 1999a).

As repostas comportamentais de *P. geoffroanus* neste trabalho estão de acordo com os resultados encontrados para *Chelus fimbriata* (LEFANT *et al.*, 1970) e *Trachemys dorbigni* (SANTOS *et al.*, 1990), espécies que apresentam baixa dependência dos níveis de oxigênio aquático. Nessas espécies, o aumento no tempo de mergulho está relacionado à redução do metabolismo no inverno, enquanto que *P. geoffroanus* registrou tempos de mergulho superiores mesmo com os experimentos sendo realizados a 25° C.

Mesmo quando *P. geoffroanus* teve a cabeça isolada do meio aquático, simulando uma condição de submersão forçada, não houve diferença no tempo de mergulho entre os ambientes aquáticos em normóxia, hipóxia e anóxia. Em quelônios bimodais, a submersão forçada pode ser suportada por mais tempo, porém não reflete uma resposta comportamental natural, e sim uma resposta comportamental superestimada para uma condição fisiológica artificial (GRAHAM 1974; KOOYMAN *et al.* 1980; SEYMOUR 1982; GATTEN 1984; MCCULLOCH; JONES 1990). A ocorrência de longos períodos sem acesso à superfície atmosférica em *P. geoffroanus* pode ser uma consequência da baixa taxa metabólica da espécie (CORDEIRO *et al.*, 2016), que reduz os níveis de atividade e necessidade de emergir até a superfície.

Tartarugas marinhas também podem reduzir os níveis de atividade e permanecer mais tempo submersas, economizando energia em locais com menos disponibilidade de alimento (HAYS *et al.*, 2000; PETITET; MEURER, 2007). Os nichos ecológicos que espécies de quelônios ocupam também podem refletir na taxa metabólica dos animais e na sua capacidade de absorver oxigênio aquático. *Emydura macquarii* tem uma limitada habilidade de obter oxigênio aquático (PRIEST; FRANKLIN, 2002). Essa espécie é generalista, sendo capaz de habitar regiões mais profundas dos grandes poços d'água e represas, locais onde frequentemente a água é anóxica. *P. geoffroanus* também é uma espécie com ampla distribuição geográfica e generalista (VAN DIJK *et al.*, 2012) podendo habitar ambientes altamente poluídos que geralmente se tornam anóxicos (SOUZA; ABE, 2001). Seguindo o mesmo raciocínio, para ambas as espécies não existem vantagens em se realizar respiração aquática.

A permanência irrestrita de *P. geoffroanus* debaixo d'água por longos períodos parece ser uma consequência da tolerância da espécie à anóxia. Crocker e colaboradores (1999) elencaram duas hipóteses para a evolução da tolerância à anóxia em quelônios. A primeira hipótese explica a tolerância à anóxia como uma adaptação aos longos invernos e os períodos de hibernação, observados em algumas espécies de ambientes temperados. Essa hipótese não incluiria *P. geoffroanus*, uma espécie que ocupa ambientes tropicais. A segunda hipótese parece ser mais inclusiva, explicando que a tolerância à anóxia é uma característica provinda desde o Triássico e Jurássico e que linhagens de quelônios aquáticos daquela época, que deram origens a famílias encontradas hoje, estavam expostas a ambientes aquáticos hipóxicos e anóxicos, devido à alta densidade da vegetação e alta demanda oxidativa biológica, e do baixo teor de oxigênio atmosférico, que supostamente estava em torno de 15% (HSIA et al, 2013). Essa hipótese parece explicar uma possível tolerância de *P. geoffroanus* à hipóxia e anóxia aquática e, porque as repostas comportamentais da espécie não dependeram do nível de oxigênio aquático e das diferentes partes do corpo que foram isoladas.

4. CAPÍTULO 4 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DE TECIDOS COM POTENCIAL DE TROCAS GASOSAS EM *PHRYNOPS GEOFFROANUS*

4.1 RESUMO

Espécies de quelônios capazes de realizar respiração bimodal trocam gases através dos pulmões e estruturas extrapulmonares. Na ausência de oxigênio atmosférico, esses animais podem recorrer a diferentes estratégias, como a captura de oxigênio dissolvido do ambiente aquático. Verificou-se que a respiração aquática ocorre em Testudines através da pele, epitélios da cavidade bucofaringeal e através das bolsas cloacais. A investigação morfológica das estruturas que realizam trocas gasosas é importante para inferir a fisiologia dessas funções. *P. geoffroanus* apresenta um par de bolsas cloacais, anexas à cloaca, que ainda não são bem conhecidos. Esta espécie apresenta os menores valores de consumo atmosférico de oxigênio entre as tartarugas, sugerindo que esta espécie poderia realizar trocas gasosas aquáticas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise qualitativa e quantitativa dos prováveis trocadores extrapulmonares de gases em *P. geoffroanus*. Foi realizada uma análise macroscópica e microscópica qualitativa da pele de *P. geoffroanus*, epitélio bucofaringeal, pulmões e bolsas cloacais, seguida de uma análise estereológica. Avaliando a morfologia da pele e o epitélio bucofaringeal, observou-se que essas estruturas não atendem a todos os critérios de um trocador extrapulmonar. Como as bolsas cloacais apresentaram uma quantidade maior de vasos sanguíneos na base da camada epitélio pseudoestratificada, as trocas gasosas parecem possíveis nessa estrutura. No entanto, análises estereológicas mostraram que, quando comparadas aos pulmões, a densidade de volume dos vasos sanguíneos e a área de superfície para a relação de troca gasosa das bolsas cloacais são significativamente menores. As diferenças morfométricas entre os pulmões e as bolsas cloacais de *P. geoffroanus* não descartaram a função de troca gasosa na espécie, mas mostram que as bolsas cloacais não são a principal fonte de oxigênio para esses animais e que a respiração aérea ainda é a via mais importante para trocas gasosas.

4.2 ABSTRACT

Chelonian species able to perform bimodal respiration exchange gases through the lungs and extrapulmonary structures. In the absence of atmospheric oxygen, these animals may resort to different strategies, such as the capture of dissolved oxygen from the aquatic environment. Aquatic breathing has been found to occur in Testudines through the skin, epithelia of the buccopharyngeal cavity, and through cloacal bursae. The morphological investigation of the structures that perform gas exchange is important to infer the physiology of these functions. *P. geoffroanus* presents a pair of cloacal bursae attached to the cloaca that is not yet well understood. This species shows the lowest atmospheric oxygen consumption values between turtles, suggesting that this species could perform aquatic gas exchange. Therefore, the purpose of this work was to perform a qualitative and quantitative analysis of the probable gas trace trackers in *P. geoffroanus*. A qualitative macroscopic and microscopic analysis of *P. geoffroanus* skin, buccopharyngeal epithelium, lungs and cloacal bursae was performed, followed by a stereological analysis. Assessing the morphology of the skin and the buccopharyngeal epithelium, it was observed that these structures do not meet all criteria of an extrapulmonary gas exchanger. Since cloacal bursae presented a larger amount of blood vessels at the base of pseudostratified epithelium layer, gas exchange seems possible in this structure. However, stereological analysis showed that, when compared to the lungs, blood vessel volume density and surface area to cloacal bursae gas exchange ratio are significantly lower. The morphometric differences between the lungs and cloacal bursae of *P. geoffroanus* did not rule out the gas exchange function in the species, but show that cloacal pockets are not the main source of oxygen for these animals and that air respiration is still the most important pathway for gas exchange.

4.3 INTRODUÇÃO

Testudines possuem pulmões estruturalmente complexos, multicamerais e subdivididos em inúmeras câmaras que aumentam a superfície de trocas gasosas (DUNCKER, 2004; LAMBERTZ, 2010). Esses pulmões podem ser preenchidos por parênquima trabecular, edicular e faveolar, tornando esses pulmões heterogêneos, com maior densidade de tecido para trocas respiratórias localizado na região cranial dos pulmões e reduzindo essa densidade em direção da região caudal (DUNCKER, 1981; LUTCAGE *et al.*, 1989; PERRY, 1998). Essas características parecem ter permitido que os animais com esse tipo de pulmão respondessem com maior eficiência à demanda energética (DUNCKER, 2004). Também há a presença de mesopneumônios ventral e dorsal e do septo pós-pulmonar (SPP), estruturas que auxiliam na estabilização intracelômica dos pulmões (KLEIN *et al.*, 2000; LAMBERTZ *et al.*, 2010; LYSON *et al.*, 2014).

Quelônios aquáticos podem permanecer longos períodos submersos, sem acesso ao oxigênio atmosférico (GATTEN, 1984). Na ausência de disponibilidade do oxigênio atmosférico, esses animais podem recorrer a diferentes estratégias para manter o metabolismo basal, como a redução da taxa metabólica, ou sua manutenção por meio do metabolismo anaeróbico ou pela captação de oxigênio dissolvido no ambiente aquático (BAGATTO; HENRY, 2000; REESE *et al.*, 2001; HICKS; WANG, 2004). A literatura tem mostrado que muitas espécies de quelônios aquáticos podem realizar trocas gasosas por meio de superfícies extrapulmonares (BELKIN, 1968; WARD, 1970; LEGLER, 1993b; KING; HEATWOLE, 1994a).

Para que um epitélio tenha função de transporte de gases, algumas propriedades devem ser observadas: grande área superficial de contato com o meio externo contendo extensa rede de capilares, superfície úmida, pequena distância de difusão, e grande gradiente de concentração de gás (PIIPER; SCHEID, 1982; CRUZ *et al.*, 2009). Essas propriedades propiciam que o sangue e o meio onde está contido oxigênio mantenham contato constante para uma rápida absorção do gás pelo organismo (WEIBEL, 1984). As estruturas já identificadas em quelônios que podem ser locais para a ocorrência de respiração bimodal são a pele, o epitélio bucofaringeal e o epitélio da cloaca ou das bolsas cloacais (GAGE; GAGE, 1886; WANG *et al.*, 1989; STONE *et al.*, 1992a; KING; HEATWOLE, 1994; GORDOS; FRANKLIN, 2002; JACKSON *et al.*, 2004).

As trocas gasosas extrapulmonares foram investigadas tanto entre os Cryptodira quanto entre os Pleurodira. Entre os Cryptodira foi observado que as principais vias de trocas gasosas são a pele e a cavidade bucofaringeal. A pele é a estrutura responsável pela maior parte das trocas

gasosas aquáticas na família Emydidae (CROCKER *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2004), Trionychidae (STONE *et al.*, 1992a; BAGATTO; HENRY, 1999) e Kinosternidae (BAGATTO *et al.*, 1997; BAGATTO; HENRY, 2000). A cavidade bucofaringeal é a via acessória de trocas gasosas de outra espécie de Trionychidae, *Trionyx sinensis* (WANG *et al.*, 1999). Dentre as famílias pertencentes à subordem Pleurodira, somente a família Chelidae foi objeto de estudo para a capacidade de trocas gasosas extrapulmonares, podendo ocorrer na cavidade bucofaringeal ou nas bolsas cloacais (LEAGLER; CANN, 1980; LEGLER; GEORGES, 1993; KING; HEATWOLE, 1994; PRIEST, 1997; GORDOS; FRANKLIN, 2002). As trocas gasosas com ambiente aquático podem variar de 10 a 70% do total do oxigênio consumido, valores observados em *Emydura signata* (PRIEST, 1997; PRIEST; FRANKLIN, 2002) e *Rheodytes leukops*, respectivamente (PRIEST, 1997; GORDOS *et al.*, 2003).

A pele talvez seja o maior órgão que mantenha contato direto com o meio aquático. Em *Elseya latisternum* (KING; HEATWOLE, 1994) foram identificadas regiões irrigadas por capilares na superfície da pele dos membros. Porém, ao contrário do que Stone e colaboradores hipotetizaram (1992a), *Staurotypus triporcatus*, um quelônio com grande superfície cutânea massa-específica, não apresentou diferenças nas taxas de trocas gasosas aquáticas quando comparado com *Kinosternum leucostomum* (BAGATTO *et al.*, 1997). A absorção de O₂ e eliminação de CO₂ por processo passivo, por meio da pele, também já foi observada em *Sternotherus odoratus* (ROOT, 1949), *S. minor* (BELKIN, 1968) e *Trionyx triunguis* (GIRGIS, 1961).

Movimento bucofaringeal resultando em fluxo de água pela cavidade bucal já foi referido por diferentes autores (GAGE; GAGE, 1886; DUNSON, 1960; GIRGIS, 1961; WANG *et al.*, 1989). *Trionyx sinensis* apresentou diferenças dos ritmos dos movimentos bucofaringeais ao longo do ano, resultando numa taxa de captação de O₂ de 2/3 do total do oxigênio que foi absorvido do meio aquático pela espécie (WANG *et al.*, 1989). King e Heatwole (1994a, b) identificaram a participação da cavidade bucofaringeal na absorção de oxigênio aquático em *Elseya latisternum* e explicaram que a especialização dessa estrutura para trocas gasosas pode ter sido uma adaptação para a perda das bolsas cloacais, como ocorreu em famílias com Trionychidae e Carettochelydidae (SMITH; JAMES, 1958).

A bomba bucal e a bomba cloacal observado em inúmeros quelônios são uma forma ativa de fornecer O₂ às superfícies que vão realizar as trocas gasosas. Espécies como *Chelydra serpentina* (BAGATTO; HENRY, 1999), *Sternotherus minor* (BELKIN, 1968), *Trachemys scripta* (BELKIN, 1968), *Platysternon megacephalum* (DRUZISKY; BRAINERD, 2001),

Trionyx sinensis (WANG *et al.*, 1989), *Apolone spinifera aspera* (DUNSON, 1960) e *Elseya latisternum* (KING; HEATWOLE, 1994) realizam a bomba bucal durante a submersão, enquanto que na espécie *Rheodytes leukops* (LEGLER; CANN, 1980) foi observado a bomba cloacal.

As bolsas cloacais são um par de apêndices da cloaca que pode ser altamente vascularizadas e usadas para as trocas gasosas no ambiente aquático (PETERS, 1964; LEGLER, 1993B; KING; HEATWOLE, 1994). A presença dessa estrutura foi registrada pela primeira vez na literatura por Perrault, em 1733, em *Testudo elegans* (KING; HEATWOLE, 1994). Após essa publicação, diversos outros trabalhos apontaram a presença ou ausência desse órgão (Bojanus, 1821), e ainda a descrição do mesmo em diversas espécies (NOBLE; NOBLE, 1940; ASHLEY, 1955; NIELSEN, 1983; MALLMAN-FRANCO, 2002).

Essas estruturas são encontradas somente em Testudines, porém não sendo observadas em quelônios terrestres (LE SUEUR, 1839; ANDERSON, 1876; PIKCEL, 1899; SMITH; JAMES, 1958; LEGLER; CANN, 1980). Gage e Gage (1886), Gadow (1901), Babák (1921), Noble e Noble (1940), e Jacobs (1942) inferiram que uma das funções das bolsas cloacais seria a respiração bimodal por meio da captação de água para o seu interior de forma ativa, com ventilação rítmica, quando Lüdicke (1936), não encontrou evidências de uma função respiratória das bolsas cloacais em *Emys orbicularis*.

Espécies que captam oxigênio por meio das bolsas cloacais desenvolveram um epitélio altamente vascularizado que possui mucosa com área aumentada através da presença de papilas que podem ramificar para o interior do órgão (LEGLER; GEORGES, 1993; MALLMANN-FRANCO, 2002). Em *Elseya latisternum* (KING; HEATWOLE, 1994) foram identificadas regiões irrigadas por capilares na superfície da pele dos membros, além de confirmada a presença da bolsa cloacal, enquanto que em *R. leukops* as bolsas cloacais foram descritas como sendo altamente vascularizados e com papilas multiramificadas (LEGLER; CANN, 1980; LEGLER; GEORGES, 1993), que cumprem a função de absorção de oxigênio nesses animais quando os mesmos estão submersos (PRIEST, 1997; PRIEST; FRANKLIN, 2002).

Além da função respiratória, as bolsas cloacais poderiam desempenhar papel importante na estocagem de água para a umidificação de substrato no momento da nidificação, no controle da flutuabilidade e nas trocas iônicas (SMITH; JAMES, 1958; DUNSON, 1967; TROBEC; STANLEY, 1971; MLYNARSKI; WERMUTH, 1975; CHESSMAN, 1984; JEFFREE; JONES, 1992; LEGLER, 1993b; JORGENSEN, 1998). Jorgensen (1998) comentou que essas diferentes funções podem inclusive serem exercidas concomitantemente.

A investigação morfológica das estruturas que poderiam realizar trocas gasosas é importante para se inferir sobre a fisiologia que envolve essas funções. Mas esses estudos devem estar atrelados aos resultados encontrados nas investigações fisiológicas, para compreender melhor a relação entre forma e função. O sistema respiratório é um ótimo exemplo desse tipo de relação. Liem (1988) considerou que a eficiência do sistema respiratório depende de propriedades estruturais e funcionais, as quais não podem ser dissociadas. Os diferentes aspectos morfológicos e fisiológicos do sistema respiratório de um determinado organismo vão determinar o custo metabólico associado à respiração, ou seja, o quanto de energia é gasto por esse animal para se realizar as trocas gasosas através dos pulmões (KINNEY; WHITE, 1977; JACKSON *et al.*, 1991; WANG; WARBURTON, 1995; SKOVGAARD; WANG, 2004; PEIXOTO *et al.*, 2015).

A morfometria representa uma abordagem que pode ser empregada para entender questões morfofuncionais das estruturas (CRUZ *et al.*, 2009), permitindo mensurar parâmetros como diferenças regionais dentro de uma mesma estrutura, diferença entre diferentes estruturas e ainda diferenças de uma mesma estrutura entre diferentes espécies (PERRY, 1972). Métodos morfométricos devem estar em consonância com métodos de morfologia descritiva para elucidar questões como a presença das propriedades para as trocas gasosas em quelônios aquáticos, como *P. geoffroanus*.

P. geoffroanus apresentaram os menores valores de consumo de oxigênio atmosférico, sugerindo de que essa espécie poderia realizar trocas gasosas aquáticas (CORDEIRO *et al.*, 2016). Logo, a proposta deste trabalho foi realizar uma análise qualitativa e quantitativa dos prováveis sítios de trocas gasosas em *P. geoffroanus*.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Animais

Espécimes de *P. geoffroanus* (N = 5) foram cedidos pelo Bosque Zoológico Fábio Barreto, em Ribeirão Preto (Autorização para transferência n° 3580423 – GEFAU/SP). Os animais foram transportados até o Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo) e foram mantidos no Biotério de Tetrápodes Silvestres. Todos os indivíduos eram adultos, de ambos os sexos. Durante o período de aclimação os animais foram condicionados em caixas de polietileno (69 x 51,5 x 39 cm) inclinadas com água, permanecendo duas áreas, alagada e seca, por onde os animais poderiam circular. O fotoperíodo da sala acompanhava o regime de dia e noite de Ribeirão Preto. A temperatura da sala era mantida em 25 ± 1 °C. A alimentação foi fornecida pelo menos 2 vezes por semana, composta por ração para peixe. A água foi fornecida *ad libitum*.

Coleta de material e medidas macroscópicas

O material analisado neste trabalho foi coletado de animais que participaram da coleta de dados fisiológicos. Para isso, ao final dos experimentos os animais foram anestesiados com sobredose de pentobarbital sódico (150 mg.kg⁻¹, IM). A coleta do material biológico se iniciou após a confirmação da morte do animal, atestada pela ausência de reflexos nos membros, região ocular e bucal.

Alguns espécimes (N = 3) foram fixados com formalina Millonig modificada. Para garantir que as estruturas investigadas não colapsassem, a formalina foi injetada dentro dos pulmões, a uma pressão de 10 cmH₂O do fixador, bem como na entrada da cloaca, com a intenção de preencher as bolsas cloacais. Foi injetado fixador no restante do animal e o mesmo foi guardado em temperatura ambiente para coleta do material após doze horas.

No dia seguinte, foram coletados fragmentos de tecido da região inguinal ou axial da pele e do palato mole e palato duro da cavidade bucofaringeal. Em seguida, as regiões de conexão entre o plastrão e a carapaça foram serradas para expor as vísceras. Após a exposição das vísceras de *P. geoffroanus*, o sistema digestório foi deslocado e desconectado do restante das vísceras. As origens do septo pós-pulmonar e dos mesopneumonia nos pulmões foram registradas com fotos e desenhos.

Após esses registros, seguiu-se a dissecação e retirada dos pulmões e bolsas cloacais. As medidas morfométricas foram tomadas para os pulmões e bolsas cloacais e incluíram massa dos pulmões (M_{SR}), massa dos pulmões esquerdo (M_{Pesq}) e direito (M_{Pdir}), comprimento do

Figura 4.1 Aplicação do Método de Cavalieri no pulmão de *P. geoffroanus*

Fonte: Cordeiro, 2019

sistema respiratório (C_{SR}), massa das bolsas cloacais (M_{BC}), comprimento das bolsas cloacais esquerda (C_{BCesq}) e direita (C_{BCdir}) e o volume de referências dos pulmões (V_{RefP}) e das bolsas cloacais (V_{RefBC}).

Os volumes de referência dos pulmões e bolsas cloacais foram obtidos por meio do método de Cavalieri (CRUZ-ORIVE; WEIBEL, 1990). A partir dos C_{esq} e C_{dir} foi calculado o tamanho dos 10 cortes transversais que foram feitos em cada estrutura a ser analisada. O corte se iniciou a partir de uma das extremidades dos pulmões ou bolsas cloacais. As secções transversais foram postas em posição anteroposterior e um sistema teste, cuja área dos pontos era conhecida, foi sobreposto para a quantificação dos pontos que estavam sobre o parênquima e o lúmen (Figura 4.1).

O V_{Ref} dos pulmões e bolsas cloacais foi calculado a partir de:

Equação 4-1

$$V = T \frac{a}{p} \sum_{i=1}^n P_i$$

onde, “T” é a distância entre os cortes, “a/p” é a área relativa a um ponto e “Pi” é o número de pontos sobre o parênquima e lúmen. A partir desse cálculo foi possível também calcular o volume de referência do parênquima separadamente. O volume do parênquima foi mensurado a partir da razão entre os pontos que estava sobre o parênquima e os pontos sobre a área de referência (parênquima + lúmen). O volume de referência e o volume do parênquima foram

padronizados pela massa corpórea do animal e foi estabelecida a proporção entre volume do parênquima e o volume de referência.

Subsequente à determinação do V_{Ref} , foram determinadas as regiões pré-hilar; região cranial anterior a abertura do brônquio intrapulmonar, cranial; região onde estão localizadas as subdivisões internas dos pulmões, e caudal; região final dos pulmões após a última subdivisão interna dos pulmões, dos pulmões e as regiões do ápice; primeira secção cranial, corpo; região mais extensa, e cólo; região onde ocorre afunilamento da estrutura e sua inserção na cloaca, das bolsas cloacais. Essas regiões foram utilizadas para as análises estereológicas, para analisar se havia diferenças dos parâmetros investigados entre elas. Para as análises qualitativas e quantitativas, foram coletadas amostras das regiões pré-determinadas dos pulmões e bolsas cloacais.

4.4.2 Análises morfológicas

4.4.2.1 *Estereomicroscopia*

Em alguns espécimes ($N = 2$) o sistema respiratório e as bolsas cloacais foram retirados e secados separadamente, aplicando-se um fluxo de ar constante, para posterior análise. A descrição anatômica macroscópica externa e interna do sistema respiratório e das bolsas cloacais foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (Olympus VMT4X). Entre os parâmetros observados foram: (as)simetria entre os lados esquerdo e direito, forma, configuração dos vasos sanguíneos e distribuição do parênquima.

4.4.3 Processamento das amostras

4.4.3.1 *Microscopia de luz*

Os fragmentos foram armazenados em temperatura ambiente em álcool 70% até o momento do processamento. O material passou pelo vácuo para a retirada de possíveis bolhas. A etapa seguinte foi a passagem do material por baterias de desidratação (séries crescentes de etanol 70, 80, 90 e 100%) e diafanização (primeira passagem na proporção 1:1 de etanol e xilol, e as outras passagens com xilol puro) progressivas e em intervalos de tempo de uma hora. Após essa etapa, o material foi incluído em parafina. Após o emblocamento do tecido, o mesmo estava pronto para ser cortado no micrótomo.

O tamanho do bloco foi ajustado ao micrótomo com o auxílio de uma faca ou colando-se o bloco de parafina a um bloco de madeira (com parafina líquida). O bloco foi cortado até aparecer o início do tecido. A partir desse momento, foram feitos cortes de 5 μm . As fitas de parafinas foram colocadas em banho Maria para promover o seu estiramento. Após o estiramento, os cortes foram separados e postos sobre lâminas de vidro que foram

previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80%, secas e identificadas. Para fixar o corte na lâmina, uma fina camada de albumina foi colocada sobre a lâmina antes da adição do tecido. Os cortes aderidos a lamina foram, então, colocados para secar na beira do banho maria e em seguida transferidos para uma estufa (56 °C) por 24h para remover o excesso de parafina.

As etapas seguintes são a desparafinização e coloração das lâminas. Durante a desparafinização os cortes passaram por sucessivos banhos de xilol, álcool em diferentes concentrações e água (destilada e/ou de torneira). A coloração escolhida para esses cortes foi hematoxilina-eosina (HE). A última etapa para a preparação das lâminas foi a passagem por baterias de desidratação e diafanização. A montagem das lâminas terminou com a colocação da lamínula. Pingou-se duas gotas de Entelan e em seguida colocou-se a lamínula, tomando-se cuidado para bolhas de ar não serem aprisionadas.

4.4.3.2 *Microscopia eletrônica de transmissão*

Para a microscopia eletrônica os fragmentados coletados tinham tamanho máximo de 3 mm². O material foi armazenado em temperatura de 4 a 8 °C em Eppendorfs com formalina Millionig modificada até o momento do processamento, não ultrapassando um mês de armazenamento. O processamento se iniciou com a lavagem do material no mesmo tampão e a pós-fixação na solução composta por tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM com tampão. Após mais uma lavagem com tampão, o material passa por uma bateria de banhos de desidratação (séries crescentes de acetona 30, 50, 70, 90%) e em seguida passa pela substituição, com uma mistura de 1:1 de acetona 100% e resina por pelo menos seis horas em temperatura ambiente. Após esse tempo, o tecido é impregnado com resina pura com catalisador por seis a oito horas em temperatura ambiente. Por último, o material impregnado é identificado e emblocado e polimerizado em estufa (60 °C) por três dias.

Após o processamento foi preciso aparar as arestas do bloco para ser levado ao microscópio eletrônico. Para isso, é feito um corte semi fino (1 µm) para uma pré-visualização em microscópio de luz. Esses cortes foram corado com azul de toluidina 1% pH. Após a escolha das melhores áreas para se visualizar no microscópio eletrônico, o bloco foi aparado, foram feitos cortes ultrafinos (0,5 µm) e esses cortes foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A partir desse momento, os cortes estavam prontos para serem analisados.

4.4.4 Análises qualitativas

Os cortes dos tecidos preparados foram visualizados e registrados em microscópio de luz e eletrônico em diferentes aumentos. Foram realizadas descrições qualitativas, com atenção especial à configuração estrutural dos tecidos, observação das camadas de células e os tipos celulares, a quantidade de vasos sanguíneos e a sua profundidade em relação à luz do tecido e diferenças ultraestruturais entre os diferentes tecidos analisados.

4.4.5 Análises quantitativas – Estereologia

Os dados analisados seguiram os trabalhos de Perry (1978), Orive e Weibel (1990), e Howard e Reed (2005). O uso dos métodos estereológicos permitiu uma análise quantitativa, inferindo por meio de imagens em duas dimensões, resultados que podem ser analisados em três dimensões. Após uma análise prévia, decidiu-se por analisar imagens da microscopia de luz dos pulmões e bolsas cloacais, com a finalidade de quantificar a compartimentação tecidual por meio do cálculo da fração de volume, densidade de superfície e fração da superfície, além do cálculo da massa total e específica da superfície de troca gasosa (PERRY, 1981, 1983).

O cálculo da espessura da barreira de difusão, inicialmente proposto para esse trabalho, não foi realizado devido ao período posterior ao processamento ter coincidido com o período de manutenção do microscópio eletrônico de varredura.

4.4.6 Análise estatística

Devido ao número baixo de animais analisados, os dados obtidos foram apresentados como média e erro padrão para comparação com os dados presentes na literatura de outros répteis. Os parâmetros analisados foram testados para se averiguar previamente se existiram diferenças entre as diferentes regiões dos pulmões e bolsas cloacais (ANOVA one-way e *post hoc* Tukey) e entre os pulmões e bolsas cloacais como um todo (test t). Os testes estatísticos foram realizados no GraphPad Prism 6.0. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, e foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Análise qualitativa

4.5.1.1 *Pele*

Nas regiões inguinal e axial do tegumento distingui-se uma coloração avermelhada e leves ranhuras no tecido, o que pode estar relacionado à presença de vasos nas camadas mais profundas da pele. A pele é formada pela epiderme, a camada mais superficial, e a derme, a camada mais profunda (Figura 4.2). A epiderme apresentou um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Em *P. geoffroanus* foram observadas cristas dérmicas, irregularidades da derme no contato com a epiderme. Os capilares sanguíneos estavam dispostos mais profundamente, na camada submucosa da derme. A camada mucosa foi caracterizada por conter um tecido conjuntivo denso não modelado com muitas fibras de colágeno, produzidas a partir de fibroblastos.

Figura 4.2 Pele de *P. geoffroanus*

(A) Visão da parte posterior de um exemplar de *P. geoffroanus*. A seta aponta para a região inguinal, onde foi coletada uma amostra de pele. (B) Fragmento de pele coletado, mostrando detalhes da vascularização interna. (C) Corte histológico da pele de *P. geoffroanus*. epi*: epiderme queratinizada; der: derme. Fonte: Cordeiro, 2019

4.5.1.2 Cavidade bucofaringeal

Tanto o palato duro quanto o palato mole são constituídos de tecido muito delgado. O palato duro é o tegumento localizado logo após às coanas, cranialmente em relação ao palato mole, que recebe esse nome porque está fixado sobre uma prateleira óssea. Já o palato móvel tem o seu eixo central constituído por músculo esquelético, sobre o qual se move. No

estereomicroscópio foi observado que o palato é menos vascularizado que a pele. O palato duro apresentou uma coloração mais escura, que é característico de epitélio queratinizado. O palato duro é constituído por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, assentado sobre o tecido conjuntivo denso não modelado (Figura 4.3). O tecido conjuntivo denso não modelado é constituído por feixes de fibroblastos e macrófagos, além de fibras elásticas e uma predominância de fibras de colágeno. Foi possível observar alguns vasos sanguíneos, distantes da luz da cavidade bucofaringeal. Próximo da lâmina basal aumenta a densidade de fibras de colágeno, observadas em diferentes disposições, formando tramas tridimensionais. O palato mole, coberto por uma mucosa de revestimento, é constituído por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado e tecido conjuntivo denso não modelado. O epitélio de revestimento é constituído por células colunares secretoras de muco, distinguidas pelo citoplasma mais corado. O epitélio de revestimento e a lâmina basal se delimitam por reentrâncias, invadindo reciprocamente a região adjacente. Dentro dessas reentrâncias foram observados vasos sanguíneos, assim como ao longo da camada de tecido conjuntivo.

Após a observação dos tecidos da pele e dos palatos em microscópio de luz e a ausência de evidências de que esses tecidos preenchessem o pré-requisitos necessários para serem caracterizados como tecidos de trocas gasosas, decidiu-se por não realizar o processamento para observação no microscópio eletrônico de transmissão.

.

4.5.1.3 Pulmões

Os pulmões estão localizados dorsalmente em relação aos demais órgãos do corpo. Eles se prendem à parede interna da caparaça por meio de mesopneumonio dorsal, o qual não é completo e se dispõe de formas diferentes nos pulmões esquerdo e direito. Os mesopneumonios dorsais se conectam perifericamente da carapaça aos pulmões, craniocaudalmente. No entanto, o mesopneumonio dorsal esquerdo se liga à dois terços do pulmão, enquanto que o mesopneumonio direito prende o pulmão até a sua metade. Na região ventral dos pulmões está presente um septo pós-pulmonar (SPP) e o mesopneumonio ventral. O septo pós-pulmonar de *P. geoffroanus* é completo na região cranial e cobre aproximadamente dois terços dos pulmões. O SPP se liga ao fígado e ao trato gastrointestinal por meio dos ligamentos hepatoduodenal e gastrohepático. O mesopneumonio ventral conecta ventralmente os pulmões a região dorsal do sistema digestório, incluindo estômago e intestino, e ao fígado (Figura 4.4).

Figura 4.3 Cavidade bucofaringeal de *P. geoffroanus*

(A) Seta mostra a localização do palato. (B) Corte histológico do palato duro (C) (B) Corte histológico do palato mole. epi: epitélio de revestimento; csm: células secretoras de muco; vs: vaso sanguíneo. Fonte: Cordeiro, 2019

Após a retirada dos pulmões fixados do animal, foi feita uma incisão longitudinal na margem periférica de um dos pulmões para se visualizar as estruturas internas. O parênquima dos pulmões apresenta dez câmaras ao longo do comprimento do órgão, na região médio-central. Essas câmaras são internamente subdivididas em nichos, a unidade funcional dos pulmões de répteis. A distribuição do eptélio é heterogênea, sendo observado parênquima faveolar nos nichos pulmonares e ao longo do restante do pulmão é possível distingui um parênquima edicular, até se tornar parênquima trabecular na região caudal.

De modo geral, os pulmões são configurados histologicamente por três camadas de tecido: uma camada de epitélio simples pavimentoso, conhecido como pneumócito do tipo I, uma camada de endotélio vascular separando o lúmen dos eritrócitos e um espaço intersticial, a submucosa. Nas regiões cranial e medial foram identificados as trabéculas e os favéolos (Figura 4.5A). Todas as regiões dos pulmões apresentaram grande quantidade de capilares sanguíneos localizados muito próximo à superfície de contato com o lúmen (Figuras 4.5A e 4.5B). A barreira de difusão é composta pelos pneumócitos do tipo I, seguida pela lâmina basal e as células endoteliais (Figura 4.5C). Em algumas regiões não foi observada a lâmina basal entre as duas camadas celulares, o que resulta na diminuição da distância de difusão dos gases respiratórios. Entre os capilares foram identificados pneumócitos do tipo II (Figura 4.5D). Na região mais basal está presente tecido conjuntivo denso não modelado seguido por uma camada de túnica muscular não continuada. Na parte medial da região cranial foi possível identificar a presença de anéis de cartilagem pertencentes ao brônquio intrapulmonar. Ainda foi possível observar nos cortes histológicos dessa região do pulmão áreas compostas por células colunares ciliadas (Figura 4.5B).

Figura 4.4 Visão ventral dos pulmões de *P. geoffroanus*

(A) Localização dos pulmões na cavidade pleuroperitonal. As linhas tracejadas mostram a inserção do mesopneumônio dorsal e linhas pontilhadas mostram a inserção do mesopneumônio ventral. (B) Localização do septo pós-pulmonar (SPP). Fonte: Cordeiro, 2019

Figura 4.5 Pulmões de *P. geoffroanus*

(A) e (B) Fotografia de microscopia de luz. (C) e (D) fotografias de microscopia eletrônica de transmissão. cap: capilare sanguíneo; cc: células colunares ciliadas; cil: corpos de inclusão lamelar; er: eritrócito; fv: favéolo; lb: lâmina basal; pI: pneumócito do tipo I; pII: pneumócito do tipo II; sm: submucosa; tb: trabécula; tm: túnica muscular; vs: vaso sanguíneo; vmp: vesículas micropinocitóticas. Fonte: Cordeiro, 2019

Os pneumócitos do tipo I possuem superfície lisa e podem estar presentes entre dois capilares sanguíneos ou sobrepostos a eles. Essas células tem um formato pavimentoso e se apresentam numa única camada. Os pneumócitos do tipo II tem um formato cubóide e apresentam microvilosidades apicais, com corpos lamelares envolvidos por membranas, que secretam o surfactante pulmonar para o lúmen do nicho. O surfactante é produzido a partir dos corpos de inclusão lamelar. Na região cranial medial dos pulmões parece ter maior concentração de pneumócitos do tipo II, quando comparado às outras regiões investigadas. Entre os pneumócitos podem ser encontradas zônulas de oclusão e zônulas de adesão próximas da região apical das células (Figura 4.6).

Figura 4.6 Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de pulmão de *P.*

cil: corpos de inclusão lamelar; za: zônula de adesão; zo: zônula de oclusão. Fonte: Cordeiro, 2019

4.5.1.4 Bolsas cloacais

As bolsas cloacais de *P. geoffroanus* estão inseridas na cintura pélvica, compondo o sistema urogenital. Externamente, as bolsas cloacais se localizam dorsalmente sob a porção caudal do quarto escudo vertebral e das suturas dos terceiro e quarto escudos pleurais. Internamente, as bolsas cloacais são estruturas anexas da cloaca, localizadas dorsolateralmente em relação à cloaca, se fixando no músculo *transversus abdominis*. Após a retirada das bolsas cloacais foi possível observar a contração dessas estruturas quando embebidas com salina. Anatomicamente, as bolsas cloacais são divididas em ápice, corpo e cólo, local que se abre para a cloaca (Figura 4.7A). *P. geoffroanus* possui bolsas cloacais com distribuição heterogênea da mucosa, com presença de maior densidade de vilos foliáceos na região do colo e que vão diminuindo na direção do ápice.

As bolsas cloacais apresentaram, ao longo de todo o órgão, quatro camadas estruturadas na seguinte ordem: 1) mucosa, camada mais superficial, constituída de um epitélio de revestimento estratificado com células colunares no ápice, lâmina na própria, constituído por tecido conjuntivo frouxo e onde estão localizados os vasos sanguíneos e muscular da mucosa, com fibras musculares arranjadas em feixes de forma descontinuada; 2) submucosa, camada de tecido conjuntivo frouxo que também contem vasos sanguíneos e que em algumas regiões surgem reentrâncias na mucosa; 3) túnica muscular, camada de fibras musculares arranjadas de forma descontínua, depositada sobre tecido conjuntivo denso; e 4) serosa, camada delimitante das bolsas cloacais, constituída por tecido conjuntivo frouxo com a presença de vasos sanguíneos e revestido por mesotélio (Figura 4.7B e 4.7C).

De modo geral, os vasos sanguíneos estão localizados mais densamente logo abaixo do epitélio de revestimento. A região do cólo apresentou uma quantidade de vasos sanguíneos visualmente maior, se comparada às demais regiões das bolsas cloacais. Podem ser observados células produtoras de muco (regiões brancas que não foram coradas com azul de toluidina) e algumas vesículas de exocitose em menor número (Figura 4.7C).

A região do corpo apresentou vasos sanguíneos de maior calibre, além de glândulas secretoras (coloração mais escura) com vasos sanguíneos associados, localizados na camada serosa. Foram observadas vesículas de exocitose e células produtoras de muco, porém numa densidade menor que na região do ápice. Foram vistos poucos vasos sanguíneos próximos à luz da bolsa cloacal. O epitélio de revestimento apresentou reentrâncias, relacionadas com o aumento da quantidade de vilos nessa região da bolsa cloacal. Na região do colo foi observada uma concentração de vasos sanguíneos próximo ao que foi encontrado no corpo da bolsa cloacal. O epitélio é formado por células colunares, numa camada pseudoestratificada e foi observada maior presença de vesículas de exocitose (Figuras 4.7B e 4.7C).

Nas imagens de microscopia eletrônica observou-se a propriedade fibrosa das bolsas cloacais de *P. geoffroanus*. Foi possível confirmar a presença de células secretoras de muco e células ricas em mitocôndrias no limite do tecido com a luz da bolsa cloacal. Essas células foram mais vistas na região do ápice (Figura 4.7E). Os vasos sanguíneos estavam localizados mais distantes do lúmen da bolsa cloacal e muitas vezes foram encontrados associados às células secretoras do muco (Figura 4.7D). Também foi possível observar que, na direção do ápice, é possível observar o aumento de microvilosidades nas células epiteliais, assim como o aumento de vesículas de pinocitose.

Figura 4.7 Bolsas cloacais de *P. geoffroanus*

(A) Fotografia das bolsas cloacais esquerda (BCe) e direita (BCd) anexas dorsalmente à cloaca. (B) e (C) Fotografia de microscopia de luz. (D) e (E) Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão. ap: ápice; cl: cólo; cp: capilar; crp: corpo; crm: células ricas em mitocôndrias; cs: camada serosa; csm: células secretoras de muco; epi: epitélio de revestimento; er: eritrócito; tm: túnica muscular vp: vesículas de pinocitose; vs: vasos sanguíneos. Fonte: Cordeiro, 2019

Tabela 4.1 Identificação, massa corpórea e medidas morfométricas dos pulmões e bolsas cloacais de três indivíduos de *P. geoffroanus*

Animal		Pulmões			Bolsas Cloacais		
	Sexo	Massa (kg)	M _{SR} (g)	C _{SR} (cm)	M _{BC} (g)	C _{esq} (cm)	C _{dir} (cm)
PG13	fêmea	2,6	68	30,2	10	10,2	12
PG15	fêmea	3,6	85	34,7	18	11,9	10,5
PG15	macho	3,3	65	33,9	9	11,1	9,5
Média		3,2	72,7	32,9	12,3	11,1	10,7
Desvio Padrão		0,5	10,8	2,4	4,9	0,9	1,3

4.5.1.5 Análise quantitativa

A morfometria da massa e comprimento dos pulmões e bolsas cloacais está presente na tabela 1. Os tecidos quantificados pertenciam a duas fêmeas (2,6 e 3,6 kg) e um macho (3,3 kg).

Os volumes quantificados nos pulmões e bolsas cloacais são apresentados nos Apêndices (APÊNDICES D – F). Os Vref foram significativamente diferentes entre as regiões pré-hilar ($44,03 \pm 4,75 \text{ cm}^3$) e caudal ($29,68 \pm 7,85 \text{ cm}^3$) dos pulmões ($P = 0,04$) e entre as regiões do corpo ($46,50 \pm 9,07 \text{ cm}^3$) e ápice ($10,467 \pm 4,65 \text{ cm}^3$) e colo ($13,48 \pm 6,73 \text{ cm}^3$) nas bolsas cloacais ($P < 0,01$). Comparando os Vref entre pulmões e bolsas cloacais, ficou evidente que os volumes dos pulmões ($194,25 \pm 57,06 \text{ cm}^3$) são maiores que os volumes das bolsas cloacais ($70,17 \pm 12,25 \text{ cm}^3$) ($P = 0,02$).

As medidas de Vpar, Vref/MC e Vpar/MC seguiram o padrão de apresentar diferenças entre o corpo e cólo das bolsas cloacais, com valores de P igual a 0,02 para todos os parâmetros. Para as diferentes regiões dos pulmões, o volume do parênquima foi maior na região pré-hilar ($44,03 \pm 4,75 \text{ cm}^3$) e menor na região caudal ($29,68 \pm 7,85 \text{ cm}^3$) ($P = 0,01$). Quando os Vref e Vpar foram padronizados pela massa corpórea, as diferenças estatísticas ficaram por conta das regiões cranial (interna e externa) e caudal ($P = 0,02$). Vpar, Vref/MC e Vpar/MC também foram significativamente maiores nos pulmões em relação às bolsas cloacais ($P = 0,01$, $< 0,01$ e $< 0,01$).

A densidade de volume entre as diferentes regiões dos pulmões e bolsas cloacais, e entre os pulmões e bolsas cloacais como um todo não apresentou diferenças estatísticas (APÊNDICES G – I).

Para os dados de estimativa de área superficial, as diferentes regiões dos pulmões e bolsas cloacais foram estatisticamente iguais. Porém, o que se observou quando comparado os valores de pulmões e bolsas cloacais foi que as estimativas de áreas superficiais respiratórias e não respiratórias foram maiores nos pulmões, a exemplo da estimativa de áreas superficiais respiratórias ($P < 0,01$) e não respiratória ($P = 0,2$) ter sido igual a $26,57 \pm 2,29$ e $10,32 \pm 1,91$

$\text{cm}^2\text{kg}^{-1}$ nos pulmões e $1,68 \pm 1,05$ e $2,90 \pm 0,73 \text{ cm}^2\text{kg}^{-1}$ nas bolsas cloacais. Consequentemente, a proporção da superfície respiratória obtida para os pulmões e bolsas cloacais também fora estatisticamente diferentes, com valor de P igual a 0,04, onde entre 66 e 76% do parênquima pulmonar compreende tecido de trocas gasosas, enquanto que nas bolsas cloacais essa proporção fica entre 20 e 42% (APÊNDICES J - L).

4.6 Discussão

4.6.1 Análise qualitativa

As evidências morfológicas mostraram que a pele e a cavidade bucofaringeal de *P. geoffroanus*, não possuem todas as propriedades que possibilitem as trocas gasosas com o meio. Foi observado que essas estruturas apresentaram um epitélio com maior espessura e a densidade de vasos sanguíneos parece ser menor, quando comparado ao que foi observado no pulmões e bolsas cloacais, o que dificultaria as trocas gasosas entre o meio aquático e o animal.

Os fragmentos de pele coletados para análise micro e ultraestrutural são provenientes da região inguinal e axial, próxima aos membros. Essas regiões são caracterizadas por terem uma epitélio menos queratinizado e, consequentemente mais fina, levantando a hipótese de que vasos sanguíneos poderiam estar dispostos mais superficialmente. Na cavidade bucofaringea foram coletados fragmentos de tegumento do palato duro e palato mole. O palato em quelônios está localizado logo após as coanas, nas maxilas superiores.

Algumas espécies se especializaram nas vias extrapulmonares de trocas gasosas como uma estratégia para permanecer longos períodos debaixo d'água (JACKSON *et al.*, 2004). Ao contrário de *P. geoffroanus*, as espécies *Chrysemys picta belli*, *Graptemys geographica*, *Sternotherus odoratus*, *Staurotypus triporcatus*, *Kinosternum subrubrum* e *K. tripocartus*, *Apolone ferox* podem realizar trocas gasosas pela pele (ROOT, 1949; GIRGIS, 1961; STONE *et al.*, 1992a; BAGATTO *et al.*, 1997; BAGATTO; HENRY, 1999; BAGATTO; HENRY, 2000; CROCKER *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2004) e *Trionyx sinensis* e *Elseya latisternum* realizam as trocas gasosas com o meio aquático por meio da mucosa da cavidade bucofaringeal (WANG *et al.*, 1989; KING; HEATWOLE, 1994b).

Trionyx spiniferus tem a pele com a principal estrutura para trocas gasosas no meio aquático. As diferenças nas proporções área superficial cutânea e massa observadas entre *T. spiniferus*, *S. odoratus* e *K. subrubrum* revelou que quanto maior é essa relação, maior é o nível de trocas gasosas por vias aquáticas (STONE *et al.*, 1992). Alibardi e Toni (2005) observaram que a epiderme e a camada córnea da superfície cutânea de *T. spiniferus* são mais delgadas do que

nas regiões do plastrão e carapaça, evidenciado os locais mais prováveis para as trocas gasosas aquáticas na espécie.

A função respiratória na cavidade bucofaringeal está relacionada com as papilas não queratinizadas e altamente vascularizadas na cavidade bucofaringeal de Trionychidae (GAGE ; GAGE, 1886; DUNSON, 1960; GIRGIS, 1961; WANG *et al.*, 1989; YOKOSUKA *et al.*, 2000) e Kinosternidae (HEISS *et al.*, 2010). A configuração morfológica da cavidade bucofaringeal observada em fotografias de microscopia de luz de *Trionyx sinensis japonicus* se assemelha muito com o que é observado na cavidade bucofaringeal de *S. odoratus* (YOKOSUKA ET AL, 2000; HEISS *et al.*, 2010), com a presença de papilas bucofaringeais viliformes. Esse epitélio respiratório foi encontrado na região ventral da cavidade bucofaringeal, enquanto que o material coletado da cavidade bucofaringeal de *P. Geoffroanus* se limitou à região dorsal.

O padrão topológico onde os pulmões e as bolsas cloacais estão localizados estão de acordo com o que foi apresentado para outras espécies na literatura (PERRY, 1978, 1989; MALLMANN-FRANCO, 2002; GONZALEZ, 2017). Em relação às bolsas cloacais, elas se localizam dorsalmente sob a porção caudal do quarto escudo vertebral e as suturas dos terceiro e quarto escudos pleurais (MALLMANN-FRANCO, 2002; GONZALEZ, 2017). Os pulmões se prendem à parede interna da carapaça por meio de mesopneumônio dorsal (LAMBERTZ *et al.*, 2010) e podem se fixar dorsalmente em até dois terços da carapaça. Ventralmente é presente um mesopneumônio ventral em cada pulmão e um septo pós-pulmonar (SPP), que separa os pulmões das demais vísceras (KLEIN *et al.*, 2006; LAMBERTZ *et al.*, 2010). Os mesos e o septo mostram diferentes extensões entre os táxons de Testudines (DUNCKER, 1978a, b; PERRY, 1998; LAMBERTZ, 2010). A configuração do SPP encontrada em *P. Geoffroanus* leva a crer que a espécie apresenta uma condição intermediária, pois o SPP está presente, mas não cobre totalmente os pulmões caudalmente, enquanto que em *Chelydra serpentina* o SPP é totalmente perdido e nos gêneros *Chelonia* e *Caretta* os pulmões são totalmente cobertos pelo septo (DUNCKER, 1978a).

Em Testudines é encontrado um *bauplan* pulmonar, com os pulmões multicamerais, o parênquima distribuído heterogeneamente e internamente subdividido em câmaras laterais, medianas e uma câmara terminal (GRÄPER, 1931; PERRY, 1978, 1983, 1998). A distribuição do parênquima é caracterizado pela presença do parênquima do tipo faveolar densamente distribuído nas regiões pré-hilar, cranial e medial. Os parênquimas trabecular e edicular vão aumentando a sua presença progressivamente no eixo cranio-caudal até a predominância na região caudal dos pulmões. Perry (1983) afirma que a distribuição

parenquimal heterogênea tem relação com uma maior taxa de trocas gasosas nas regiões anteriores dos pulmões e a região caudal pode servir também como um local de armazenamento de gases quando os animais estão em apneia, permitindo a manutenção das trocas gasosas na ausência da ventilação (MCDONALD, 1959; PERRY, 1983; CIERI *et al.*, 2014). Outra função atribuída às regiões caudais dos pulmões é a manutenção da flutuabilidade em espécies aquáticas (JACKSON, 1969), bem como a retração dos membros necessita de que partes do pulmão são comprimidos para abrigar os membros dentro da carapaça (DUNCKER, 2004).

Gräper (1931) inicialmente descreveu que o número de câmaras encontrado nos diferentes táxons varia, desde poucos grupos de câmaras laterais e medianas, como em *Testudo* até os pulmões das tartarugas marinhas, que chegam a ter 10 ou 11 grupos de câmaras. Evolutivamente, há uma tendência a redução do número de câmaras intrapulmonares, com a presença de septos horizontais discretos no lugar das câmaras (PERRY, 1998; LAMBERTZ *et al.*, 2010). *P. geoffroanus* apresentou um total de 10 câmaras dispostas nas regiões cranial e lateral dos pulmões, uma característica que estaria presente nas primeiras linhagens do grupo, visto que a família Chelidae, à qual pertence *P. geoffroanus*, surgiu no início da irradiação de Testudines (STERLI *et al.*, 2013).

Na parte medial da região cranial foi possível identificar a presença de anéis de cartilagem. Esse suporte cartilaginoso é próprio das regiões onde está inserido o brônquio intrapulmonar e as suas subdivisões (SOLOMON; PURTON, 1984). O fragmento dessa região foi retirado do local onde estão dispostas as câmaras intrapulmonares de *P. geoffroanus*. Ainda foi possível observar nos cortes histológicos dessa região do pulmão áreas compostas por células colunares ciliadas, as quais podem ser consideradas epitélio em regeneração (SOLOMON; PURTON, 1984).

Os capilares sanguíneos *P. geoffroanus* estão dispostos em padrão duplo, mesmo padrão observado em outras espécies de répteis, peixes dipnóicos, anfíbios e estágios embrionários de mamíferos (PERRY, 1983; MAINA; MALOY, 1985; MAINA, 1989; PEIXOTO, 2015). O padrão de disposição duplo dos capilares apresenta capilares dos dois lados do septo interfaveolar e metade da superfície do capilar está mais próximo do lúmen pulmonar e disponível para as trocas gasosas.

As imagens de microscopia eletrônica do pulmão mostraram uma configuração comum ao longo de todo o pulmão. A barreira de difusão é composta por células epiteliais que estão em contato direto com o lúmen pulmonar, os pneumócitos do tipo I, seguida pela lâmina basal e células endoteliais que formam os capilares sanguíneos. Em algumas regiões não foi

observada a lâmina basal entre as duas camadas celulares, o que resulta na diminuição da distância de difusão dos gases respiratórios (MAINA, 2002; MAINA; WEST, 2005; PEIXOTO *et al.*, 2018). Também foram observadas junções entre células adjacentes, que tem o papel de impedir o extravasamento de fluídos para o lúmen parenquimal, o que poderia ser um empecilho para a difusão dos gases respiratórios (SOLOMON; PURTON, 1984).

Um segundo tipo celular encontrado nos pulmões de *P. geoffroanus*, os pneumócitos do tipo II, estão localizados nas regiões entre os pneumócitos do tipo I. Essas células, encontradas nos pulmões de todos os vertebrados, tem forma cuibodal, numerosas mitocôndrias, ribossomos livre e microvilos, e um aparato de Golgi bem desenvolvido, responsáveis pela produção dos corpos lamelares (PERRY, 1972; SOLOMON; OKADA *et al.*, 1984; DANIELS, 2004). Os pneumócitos do tipo II produzem e secretam, por meio dos corpos lamelares, um complexo de lipídios e proteínas, conhecido como surfactante, substância altamente conservada em vertebrados (DANIELS, 1995; SULLIVAN *et al.*, 2001; ORGEIG *et al.*, 2007). O surfactante auxilia na mecânica da ventilação, reduzindo a tendência de colapamento epitelial das paredes faveolares durante a expiração e em situações de mergulho (MOBERLY, 1968; DANIELS, 1995), além de diminuir a tensão superficial, favorecendo a absorção de oxigênio e a expansão de áreas eventualmente colabadas (ORGEIG; DANIEL, 2001).

As bolsas cloacais são objeto de estudo desde o século XVIII, quando foram identificadas pela primeira vez em *Emys orbicularis* (TOWSON, 1799). Townson (1799) observou que *E. orbicularis* gerava fluxo de água na região da saída da cloaca e atribuiu esse movimento da água às bolsas cloacais. Esse movimento foi observado em *P. geoffroanus in vivo* e *ex vivo*, quando as bolsas cloacais foram retiradas e isoladas do restante do sistema urogenital. Esses movimentos se intensificaram quando as bolsas cloacais foram embebidas em salina. Dessa forma, fica evidente que essas estruturas possuem alguma importância em quelônios, principalmente nos que habitam ambientes aquáticos (ANDERSON, 1876). Atualmente, as bolsas cloacais já foram descritas em espécies pertencentes às famílias Pelomedusidae, Chelidae, Chelydridae, Platysternidae e Emydidae (ANDERSON, 1876; SMITH; JAMES, 1958; MALLMANN-FRANCO, 2002).

As bolsas cloacais são historicamente subdivididas em três regiões, no eixo cranio-caudal: ápice, corpo e cólo (KING; HEATWOLE, 1994). Nossas observações confirmaram a caracterização de Mallmann-Franco (2002), que observou que as bolsas cloacais de *P. geoffroanus* apresentou distribuição heterogênea da mucosa, com presença de menor densidade de vilos foliáceos na região do ápice e que vão aumentando na direção do cólo. Jeffree e Jones (1992) inferiram que os vilos são formados por extensão e dobramento das

camadas mucosa e submucosa e, portanto, não é notada a presença de camada muscular nos vilos. Esse fato foi também observado em *P. geoffroanus*.

A hipótese formulada nesta tese, sobre as bolsas cloacais de *P. geoffroanus* exercerem a função de trocas gasosas, teve evidências a favor e contra, a partir dos resultados encontrados. Os vasos sanguíneos se concentram na camada da lâmina própria, logo abaixo do epitélio de revestimento das bolsas cloacais de *P. geoffroanus*. A análise microscópica das bolsas cloacais de *Rheodytes leukops* e *Elseya latisternum* também destacaram a presença dos vasos sanguíneos nessa camada do tecido das bolsas cloacais (LEGLER; GEORGES, 1993; KING; HEATWOLE, 1994a). Mallmann-Franco observou que, entre os Pleurodira estudados por ela, as espécies que apresentaram maior quantidade de vasos sanguíneos foram *Podocnemis expansa*, *Phrynops geoffroanus*, *Hydromedusa tectifera* e *Podocnemis sextuberculata*, nesta ordem.

As células secretoras do muco observadas em *P. geoffroanus* seguem um nível de distribuição contrário ao observado em relação aos vasos sanguíneos, sendo mais encontrados na região do ápice. Não foi observada a presença de células secretoras de muco nas bolsas cloacais de *T. scripta elegans*, *Pseudemys concinna concinna*, *Chrysemys picta*, *G. pseudogeographica kohnii* (GONZALEZ, 2017). Também na direção do ápice, foi observado o aumento da quantidade de microvilosidades nas células epiteliais. A presença de células secretoras de muco e das microvilosidades podem estar associadas, respectivamente, com a produção de muco e secreção de muco para o lúmen das bolsas cloacais e aumento da superfície de absorção e secreção (TRIER, 1968; BERRIDGE; OSHMAN, 1972). A configuração celular das células secretoras de muco se assemelha aos pneumócitos do tipo II, levando a crer que o muco produzido nas bolsas cloacais também pode estar relacionado com as funções relegadas ao surfactante pulmonar. Além disso, as microvilosidades garantem a manutenção de gradientes bioquímicos (MALLMANN-FRANCO, 2002).

4.6.2 Análise quantitativa

O volume de trabalhos que analisaram parâmetros morfofuncionais da respiração em répteis ainda é incipiente. O método estereológico foi aplicado para *T. scripta*, *Gekko gecko*, *Lacerta sp.*, *Tupinambis nigropunctatus*, *Varanus exanthematicus*, *Pituophis melanoleucus*, *Crocodylus niloticus* e *Iguana iguana* (CRAGG, 1975, 1978; PERRY, 1978, 1983, 1990; STINNER, 1982; PERRY *et al.*, 1994; REDDY, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2018). Esse tipo de abordagem é importante pois possibilita a extrapolação dos seus resultados para a interpretação de investigações fisiológicas, analisando a relação de forma e função e tratando

das suas diferenças quantitativas dos diferentes parâmetros investigados (PERRY *et al.*, 1994; WEIBEL *et al.*, 2007).

Os volumes de referência entre as diferentes regiões dos pulmões e bolsas cloacais confirmaram as análises qualitativas. As diferenças observadas entre a região pré-hilar e caudal são consequência da distribuição heterogênea do parênquima, com a presença das câmaras craniais e laterais e maior concentração de favéolos nessas regiões, ao passo que a região caudal é composta por um epitélio respiratório menos denso (PERRY, 1998). Para as bolsas cloacais, a morfometria confirma o formato elíptico das bolsas cloacais.

O volume estimado morfologicamente para os pulmões de *P. geoffroanus* ($60,462 \pm 10,195 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$) neste trabalho foi menor do que o volume fisiológico mensurado em Cordeiro (2014). Naquela ocasião, o volume pulmonar foi mensurado em $155,274 \pm 37,594 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ quando foi estudada a mecânica do sistema respiratória de *P. geoffroanus*. Alguns fatores podem ter interferido nas diferenças entre os volumes nos dois trabalhos. Em primeiro lugar, as metodologias aplicadas são diferentes e, dessa forma, é esperada alguma variação nos valores. Os exemplares de *P. geoffroanus* que foram mensurados neste trabalho podem ter tido o seu volume pulmonar subestimado. Perry (1972) retirou o ar dos pulmões até uma pressão de $-10 \text{ cmH}_2\text{O}$ e só então injetou o fixador até uma pressão de $20 \text{ cmH}_2\text{O}$, o que não foi feito aqui, sugerindo uma menor quantidade de fixador entrando nos pulmões. Por fim, foi usado como fixador a formalina Millonig modificada. Esse fixador promove algum grau de encolhimento das estruturas, porém esse encolhimento não deve ser o único motivo para as diferenças encontradas entre os trabalhos.

Mesmo levando em consideração os diferentes valores de volume pulmonar encontrados por Cordeiro (2015) e neste trabalho, Perry (1978a) mensurou volume pulmonar em *T. scripta* quatro e duas vezes maior, respectivamente. Em contraste, os valores de $V_{\text{par}}/V_{\text{ref}}$ em *P. geoffroanus* variaram entre 86,1 e 93,9%, enquanto que em *T. scripta* a porcentagem de volume parenquimal foi de 44,9% (PERRY, 1978a).

O volume de referência das bolsas cloacais variou entre 59,328 e $83,456 \text{ cm}^3$, valores acima dos encontrados por Gonzalez (2017) em *Pseudemys concina concina* (42 cm^3), *Chrysemys picta* (34 cm^3), *Graptemys pseudogeographica kohnii* ($1,9 \text{ cm}^3$). O método usado por Gonzalez considerou os raios de diferentes locais das bolsas cloacais, o que pode ter subestimado os valores das bolsas cloacais nessas espécies. Em *T. scripta* o volume de referência das bolsas cloacais variou entre 0,78 a $122,9 \text{ cm}^3$. A autora justificou essa ampla variação de valores às diferenças entre macho e fêmeas. Em *P. geoffroanus*, não se observou

diferença nos volumes das bolsas cloacais entre as fêmeas e o macho que foram usados nas quantificações.

As estimativas de área superficial do parênquima como um todo, e das regiões respiratórias e não respiratórias não apresentaram diferenças entre as diferentes regiões dos pulmões e bolsas cloacais. A estimativa de área superficial dos pulmões de *P. geoffroanus* foi aproximadamente metade do valor estimado para *T. scripta* (PERRY, 1978a). No entanto, do total de área superficial interna dos pulmões, 83% são classificados como área superficial respiratória em *T. scripta* e 72% em *P. geoffroanus*. A porcentagem de superfície respiratória variou entre 59,4 e 85,0% nos pulmões de *P. geoffroanus*, valores próximos ao encontrados em répteis, em torno de 73% (PERRY, 1998). Em algumas espécies, como *Crocodilus niloticus* (PERRY, 1990a) e *Gekko gecko* (PERRY *et al.*, 1994) essa variação é ampla dentro dos pulmões, chegando a 71 e 92%, respectivamente, de superfície aérea respiratória próximo aos brônquios intrapulmonares e nos septos faveolares, contra 26 e 29% nas regiões caudais. Nas bolsas cloacais esses valores variam entre 21,2 e 58,0%.

4.6.3 Implicações morfofuncionais

As análises qualitativas puderam indicar que as bolsas cloacais de *P. geoffroanus* poderiam exercer uma função de trocas gasosas com o meio aquático devido à presença de estruturas apropriados para exercer trocas gasosas, como a presença de vilos que aumentam a área de superfície das bolsas cloacais, a presença de uma grande quantidade de vasos logo abaixo do epitélio pseudoestratificado e a presença de células produtoras de muco, que produzem e secretam compostos lipoprotéicos e podem exercer uma função similar ao surfactante encontrados nos pulmões dos vertebrados. No entanto, as análises morfométricas põem em cheque a confirmação dessa hipótese, principalmente devido às diferenças encontradas nos parâmetros esterológicos entre as bolsas cloacais e os pulmões.

A função das bolsas cloacais ainda é motivo de ampla discussão (JORGENSEN, 1998), conduzida principalmente por fisiólogos, e não dando a devida atenção aos aspectos morfológicos. O uso das bolsas cloacais como via de trocas gasosas extrapulmonares também foi atrelado à quantidade de capilares sanguíneos presentes na lâmina própria das bolsas cloacais de *Rheodytes leukops* (WINOKUR; LEGLER, 1982; LEGLER; GEORGES, 1993; FRANKLIN, 2000) e *Elseya latisternum* (KING; HEATWOLE, 1994a e b).

Pickel (1989) e Smith e James (1958) atribuíram as bolsas cloacais o armazenamento de água para facilitar na escavação dos ninhos no momento da oviposição dos ovos pelas fêmeas. Como não foi observada diferença nos tamanhos das bolsas cloacais de machos e fêmeas em *P. geoffroanus* no presente trabalho e no trabalho de Mallmann-Franco (2002), essa função

pode ser desconsiderada para a espécie. Além disso, as contrações rítmicas e lentas das bolsas cloacais sugerem alguma função contínua e não uma função pontual como seria no caso da oviposição;

As análises qualitativas e quantitativas de *P. geoffroanus* sugerem algum tipo de transporte iônico nas bolsas cloacais. A presença dos espaços intercelulares e o padrão de junções celulares foi encontrada principalmente na região do cólo, nas faces laterais das células ricas em mitocôndrias, locais onde pode ocorrer transporte ativo de íons. Essa função já foi demonstrada em *T. scritta*, *Chrysemys picta*, *Elseya dentata*, *Emydura signata* e *Chelodina longicollis* (DUNSON, 1967; TROBEC; STANLEY, 1971; JEFFREE; JONES, 1992).

As amplas bolsas cloacais de *P. geoffroanus* também podem assumir a função de ajuste da fluutuabilidade nos corpos d'água. Jackson (1969) citou as bolsas cloacais, além dos pulmões, como estruturas que podem regular o volume interno de água por meio de bombeamento que gera um fluxo de água pela cloaca. A presença de feixes musculares pode estar relacionada a esta função. As espécies estudadas por Gonzalez (2017) não apresentaram vilos e não foram observados muitos vasos sanguíneos. Dessa forma, o controle da fluutuabilidade pode ser a principal função exercida pelas bolsas cloacais nas espécies estudadas por Gonzalez (2017).

As diferenças morfométricas entre os pulmões e bolsas cloacais de *P. geoffroanus* não descartam a função de trocas gasosas na espécie, mas evidenciam que as bolsas cloacais não são a principal fonte de oxigênio para esses animais e que a respiração aérea ainda é a via mais importante para as trocas gasosas. O cálculo da distância de difusão pode ser o parâmetro que pode corroborar definitivamente a hipótese do uso das bolsas cloacais como estruturas extrapulmonares através do cálculo da capacidade morfológica de difusão de O₂ e CO₂. Além disso, outras hipóteses sobre a função das bolsas cloacais devem ser testadas.

5. CAPÍTULO 5 - TROCAS GASOSAS POR VIAS

EXTRAPULMONARES EM *PHRYNOPS GEOFFROANUS*

5.1 RESUMO

A respiração bimodal pode ser definida como a capacidade de realizar trocas gasosas entre o animal e o ambiente do ar e da água. Nas tartarugas, observou-se que podem ocorrer trocas gasosas através da pele, epitélio bucofaringeal e bolsas cloacais. A taxa de troca gasosa com o ambiente aquático medida para as tartarugas é variável entre as espécies, com uma contribuição de 10% em *Emydura signata* e atingindo mais de 70% em *Rheodytes leukops*. Observando os baixos valores de $\dot{V}O_2$ para *P. geoffroanus*, sugerimos que o baixo consumo de oxigênio atmosférico pode ser indicativo do uso de alguma via alternativa de troca gasosa através de estruturas extrapulmonares. *P. geoffroanus* possui um par de bolsas cloacais e observações pessoais indicam que a região cloacal produz fluxo de água através da contração muscular. O objetivo deste estudo foi investigar se *P. geoffroanus* é capaz de trocar gases com o ambiente aquático através da cavidade bucofaringeal ou através das bolsas cloacais. Os animais foram anestesiados e submetidos a diferentes níveis de oxigênio aéreo (normóxia e anóxia) e aquático (normóxia, anóxia e hiperóxia). Após quarenta minutos de exposição a um tratamento específico, uma amostra de sangue foi coletada para medir a PaO_2 , parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os valores de PaO_2 diferiram significativamente entre a situação de normóxia aérea e aquática e os demais tratamentos, mostrando que *P. geoffroanus* não apresenta capacidade significativa de troca gasosa com o ambiente aquático. Os níveis de lactato encontrados em todos os tratamentos foram altos, ou seja, os animais acessaram o metabolismo anaeróbico, mesmo em condições favoráveis à manutenção do metabolismo aeróbico. Esses resultados levam à proposição de uma hipótese sobre o desenvolvimento do hipometabolismo em *P. geoffroanus*.

5.2 ABSTRACT

Bimodal breathing can be defined as the ability to perform gas exchange between the animal and the air and water environment. In turtles it has been observed that gas exchange can occur through the skin, buccopharyngeal epithelium and cloacal bursae. The rate of gas exchange with the aquatic environment measured for turtles is variable among species, with a contribution of 10% in *Emydura signata* and reaching over 70% in *Rheodytes leukops*. Noting the low values of $\dot{V}O_2$ for *P. geoffroanus*, we suggest that low atmospheric oxygen consumption may be indicative of the use of some alternative gas exchange pathway through extrapulmonary structures. *P. geoffroanus* has a pair of cloacal bursae and personal observations indicate that the cloacal region produces water flow through muscle contraction. The objective of this study was to investigate whether *P. geoffroanus* is capable of gas exchange with the aquatic environment through the buccopharyngeal cavity or through the cloacal bursae. The animals were anesthetized and submitted to different aerial (normoxia and anoxia) and aquatic (normoxia, anoxia and hyperoxia) oxygen levels. After forty minutes of exposure to a specific treatment, a blood sample was collected to measure PaO_2 , hematological and biochemical parameters. PaO_2 values were significantly different between the air and aquatic normoxia situation and the other treatments, showing that *P. geoffroanus* does not present significant gas exchange capacity with the aquatic environment. The lactate levels found in all treatments were high, that is, the animals accessed the anaerobic metabolism even under favorable conditions for the maintenance of the aerobic metabolism. These results lead to the proposition of a hypothesis regarding the development of hypometabolism in *P. geoffroanus*.

5.3 INTRODUÇÃO

O padrão de respiração aérea entre os quelônios é descrito como uma respiração episódica, com períodos ventilatórios em que o animal realiza alguns ciclos ventilatórios intercalados por períodos não ventilatórios (HICKS; WHITE, 1992; MALTE *et al.*, 2016). Esse padrão de respiração, conhecido como respiração intermitente, é bem estabelecido para peixes de respiração aérea, anfíbios e répteis, iniciando com uma expiração seguida por uma inspiração (BURGGREN; SHELTON, 1979; MILSOM, 1991; DRUZISKY; BRAINERD, 2001), podendo ser observado de duas formas. Um padrão de respiração intermitente pode se observado quando o indivíduo realiza episódios respiratórios composto de um único evento ventilatório, ou seja, um ciclo de expiração e inspiração, espaçadas de forma substancialmente uniforme, ou então os episódios respiratórios são compostos por inúmeros eventos ventilatórios, intercalados por longos períodos não ventilatórios (GANS; CLARCK, 1976; MILSOM, 1991; CORDEIRO, 2014).

A respiração intermitente tem se mostrado uma estratégia eficiente para as trocas gasosas em quelônios devido a diversos fatores. Em termos fisiológicos, a respiração intermitente é vantajosa para os animais que apresentam menores demandas de taxas metabólicas (LEE; MILSOM, 2016) e, dessa forma, ventilações esporádicas dos pulmões podem diminuir o custo do trabalho mecânico da respiração (MILSOM, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 2009). Além disso, ecologicamente, quelônios semi-aquáticos reduzem o tempo de exposição na superfície quando respiram ar atmosférico esporadicamente, diminuindo a chance de se expor aos predadores (CORDEIRO *et al.*, 2016).

Em trabalho publicado por Cordeiro e colaboradores (2016), com o objetivo de se medir o custo metabólico da respiração da espécie *Phrynops geoffroanus*, observou-se que os indivíduos dessa espécie apresentaram os menores valores de ventilação ($\dot{V}_E$) e consumo de oxigênio atmosférico ($\dot{V}O_2$) ($1,7 \pm 0,6 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $0,07 \pm 0,03 \text{ mlO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente), quando comparados aos de outros quelônios já investigados (JACKSON, 1985; GLASS *et al.*, 1985; VITALIS; MILSOM, 1986a,b; BAGATTO; HENRY, 1999).

Valores de $\dot{V}O_2$ menores que 0,3 ml/min também foram encontrados em *Chelydra serpentina* (Boyer, 1963), *Chelonia mydas* (JACKSON *et al.*, 1991), *Terrapene ornata* (GLASS *et al.*, 1979), *Aldabrachelys gigantea* (HUGHES *et al.*, 1971), *Chelonoidis carbonaria* (TREVISAN-BAÚ *et al.*, 2018), *Staurotypus triporcatus* (BAGATO; HENRY, 2000), *Chrysemys picta bellii* (JACKSON *et al.*, 1991) e *Kinosternon subrubrum* (LITZGUS; HOPKINS, 2003). Das espécies mencionadas, *Chelydra serpentina* (GATTEN, 1980),

Staurotypus triporcatus (BAGATO; HENRY, 2000), *Chrysemys picta bellii* (JACKSON *et al.*, 2004) e *Kinosternon subrubrum* (STONE *et al.*, 1992a) apresentam algum nível de trocas gasosas com o ambiente aquático, configurando-se uma respiração bimodal.

Respiração bimodal pode ser definida como a habilidade de realizar trocas gasosas entre o animal e os meios aéreo e aquático (BELKIN, 1968; JACKSON *et al.*, 1976; GATTEN, 1980, 1984; STONE *et al.*, 1992a). Em quelônios já foram observados que as trocas gasosas podem ocorrer por meio do integumento, do epitélio bucofaringeo e do epitélio da cloaca e/ou pela bolsa cloacal (GAGE; GAGE, 1886; WANG *et al.*, 1989; STONE *et al.*, 1992a; KING; HEATWOLE, 1994; GORDOS; FRANKLIN, 2002; JACKSON *et al.*, 2004). A bolsa cloacal é um par de apêndices da cloaca que pode ser altamente vascularizada e usada para as trocas gasosas no ambiente aquático, através da difusão ativa entre o animal e o meio aquático (PETERS, 1964; LEGLER, 1993b; KING; HEATWOLE, 1994).

A taxa de trocas gasosas com o ambiente aquático mensurado para quelônios é variável entre as espécies, apresentando uma contribuição de 10% em *Emydura signata* (PRIEST, 1997; PRIEST; FRANKLIN, 2002) e alcançando mais de 70% em *Rheodytes leukops* (PRIEST, 1997; GORDOS *et al.*, 2003). À vista disso, e observando os resultados de $\dot{V}O_2$ para *P. geoffroanus* (CORDEIRO *et al.*, 2016), sugerimos que o baixo consumo de oxigênio atmosférico pode ser um indício do uso de alguma via alternativa para as trocas gasosas, por meio de estruturas extrapulmonares (BELKIN, 1968; GAGE; GAGE, 1886; LEGLER; WINOKUR, 1983).

P. geoffroanus possui um par de bolsas cloacais (MALLMANN-FRANCO, 2002) e observações pessoais apontam que a região cloacal produz fluxo de água por meio de contração muscular. Também foi observado (TEFC observação pessoal) que *P. geoffroanus* realiza movimentos bucais durante o tempo submerso. Esses comportamentos reforçam a ideia de que esses animais podem realizar troca gasosa bimodal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar se *P. geoffroanus* é capaz de realizar trocas gasosas com o ambiente aquático por meio da cavidade bucofaringeal ou por meio das bolsas cloacais.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1 Animais

Espécimes de *P. geoffroanus* (N = 19) foram cedidos pelo Bosque Zoológico Fábio Barreto, em Ribeirão Preto (Autorização para transferência n° 3580423 – GEFAU/SP). Os animais foram transportados até o Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo) e foram mantidos no Biotério de Tetrápodes Silvestres. Todos os indivíduos eram adultos, de ambos os sexos. Durante o período de aclimação os animais foram condicionados em caixas de polietileno (69 x 51,5 x 39 cm) inclinadas com água, permanecendo duas áreas, alagada e seca, por onde os animais poderiam circular. O fotoperíodo da sala acompanhava o regime de dia e noite de Ribeirão Preto. A temperatura da sala era mantida em 24 ± 1 °C. A alimentação foi fornecida pelo menos 2 vezes por semana, composta por ração para peixe, carne vermelha, frutas e legumes. A água foi fornecida *ad libitum*. A alimentação dos animais foi suprimida no prazo mínimo de 3 dias antes da aquisição de dados fisiológicos, visando minimizar a interferência da digestão sobre as respostas investigadas (BRITO, 2007).

5.4.2 Preparação dos animais

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (100 mg.kg^{-1} , IM). Após a perda dos reflexos vitais (reflexos corneal e palpebral e reflexo a estímulo doloroso), um animal foi colocado em decúbito dorsal para os procedimentos cirúrgicos. Primeiro foi feita uma traqueostomia para ventilação artificial durante cirurgia e experimentação. Em seguida foi canulada a artéria subclávia direita ou esquerda. Para a canulação da artéria, foi realizada uma abertura de 5 x 5 cm no plastrão, próxima ao coração, expondo os vasos sanguíneos. A artéria subclávia foi isolada e canulada (PE 50) oclusivamente. A cânula foi preenchida com heparina + ringer de tartaruga para impedir a coagulação do sangue. Após a canulação, a cânula foi exposta na base do pescoço e a abertura do plastrão foi fechada com resina durepoxi. Uma cânula de calibre compatível com a abertura da cloaca foi inserida na cloaca e fixada com sutura na pele da abertura cloacal.

Após a canulação, o animal foi posicionado em decúbito ventral e a cânula da traqueostomia foi conectada a um ventilador (Inspira, Harvard Apparatus, Canadá) para ventilar os pulmões com ar atmosférico com volume 30 mL e frequência de 30 min^{-1} . Essa condição foi mantida por pelo menos 10 minutos antes do início da coleta de dados, para garantir uma situação de *steady-state*. Os procedimentos experimentais foram executados com os animais anestesiados

e ao final do experimento, os indivíduos foram anestesiados com sobredose de pentobarbital sódico (150 mg.kg^{-1} , IM).

5.4.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (nº do protocolo 16.5.818.59.8). Os dados foram coletados em ambiente com temperatura controlada de $24 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os animais foram expostos às seguintes concentrações de gases aéreo e aquático: 1) normóxia normocárbica aérea e aquática, 2) anóxia aérea (100% N_2) e normóxia aquática, 3) anóxia aérea e aquática (100% N_2), 4) anóxia aérea e hiperóxia aquática ($\approx 100\% \text{ O}_2$; bolsa cloacal), 5) anóxia aérea e hiperóxia aquática ($\approx 100\% \text{ O}_2$; cavidade bucofaringeal). A ordem dos tratamentos foi randomizada entre os diferentes animais experimentais.

Para expor os animais às diferentes concentrações de gases aéreos, o sistema ventilador-sistema respiratório era exposto ao ar atmosférico (normóxia aérea) ou conectado ao cilindro de nitrogênio (anóxia aérea) pelo canal de entrada do ventilador. Quando o animal foi submetido à condição de anóxia aérea, o cilindro de nitrogênio foi conectado a um compartimento de plástico e este foi conectado ao sistema ventilador-sistema respiratório, para evitar que a pressão com o que o nitrogênio saia do cilindro alterasse o volume e a frequência com que o mesmo entrava nos pulmões.

Dois canais do ventilador (um de entrada e um de saída) foram conectados à cânula acoplada à traqueia; por um canal passava o ar que era levado aos pulmões durante a inspiração e pelo outro canal passava o ar expirado. Nessa cânula que saía do ventilador para o animal foi montado um pneumotacógrafo (tubo Fleisch), conectado a um espirômetro (ADInstruments, Nova Zelândia) (GLASS *et al.*, 1978; WANG; Warburton, 1995). O ar expirado pelo animal que retornava ao ventilador foi conduzido primeiramente para uma coluna de secante (drierite), para retirar a umidade do ar, e em seguida para um analisador de gases (ADInstruments, Nova Zelândia), onde foi determinada a concentração de oxigênio e de gás carbônico a cada evento respiratório. O espirômetro e o analisador de gases foram conectados ao sistema de aquisição de dados PowerLab (ADInstruments, Nova Zelândia) e os dados coletados foram convertidos e gravados no *software* de análise de dados LabChart 7.0 (ADInstruments, Nova Zelândia). Esses dados foram utilizados durante o experimento, certificando que as diferentes concentrações de gases aéreos propostas no estudo estavam sendo mantidas ao longo dos tratamentos.

No caso da exposição dos animais às diferentes concentrações de gases aquáticos, em um aquário preenchido de água foi borbulhado ar atmosférico (normóxia aquática), nitrogênio (anóxia aquática) ou oxigênio (hiperóxia aquática). A água foi considerada saturada em normóxia, anóxia e hiperóxia quando a pressão parcial de oxigênio na água ($P_{\text{água}}\text{O}_2$) alcançava 145 ± 5 , menos que 1 e mais que 760 mmHg, respectivamente. Um sensor de oxigênio óptico (PyroScience, Alemanha) foi mantido dentro do aquário, sempre em contato com a água e a $P_{\text{água}}\text{O}_2$ foi mensurada pelo FireSting O_2 (PyroScience, Alemanha) e registrado no *software* de registro de oxigênio Pyro Oxygen Logger (PyroScience, Alemanha). Para levar a água do aquário para o animal, uma mangueira foi conectada a uma bomba para aquário (Sarlor, Brasil), que quando ligada gerava um fluxo que bombeava água para fora do aquário. A mangueira foi conectada à cânula que estava presa à entrada da cloaca ou então foi presa diretamente na cavidade bucofaringeal do animal. Para assegurar que água direcionada à cavidade bucofaringeal não fosse conduzida ao sistema digestório, uma luva de látex foi colocada na entrada do esôfago para impedir essa passagem.

Os animais foram expostos aos tratamentos por pelo menos quarenta minutos. Após esse tempo, foi coletado sangue, em duas alíquotas: 1 mL em seringa heparinizada e 2 mL em seringa não heparinizada. A alíquota da seringa heparinizada foi usada para medir pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2) e pH, volume de eritrócitos e o hematócrito. A alíquota da seringa não heparinizada foi usada para medir a hemoglobina, glicose, lactato, piruvato e os íons bicarbonato, Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , e Ca^{2+} .

5.4.4 Análises sanguíneas

A PaO_2 ($N = 8$) foi mensurada a partir de 0,3 mL de sangue depositado em Eppendorf (0,5 mL) e isolado do ar ambiente com plástico parafilm M. Um sensor de oxigênio óptico (PyroScience, Alemanha) foi mergulhado no Eppendorf e o valor de PaO_2 foi registrado no *software* de registro de oxigênio Pyro Oxygen Logger (PyroScience, Alemanha). O eletrodo ficou mergulhado na amostra de sangue até que o valor de PaO_2 estivesse estabilizado (aproximadamente 2 minutos). Depois desse tempo, o eletrodo foi retirado, lavado com água destilada e deixado de molho em água destilada com detergente enzimático.

Uma amostra de 0,2 mL do sangue era usada para mensurar o pH arterial. Essa amostra foi injetada no microeletrodo de pH (Microelectrodes Inc.), conectado ao PowerLab (ADInstruments, Nova Zelândia) e os dados coletados foram convertidos e gravados no *software* de análise de dados LabChart 7.0 (ADInstruments, Nova Zelândia).

O número total de eritrócitos ($\text{RBC} - 10^6$ células mm^3) foi determinado com 10 μL de sangue

diluído em 2 mL de solução de formol-citrato. O RBC foi determinado em câmara de Neubauer utilizando microscópio de luz (Olympus, Japão), em aumento de 400x. O número total de eritrócitos (milhões/mm³) foi determinado a partir da contagem de cinco campos. O restante do volume de sangue heparinizado foi usado para determinação do hematócrito (Hct = %). Microcapilares (triplicata) preenchidos com sangue foram centrifugados (11.000 rpm, 3 minutos) em centrífuga analógica microhematócrito (Global Trade, Brasil). Um cartão de leitura de Hct foi utilizado para a leitura de sedimentação dos eritrócitos.

A partir da segunda alíquota, a concentração de hemoglobina (g/dL) foi determinada com o kit de Hemoglobina (LabTeste Diagnóstica, Brasil), utilizando a metodologia de cianeto de hemoglobina (HiCN), com leitura no espectrofotômetro Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro (Biochrom, Brasil) com absorvância em 540 nm (Drabkin, 1935). A quantificação de hemoglobina foi realizada no Laboratório de Imunologia, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. O restante da alíquota foi centrifugado para separação do plasma e congelado em seguida à temperatura de -20 °C. Posteriormente, se seguiu as análises de osmolalidade, glicose, lactato e piruvato, além dos íons bicarbonato, Na⁺, Cl⁻, K⁺ e Mg⁺. A análise da osmolalidade foi conduzida no Laboratório de Fisiologia dos Crustáceos, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e as demais análises foram realizadas no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

A osmolalidade foi medida a partir de uma amostra de 10 µL, usando um osmômetro de pressão de vapor (Wescor, EUA) que se baseia na metodologia de medição da descida da pressão de vapor. Os valores de glicose foram obtidos a partir da metodologia modificada de Bondar e Mead (1974) com o kit de glicose HK Liquiform (LabTeste Diagnóstica, Brasil), produzindo uma reação de fosforilação da glicose presente na amostra, catalisada pela hexoquinase, sendo o seu produto, glicose-6-fosfato, identificado em absorvância de 340 nm. O lactato foi quantificado pela reação da L-lactato, que produz peróxido de hidrogênio e é acoplado em uma reação que é catalisada pela peroxidase e produz a quinoneimina, que tem máximo de absorbância em 55nm (kit de Lactato Enzimático, LabTeste Diagnóstica, Brasil). O piruvato foi determinado seguindo a metodologia de Lu (1939), a partir da absorbância de 440 nm.

A medição do bicarbonato, usando o kit Bicarbonato FS* (Diagnostic System, Alemanha), se deu por meio de teste enzimático usando fosfoenolpiruvato carboxilase e um análogo NADH estável, que resulta na diminuição do dióxido de carbono da amostra, o que é indiretamente medido a 405 ou 415 nm. A concentração de cálcio foi determinada por reação de ponto final (kit Cálcio Liquiform, LabTest Diagnóstica, Brasil), reagindo com a púrpura de ftaleína em

meio alcalino e medido em 570 nm. O kit de Magnésio (LabTest Diagnóstica, Brasil) foi usado para quantificar os íons de magnésio, que reagem com o magon sulfonado em meio alcalino, formando um complexo que pode ser medido em absorbância de 500 e 540 nm. A determinação quantitativa da concentração de cloretos nas amostras foi feita com kit de Cloretos Liquiform (LabTeste Diagnóstica, Brasil), que apresenta como princípio a reação dos íons cloreto com tiocianato de mercúrio e como produto final de uma segunda reação o tiocianato férrico, que apresenta intensidade de cor formada medida entre 450 e 550 nm.

Os parâmetros analisados descritos acima foram mensurados em leitor de microplacas multimodo SpectraMax M5 (VWR International, EUA). O sódio e o potássio foram determinados com fotômetro de chama DM-61 (Digimed, Brasil), com diluição 1:100.

5.4.5 Análises estatísticas

Todos os parâmetros investigados tiveram os seus resultados calculados para o primeiro e terceiro quartis, para a retirada de valores outliers. Os testes estatísticos levaram em consideração os fatores PaO_2 , pH, parâmetros sanguíneos e bioquímicos como variáveis dependentes e como elas poderiam ser influenciadas pelos tratamentos aos quais os animais foram submetidos (variáveis dependentes). Para isso, foi desenvolvido no software R (R CORE TEAM, 2017), utilizando RStudio (2015), com os pacotes base psycho (MAKOWSKI 2018), lme4 (BATES *et al.* 2015) e lmerTest (KUZNETSOVA; BROCKHOFF; CHRISTENSEN 2017), um modelo linear misto. Foi feito um teste *post hoc* de Tukey, para verificar as diferenças entre os diferentes tratamentos e combinações de tratamentos. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, e foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

Figura 5.1 Pressão parcial arterial de oxigênio (PaO₂) de *P. geoffroanus* quando exposto à diferentes concentrações de oxigênio aéreo e aquático.

Dados apresentados com valores individuais, média e desvio padrão. * aponta diferenças estatísticas entre a condição controle e os demais tratamentos. Fonte: Cordeiro, 2019

5.5 RESULTADOS

Os valores de PaO_2 foram obtidos a partir de nove indivíduos de *P. geoffroanus* enquanto que os demais parâmetros fisiológicos e bioquímicos analisados foram coletados de dezoito animais. A PaO_2 de *P. geoffroanus* foi significativamente maior quando os animais foram expostos às condições de normóxia aérea e aquática, em relação aos demais tratamentos (Fig. 5.1). Os valores de P foram menores que 0,0001 entre a condição controle e os tratamentos que envolviam diferentes concentrações de oxigênio no ar e/ou na água. Em condições de normóxia aérea e aquática, os valores de PaO_2 variaram entre 13,779 e 120,123 mmHg, uma alta variação entre os espécimes que não foi observado nos demais tratamentos.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 1). A osmolalidade de *P. geoffroanus* também variou estatisticamente entre os tratamentos. Entre os íons que compõem o sangue, o sódio e os cloretos foram os que apresentaram maior concentração, mas não ficou estabelecida uma relação entre os valores desses íons e a exposição dos animais às diferentes concentrações de oxigênio aéreo e aquático.

Tabela 5.1 Valores dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos de *P. geoffroanus* expostos a diferentes concentrações oxigênio no meio aéreo e aquático.
Dados apresentados com média $\pm$ desvio-padrão.

	Normóxia aérea Normóxia aquática	Anóxia aérea Normóxia aquática	Anóxia aérea Anóxia aquática	Anóxia aérea Hiperóxia aquática (cloaca)	Anóxia aérea Hiperóxia aquática (boca)
PaO ₂ (mmHg)	73,153 $\pm$ 38,031	13,563 $\pm$ 5,206*	10,241 $\pm$ 3,869*	10,750 $\pm$ 1,947*	15,557 $\pm$ 8,635*
pH	7,791 $\pm$ 0,789	7,794 $\pm$ 0,586	8,075 $\pm$ 0,390	8,063 $\pm$ 0,713	8,419 $\pm$ 0,314
Hemoglobina (g/dL)	5,835 $\pm$ 2,304	6,370 $\pm$ 1,378	6,423 $\pm$ 2,008	6,716 $\pm$ 1,486	6,1506 $\pm$ 2,553
Hematócrito (%)	13,176 $\pm$ 4,081	13,944 $\pm$ 3,509	13,714 $\pm$ 5,124	13,615 $\pm$ 3,184	13,967 $\pm$ 1,272
Eritrócitos (eritrócitos/ μ L)	429,000 $\pm$ 130,400	535,667 $\pm$ 215,040	440,000 $\pm$ 121,535	405,333 $\pm$ 184,492	373,889 $\pm$ 91,610
Osmolalidade (mOsm/L)	252,750 $\pm$ 22,273	259,63 $\pm$ 29,493	256,690 $\pm$ 26,691	259,93 $\pm$ 26,901	261,100 $\pm$ 31,995
Sódio (mEq/L)	116,190 $\pm$ 18,823	111,87 $\pm$ 14,599	114,75 $\pm$ 14,379	127,770 $\pm$ 25,740	131,500 $\pm$ 25,774
Potássio (mEq/L)	4,183 $\pm$ 1,132	3,9467 $\pm$ 0,497	4,057 $\pm$ 0,879	4,220 $\pm$ 1,455	4,240 $\pm$ 0,334
Cálcio (mg/dL)	7,475 $\pm$ 3,860	8,278 $\pm$ 3,015	6,2547 $\pm$ 2,541	6,222 $\pm$ 3,246	5,517 $\pm$ 2,342
Magnésio (mg/dL)	32,626 $\pm$ 15,614	39,281 $\pm$ 19,915	41,382 $\pm$ 24,568	45,007 $\pm$ 27,738	50,758 $\pm$ 29,637
Cloretos (mEq/L)	67,919 $\pm$ 18,118	77,663 $\pm$ 8,190	81,365 $\pm$ 7,146	69,065 $\pm$ 18,174	86,011 $\pm$ 22,841
Glicose (mg/dL)	78,587 $\pm$ 59,536	86,614 $\pm$ 31,144	118,010 $\pm$ 46,685	107,040 $\pm$ 63,654	88,274 $\pm$ 45,893
Lactato (mg/dL)	43,044 $\pm$ 23,847	49,664 $\pm$ 19,376	41,178 $\pm$ 23,767	53,580 $\pm$ 25,317	70,988 $\pm$ 40,687
Íon Bicarbonato mmol/L	17,82 $\pm$ 11,28	13,66 $\pm$ 7,69	12,43 $\pm$ 6,28	13,77 $\pm$ 9,89	13,49 $\pm$ 8,44

* aponta a diferença estatística entre os tratamentos em relação à condição controle (Normóxia aérea e aquática).

O lactato mensurado não apresentou diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, mas foi possível observar que os valores mais altos de lactato foram encontrados em anóxia aérea e hiperóxia aquática (cavidade bucofaringeal). Além disso, o valor de lactato em normóxia aérea e aquática chamou a atenção, medindo desde 12,349 mg.dL⁻¹ e alcançando valores de até 88,007 mg.dL⁻¹. A figura 5.2 mostra que não existe uma relação entre o nível da PaO₂ e a quantidade de lactato no sangue arterial. Nos tratamentos que envolveram anóxia aérea os níveis de lactato não se modificaram estatisticamente, mas podemos observar que em anóxia aérea e aquática o lactato teve valores um pouco menores, inclusive em relação à condição controle.

Observando os resultados do íon bicarbonato, não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os baixos valores encontrados de íon bicarbonato para esse trabalho, principalmente entre os tratamentos que expuseram os animais à anóxia aérea, mostraram uma independência entre os valores de pH e os valores de HCO₃⁻ (Fig. 5.3).

Figura 5.2 Efeito das exposições de *P. geoffroanans* a diferentes $P_{\text{águaO}_2}$ e P_{arO_2} sobre o P_{aO_2} e lactato

Valor apresentado como média e erro padrão. As cores representam: preto, normoxia aérea e aquática (bursa cloacal); verde, anóxia aérea e normoxia aquática; amarelo, anóxia aérea e aquática, (bursa cloacal); azul, anóxia aérea e hiperóxia aquática (bursa cloacal) e; vermelho, anóxia aérea e hiperóxia aquática (cavidade bucofaringeal). Fonte: Cordeiro, 2019

Figura 5.3 Efeito das exposições de *P. geoffroanans* a diferentes $P_{\text{águaO}_2}$ e P_{arO_2} sobre o pH e HCO_3^- .

Valor apresentado como média e erro padrão. As cores representam: preto, normoxia aérea e aquática (bursa cloacal); verde, anóxia aérea e normoxia aquática; amarelo, anóxia aérea e aquática, (bursa cloacal); azul, anóxia aérea e hiperóxia aquática (bursa cloacal) e; vermelho, anóxia aérea e hiperóxia aquática (cavidade bucofaringeal). Fonte: Cordeiro, 2019

5.6 DISCUSSÃO

5.6.1 Crítica aos métodos

5.6.1.1 *Uso do sensor de oxigênio óptico*

O sensor de oxigênio de fibra óptica usado no trabalho (OXROB10, PyroScience, Alemanha) mensura a quantidade de moléculas de oxigênio livres por meio de sensores luminescentes de oxigênio com elevada precisão e baixo tempo de resposta. No presente estudo, o tempo de reação quando o sensor era mergulhado na alíquota de sangue era por volta de um segundo e o tempo necessário para que o resultado da amostra se estabilizasse era por volta de dois minutos.

O sensor usado neste trabalho foi uma sonda robusta, com 3 mm de diâmetro. Essa sonda tinha um tamanho que excedia o diâmetro da artéria subclávia e por essa razão o sangue teve que ser coletado para a amostragem de PaO₂. Alguns trabalhos publicados usaram mini ou microsensores de oxigênio e os mesmos foram implantados diretamente nos vasos sanguíneos, realizando uma medida em tempo real do PO₂ do sangue *in vivo* (FORMENTI *et al.*, 2015; ALMENDROS *et al.*, 2019).

As amostras de sangue destinadas à análise de PO₂ tiveram breve contato com o ar atmosférico, devido ao espaço da seringa e do Eppendorf, onde o sangue era depositado, não terem sido totalmente preenchidos com a amostra, e também no tempo de transferência do sangue da seringa para o Eppendorf e o seu posterior isolamento do ar atmosférico. Esses fatores podem ter influenciado nos resultados de PaO₂, justificando altos valores de PaO₂ em condições de normóxia aérea.

5.6.1.2 *Tempo de exposição aos tratamentos*

A resposta ventilatória às diferentes concentrações de oxigênio ao qual o animal foi exposto depende de diversos fatores, como tempo, intensidade e padrão de exposição (POWELL *et al.*, 1998). Neste trabalho, *P. geoffroanus* foi exposto continuamente por quarenta minutos à normóxia e anóxia aérea e à normóxia, anóxia e hiperóxia aquática. Esse tempo foi considerado satisfatório para se obter as respostas fisiológicas crônicas, visto que respostas à hipóxia e anóxia de médio prazo podem envolver alterações em diferentes níveis da cascata de transporte de oxigênio, afetando inclusive o PO₂ (PORTEUS *et al.*, 2011), um dos objetos de interesse deste trabalho.

Além do tempo de exposição, a ventilação mecânica (900 ml.min⁻¹) a vazão de água para a cavidade bucal e bolsas cloacais (400 a 1000 L.h⁻¹) foram escolhidas para garantir que, no caso

de resposta ventilatória aos diferentes tratamentos, esta seria observada após o tempo de exposição pré-determinado. Para nível de comparação, quando *P. geoffroanus* foi exposto à hipóxia progressiva, a ventilação ($\dot{V}_E$) alcançou valores máximos de $28,33 \pm 12,72 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (média $\pm$ desvio padrão) em hipóxia severa (3% O_2), após uma hora e meia de exposição.

5.6.1.3 Trabalhar com animais anestesiados

A instrumentalização de animais anestesiados para a realização de procedimentos experimentais apresenta vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração no momento do delineamento experimental. Para este estudo, o uso do protocolo experimental com o animal anestesiado foi adequado devido à: 1) possibilidade do controle mecânico da ventilação aos pulmões e da irrigação de água para o animal, tanto na cavidade bucal quanto na cloaca; 2) se evitar movimentos que pudessem causar deslocamento da cânula que impedissem a coleta de sangue e consequente perda do indivíduo; 3) se evitar a perturbação nos resultados por motivos de respostas comportamentais aos diferentes tratamentos (HICKS; WANG, 1999; CORDEIRO *et al.*, 2016) e; 4) se garantir que o PaO_2 medido seja resultado somente do metabolismo basal.

Em compensação, com o animal anestesiado se tornou inviável medir as respostas ventilatórias aos diferentes tratamentos, pois o pentobarbital sódico promove parada respiratória. A anestesia também poderia atenuar a resposta aos diferentes tratamentos (CROSSLEY *et al.*, 2000), decorrente da redução do fluxo sanguíneo sistêmico (HICKS; WANG, 1999).

5.6.2 Dados fisiológicos

5.6.2.1 PaO_2

A PaO_2 de *P. geoffroanus* foi menor quando os animais foram expostos à anóxia aérea e não diferiram entre esses tratamentos, mesmo quando os animais foram expostos à anóxia ou hiperóxia aquática. Mesmo a exposição desses animais à hiperóxia aquática não foi capaz de produzir valores de PaO_2 similares ou maiores do que quando esses animais foram expostos à normóxia aérea e aquática. Este resultado evidencia a ausência de absorção de oxigênio por vias extrapulmonares. *P. geoffroanus* é uma espécie de quelônio pertencente à família Chelidae, que possuem representantes que apresentam respiração bimodal. Os quelônios da família Chelidae podem realizar as trocas gasosas com o meio aquático por meio da cavidade bucofaringeal, como ocorre em *Elseya latisternum* (KING; HEATWOLE, 1994), ou as bolsas cloacais, como é o caso em *Rheodytes leukops* (LEAGLER; CANN, 1980; GORDOS; FRANKLIN, 2002).

Belkin (1968) relatou que em quelônios da família Kinosternidae a respiração aquática pode ser suficiente para manter o metabolismo do animal em repouso. *S. minor* aumentou a porcentagem das trocas gasosas aquáticas de 3,4 para 22,2% com o aumento da PO_2 na água, de uma condição normóxica para hiperóxica. Membros da família Trionychidae, Emydidae e Chelydridae também são conhecidos por promover trocas gasosas por vias extrapulmonares. *Staurotypus triporcatus* e *Kinosternon leucosternum* captam até 16% do oxigênio do meio aquático (BAGATTO; HENRY, 2000). *Apalone spinifera* (STONE *et al.*, 1992) e *Apalone ferox* (BAGATTO; HENRY, 1999) absorvem por volta de 38% do oxigênio do meio aquático. *Pelodiscus sinensis japonicus* (WANG *et al.*, 1999), consome em média 67,7% do O_2 obtido do ambiente aquático por meio da cavidade faríngea e 32,3% por meio da pele. Jackson e colaboradores (2004) testaram o requerimento metabólico de *C. picta belli* quando os animais estavam submersos com a temperatura à 10°C e observaram que com a impossibilidade de se realizar a respiração aérea, esses animais aumentaram o suprimento de O_2 aquático de 25 para 67%. O auge do consumo de oxigênio provindo do ambiente aquático foi registrado para *Rhedytes leukops* (GORDOS; FRANKLIN, 2002). Essa espécie chega a absorver 70% do oxigênio demandado pelo organismo através das bolsas cloacais. Observando essa breve síntese, é possível compreender que quelônios aquáticos podem ter diferentes níveis de eficiência de trocas gasosas aquáticas.

Apesar de não ter sido evidenciado a respiração bimodal em *P. geoffroanus* neste trabalho, esses animais são capazes de permanecerem longos períodos submersos e sem acesso ao oxigênio aéreo, mantendo o seu metabolismo basal. Neste caso, o tempo de submersão não tem relação com a pressão parcial de oxigênio na água ao qual o animal é exposto, assim como foi descrito em *Trachemys scripta* (BELKIN, 1968).

A grande variabilidade entre os valores da PaO_2 de *P. geoffroanus* pode ser resultado de diferentes fatores, visto que Williams e Hicks (2016) observaram que *T. scripta* não regulou rigorosamente a PaO_2 , ao longo de observações em animais sem perturbações e sem restrições por alguns dias. Assim como hipotetizaram Williams e Hicks (2016), essa irregularidade dos níveis de oxigênio arterial neste trabalho pode estar relacionados com a atuação dos shunts cardíacos, o baixo metabolismo da espécie e a alta tolerância à hipóxia. Apesar deste trabalho ter sido realizado com os animais anestesiados, a variabilidade dos valores de PaO_2 podem ser uma indicação de que esses fatores ainda possam estar influenciando a pressão parcial de oxigênio arterial.

5.6.2.2 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos, como hemoglobina, hematócrito e eritrócito, não se modificaram quando os animais foram expostos às diferentes concentrações de oxigênio nos ambientes aéreo e aquático. Os valores encontrados neste trabalho se assemelham com os valores dos parâmetros hematológicos mensurados por Ferronato e colaboradores (2009) em espécimes de *P. geoffroanus*. No trabalho de Ferronato e colaboradores (2009) os animais usados no estudo foram coletados em corpos d'água poluídos e os resultados encontrados não foram considerados um padrão para a espécie porque não haviam sido realizadas medidas na espécie com animais de cativeiro ou que habitassem ambientes não poluídos. Os nossos resultados podem corroborar que esses valores devem ser considerados padrão para a espécie, uma vez de que os animais do presente estudo foram mantidos em condições livre de poluição por muitos meses antes de serem submetidos aos experimentos. Nesse caso, fatores ambientais como poluição e nível de oxigênio aquático e/ou aéreo não influenciam nesses parâmetros fisiológicos.

5.6.2.3 Íons bicarbonato e P_aCO_2

Os valores de íons bicarbonato encontrados em *P. geoffroanus* estão entre os mais baixos entre quelônios aquáticos já estudados. Assim como em *Rheodytes leukops* (GORDOS *et al.*, 2004), os níveis de HCO_3^- em *P. geoffroanus* foram de um terço à metade dos níveis encontrados em *Chrysemys picta belli*, *Elseya novaeguineae*, *Emydura subglosa*, *Graptemys geographica*, *Pelomedusa subglosa*, *T. scripta elegans* (JACKSON *et al.*, 1974; WEST *et al.*, 1989; CROCKER *et al.*, 1999; CROCKER *et al.*, 2000).

Algumas espécies de quelônios aquáticos, *T. scripta* (BAGATTO; HENRY, 1999) não apresentam papel relevante das estruturas extrapulmonares para a absorção de oxigênio, mas essas estruturas são importantes para a excreção de CO_2 . Essa possibilidade pode explicar baixos valores de íon bicarbonato mesmo em condições de normóxia aérea e aquática. *P. geoffroanus* pode possivelmente usar a pele, as bolsas cloacais e/ou a cavidade bucofaringeal como locais de perda de dióxido de carbono para a água, e evitando, dessa forma, a acidose respiratória nos períodos não ventilatórios (ULTSCH; JACKSON, 1982; CROSSLEY *et al.*, 1998).

5.6.2.4 Hipometabolismo em quelônios, tolerância à anóxia e metabolismo anaeróbico

Cordeiro e colaboradores (2016) apontaram que as demandas metabólicas *P. geoffroanus* são mais baixas devido ao baixo consumo de oxigênio atmosférico, quando comparadas com outras espécies quelônios aquáticos (KINNEY; WHITE, 1977; STOCKARD; GATTEN, 1983;

JACKSON, 1985; BAGATTO; HENRY, 1999). Este trabalho reitera essa evidência, considerando que não houve manutenção ou aumento da PaO₂ entre as condições de anóxia e hiperóxia aquática. Com animais não anestesiado, o consumo de oxigênio em *P. geoffroanus* alcançou somente $0,07 \pm 0,03 \text{ mL O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ em normóxia aérea (CORDEIRO *et al.*, 2016). A depressão metabólica ou o hipometabolismo, como uma adaptação de *P. geoffroanus*, pode ser um importante mecanismo para a manutenção da vida desses animais, sem que aja necessidade dos animais se deslocarem até a superfície para realizarem as trocas gasosas aéreas (STONE *et al.*, 1992; HOCHACHKA; LUTZ, 2001).

Dessa forma, a depressão metabólica acaba por beneficiar os animais, tornando-os mais tolerantes à anóxia, reduzindo a sua demanda energética por meio da regulação da demanda do ATP (HICKS; WANG, 2004). Essa regulação metabólica vem sendo investigada a nível celular durante a anóxia (NILSSON *et al.*, 1990; LAND E HOCHACHKA, 1994; STOREY, 1996; FRASER *et al.*, 2001). Jackson (2001) sugere que, em ambientes anóxicos, quelônios podem suprimir o metabolismo a partir da drástica diminuição do consumo de ATP, assim como reduzir a atividade das vias produtoras de ATP.

Na contramão, a tolerância à anóxia de *P. geoffroanus* deve depender do aumento da produção do ATP anaeróbico (LUTZ; NILSSON, 1997; STAPLES; BUCK, 2009; MADSEN *et al.*, 2013). O ATP anaeróbico produzido é crucial para manter o mínimo de atividade neural, enquanto que a tolerância à anóxia é responsável por até 80% da redução eletroencefalográfico de quelônios *in vivo* durante a anóxia (FERNANDES *et al.*, 1997).

O uso da estratégia do metabolismo anaeróbico em *P. geoffroanus* pode perpassar por questões ecológicas e comportamentais. Como esses animais aparentemente não utilizam o O₂ dissolvido disponível pode-se hipotetizar uma maior dependência da espécie ao metabolismo anaeróbico, levando ao desenvolvimento da acidose metabólica (ULTSCH *et al.*, 1999; HOCHACHKA AND LUTZ, 2001; BAGATTO AND HENRY, 2000; REESE *et al.*, 2001).

5.6.2.5 Metabólitos intermediários

O metabolismo anaeróbico esteve presente ao longo de todo o experimento em *P. geoffroanus*. Os altos valores de lactato não se modificaram quando os animais foram expostos aos diferentes tratamentos e são os maiores encontrados entre quelônios, mesmo em condições de normóxia aérea e aquática. Em estudos em que os valores de lactato foram mensurados ao longo do tempo (JACKSON *et al.*, 2004; WARREN *et al.*, 2006; WILLIAMS; HICKS, 2016) foi observado que

houve aumento de lactato, consequência da demanda metabólica, que levou ao aumento do metabolismo anaeróbico em condições de longos períodos não ventilatórios.

Em *P. geoffroanus*, os altos valores de lactato podem ter dois significados: 1) quelônios de água doce conseguem lidar com elevados níveis de lactato em seu organismo devido à sua capacidade de tamponamento, capturando o lactato pelas estruturas ósseas (WARREN; JACKSON, 2008) e; 2) *P. geoffroanus* demandou o metabolismo anaeróbico mesmo em condições de normóxia aérea e aquática.

Em conclusão, não há evidências fisiológicas de que *P. geoffroanus* anestesiados possam realizar trocas gasosas por meio das bolsas cloacais e cavidade bucofaringeal. Considerando esse resultado e o fato de *P. geoffroanus* apresentar altos níveis de lactato ao longo de todo o desenvolvimento do estudo, algumas hipóteses podem levantadas: 1) *P. geoffroanus* pode reduzir suas demandas metabólicas, entrando num estado hipometabólico que pode estar relacionados a inúmeros fatores fisiológicos e celulares, como ajustes cardiorrespiratórios, densidade mitocondrial e nível de atividade dessas organelas; 2) a manutenção de uma demanda de energia basal pode ser transferida para o metabolismo anaeróbico e os animais precisam ter mecanismos para neutralizar o acúmulo do lactato. Uma sequência desse estudo seria a coleta dos parâmetros investigados nesta tese em *P. geoffroanus* não anestesiados e em condições de aumento da demanda metabólica, como momentos pós-prandiais, aumento do nível de atividade ou em fêmeas grávidas, além do estudo da atividade celular da espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese se iniciou com o final do meu mestrado, a partir de novas perguntas que surgiram das discussões a respeito da taxa metabólica de *P. geoffroanus*. Porque assim deve ser a ciência: mais do que trazer respostas para os problemas que são investigados, o trabalho do cientista é suscitar novos questionamentos, elencar novas e testar novas hipóteses. Este trabalho se iniciou com uma pergunta central provindas de pesquisas anteriores. Agora este trabalho foi finalizando, propondo novas questões.

Com o desenvolvimento dos cinco capítulos anteriores desta tese, podemos observar que a baixa taxa metabólica de *Phrynops geoffroanus* implica em diferentes respostas morfofisiológicas que foram elucidadas ao longo desta tese. O capítulo 2, sobre a elaboração de um protocolo anestésico para a espécie, é um produto direto desta característica de *P. geoffroanus*. Testes preliminares com outras doses e combinações anestésicas não alcançaram o nível anestésico necessário para uma manipulação mais invasiva na espécie. O protocolo anestésico proposto neste trabalho é mais uma alternativa do uso da combinação da cetamina e midazolam de forma eficiente para sedação e anestesia de *P. geoffroanus*, outros quelônios e répteis em gerais. A proposta inicial de protocolo experimental teve que ser modificada para a realização dos experimentos com os animais anestesiados e, por essa razão, foi inviabilizado o uso do protocolo anestésico que foi testado e aprovado neste capítulo.

Sobre a pergunta central deste trabalho, podemos concluir por meio dos dados obtidos aqui que *P. geoffroanus* não realiza respiração extrapulmonar em proporções consideráveis para a manutenção do metabolismo basal da espécie. As diferentes abordagens, comportamental, morfológica e fisiológica, negaram a hipótese deste trabalho por meio de diferentes métodos.

Na abordagem comportamental observamos que *P. geoffroanus* foi capaz de passar longos períodos submersos e que a maior parte desse tempo os animais permaneceram em repouso. Quando os indivíduos de *P. geoffroanus* tinham o acesso ao ar interrompido, os animais sobreviveram por duas horas e apresentaram diferenças no tempo de atividade em relação ao tempo em que eles tinham acesso livre a superfície aérea. Era esperado que, no caso de haver porcentagens consideráveis das trocas gasosas entre o animal e o meio aquático, o tempo de atividade não se modificaria, o que não foi observado.

As análises morfológicas do integumento, da cavidade bucofaringeal, das bolsas cloacais e dos pulmões descartaram, a pior, a hipótese que a trocas gasosas aquáticas poderiam ser realizadas

por meio da pele e da boca. Esses locais não preencheram todos os critérios necessários para serem considerados trocadores de gases com o ambiente aquático. As partes do integumento investigados, apesar da grande área superficial que fica em contato com água, apresenta poucos vasos e é composta por um extenso epitélio. O palato duro e o palato mole são regiões que também tem vasos sanguíneos bem espaçados e um epitélio estratificado que impede a eficiência das trocas gasosas nesses locais.

Quando as bolsas cloacais foram analisadas e quantificadas, observou-se que, apesar da presença dos vilos, que aumentariam a área superficial; a presença de tecido muscular que permite que as bolsas cloacais se expandam e retraiam, criando um fluxo de água para dentro das estruturas; e de uma extensa rede de capilares presentes na lâmina própria, logo abaixo do epitélio pseudoestratificado, distribuídas principalmente na região do cólo das bolsas cloacais, a distância de difusão é uma questão que provavelmente inviabiliza intensas trocas gasosas nessas estruturas. Apesar desta tese não trazer os valores de distância de difusão das bolsas cloacais e pulmões, e com isso também não calculou a capacidade morfológica de difusão de O_2 e CO_2 , visualmente essas diferenças são claras. Quando comparamos parâmetros de volume e área superficial respiratória padronizados pela massa, fica claro que os pulmões detêm a principal superfície para as trocas gasosas em *P. geoffroanus*.

A essa altura do projeto, a pergunta geral deste trabalho já havia sido respondida. No entanto, o objetivo deste trabalho desde o começo foi estabelecer relações entre os aspectos morfológicos, os ajustes fisiológicos e as respostas comportamentais a esses ajustes. Dessa forma, a abordagem fisiológica poderia elucidar quais estratégias *P. geoffroanus* emprega para a manutenção das baixas demandas metabólicas da espécie.

Levando em consideração os resultados das abordagens comportamentais e morfológicas, os experimentos fisiológicos confirmaram que *P. geoffroanus* não era capaz de absorver oxigênio por meio da cavidade bucofaringeal e das bolsas cloacais, mesmo em condições de hiperóxia aquática. Esta conclusão se deu principalmente com a observação dos valores de PO_2 arterial. Mas uma resposta que não era esperada neste trabalho e nos motivou a pensar em novas hipóteses foram os resultados dos metabólitos intermediários. Os altos valores de lactato chamaram a atenção e nos levaram a crer que *P. geoffroanus* atende parte da sua demanda metabólica realizando metabolismo anaeróbico. Mais do que isso, os níveis de metabolismo anaeróbico parecem não se modificar em condições de normóxia e anóxia, ao contrário do que foi observado

em outras espécies, que conseguem acumular grandes quantidades de lactato na carapaça quando submetidos às condições ambientais de anóxia aquática durante períodos de hibernação.

Esta tese cumpriu o seu objetivo principal e agora é possível concluir que *P. geoffroanus* não tem a capacidade de realizar trocas gasosas por meio de estruturas extrapulmonares com o ambiente aquático. Ao encerrarmos essa questão, atentamos que a mesma só pode ser respondida plenamente devido ao uso de uma abordagem integrativa. A complexidade de um organismo é percebida pela integração dos seus sistemas e pelas diferentes formas de resposta a um estímulo ambiental. Investigações fisiológicas precisam cada vez mais se atentar aos múltiplos parâmetros que podem se modificar em uma espécie e interferir nos resultados finais. Como já foi discutido ao longo dos capítulos, as adaptações morfológicas das superfícies respiratórias refletem nos parâmetros fisiológicos da respiração, e o comportamento nada mais é do que a representação das respostas fisiológicas por meio de reações ao ambiente e que podem modificar o repertório comportamental.

Como prometido, agora este trabalho é finalizando propondo novas questões. A primeira delas diz respeito à função das bolsas cloacais. Se essas estruturas não servem às trocas gasosas, qual seria a função delas? Essa pergunta gera hipóteses, como o uso das bolsas cloacais para manutenção da homeostase osmótica dos animais e/ou a função das bolsas cloacais estarem atreladas ao ajuste da flutuabilidade em *P. geoffroanus*.

A segunda questão tem relação com a função das bolsas cloacais em situações extremas. Se *P. geoffroanus* for submetido ao mergulho forçado, as propriedades encontradas nas bolsas cloacais que preveem trocas gasosas com o ambiente aquático seriam suficientes para garantir a sobrevivência dos animais por longos períodos com taxas metabólicas muito reduzidas?

A terceira questão se refere ao metabolismo anaeróbico de *P. geoffroanus*. Como e por que *P. geoffroanus* sustenta parte da sua demanda metabólica por meio do metabolismo anaeróbico? Para responder a essa pergunta, é necessário se voltar à investigação ao nível celular, como o estudo do nível de atividade mitocondrial desses animais.

A sequência investigativa que incluiu o meu mestrado e este doutorado resultou em inferências comportamentais e morfofisiológicas de uma espécie da fauna brasileira, que se somam a poucos trabalhos comportamentais, morfológicos e fisiológicos já publicados. Quando se diz respeito aos trabalhos de fisiologia da respiração em quelônios que tem distribuição geográfica ao longo do território brasileiro, menos ainda se sabe. Essa lacuna de conhecimento tem grande potencial de

desenvolvimento ao longo dos próximos anos, com a formação de pesquisadores que estão sendo formados no Laboratório de Morfo-Fisiologia dos Vertebrados, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, sob a orientação do Prof. Dr. Wilfried Klein.

7. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN P. A.; MORGAN J. D.; IWAMA G. K. Les anesthésiques. In : CCPA (ed.). **Information additionnelle au sujet des lignes directrices du CCPA sur le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests.** Conseil Canadien de Protection des Animaux, 1-25, 2005. Disponível em: http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Fish/Fish%20Anesthetics%20-%20FR.pdf
- ALHO, C. J. R; PÁDUA, L. F. M. Reproductive parameters and nesting behavior of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae) in Brazil. **Can. J. Zool.** 60(1), 97-103, 1982.
- ALIBARDI, L.; TONI, M. Immunolocalization and characterization of beta-keratins in growing epidermis of scutes and claws of chelonians. **Tissue and Cell** 38:53–63, 2005.
- ALMENDROS, I. et al. Placental oxygen transfer reduces hypoxia-reoxygenation swings in fetal blood in a sheep model of gestational sleep apnea. **J. Ap. Physiol.** v. 127, n. 3, p. 745-752, 2019.
- ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. **Behavior.** 49: 227-267, 1973.
- ANDERSON, J. On the cloacal bladders and on the peritoneal canals in Chelonia. **J. Linn. Soc. Zoo.** v. 12, p. 434-444.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Gas Exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis merianae*. **J. Exp. Biol.** 202, 3677-3685, 1999.
- ANGILLETTA JR., M. J.; NIEWIAROWSKI, P. H.; NAVAS, C. A. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **J. Ther. Biol.**, 27, 249–268, 2002.
- ARAÚJO, A. P. R. V. **Contribuição para o estudo do comportamento do cágado-mediterrânico *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812), Testudines: Emydidae.** Tese de dissertação de Mestrado. ISPA, Lisboa, 1996.

ASHLEY, L. M. Laboratory anatomy of turtle. **Wm. C. Brown Co.**, Dubuque, Iowa. 48, 1955.

AUFFENBERG, W. Display behavior in tortoises. **Am. Zool.** v. 17, p. 241-250, 1977.

ÁVILA-JÚNIOR, R. H. **Efeitos anestésicos do propofol e do etomidato isolados e associados com butorfanol e fentanila em tartaruga-da-Amazônia** (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 31, 2005.

AXELSSON, M. et al. A novel fully implantable multi-channel biotelemetry system for measurement of blood flow, pressure, ECG and temperature. **J. Ap. Physiol.** v. 102, p 1220 – 1228, 2007.

BABAK, E. Die Mechanik und Innervation der Atmung. Handbuch der ver-gleichenden Physiologie, herausgeg. von H. Winterstein, Bd. I/II, 1921.

BAGATTO, B. et al. Bimodal respiration in two species of central American turtles. **Copeia.** v. 1997, n. 4, p. 834–839, 1997.

BAGATTO, B.P. Exercise and forced submergence in the pond slider (*Trachemys scripta*) and softshell turtle (*Apalone ferox*): Influence on bimodal gas exchange, diving behavior and blood acid-base status. **J. Exp. Biol.** v. 202, p. 267-278, 1999b.

BAGATTO, B. P.; R. P. HENRY. Aerial and aquatic respiration in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **J. Herp.** v. 33, p. 490-492, 1999a.

BAGATO, B; HENRY, R. P. Bimodal respiration and ventilation behavior in two species of Central American turtles: effects of forced submergence. **Comp. Bioch. Physiol. A.** v. 126, p. 57-63, 2000.

BAPTISTOTTE, C.; THOMÉ, C. A.; BJORN DAL, K. A. Reproductive biology and conservation status of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Espírito Santo, Brazil. **Chel. Cons. Biol.** v. 4, n. 3, p. 1-7, 2003.

BATES, D. et al. "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." **J. Stat. Soft.** **67**. n. 1, p. 1–48, 2015.

BAÚ, P. T. **Mecânica ventilatória, padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação em *Trachemys scripta* e *Chelonoidis carbonarius* (Testudines: Cryptodira)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. p. 73, 2016.

BECK, R. The common long-necked tortoise *Chelodina longicollis* (Shaw 1802) (Testudines: Chelidae): a comparative study of the morphology and behaviour of disjunct populations. **S. Aust. Nat.** v. 66, p. 4–21, 1991.

BELKIN, D.A. Aquatic respiration and underwater survival of two freshwater turtle species. **Respir. Physiol.** v. 4, p. 1–14, 1968.

BELS, V. L.; CRAMA, Y. J. M. Quantitative analysis of the courtship and mating behavior in the loggerhead musk turtle *Sternotherus minor* (Reptilia: Kinosternidae) with comments on courtship behavior in turtle. **Copeia**, p. 676–684, 1994.

BENNET, R. A. A review of anesthesia and chemical restraint in reptiles. **J. Zoo Wild. Med.** v. 22, n. 3, p. 282-303, 1991.

BENNETT, R. A. **Anesthesia. In: Mader, D. R.(ed.). Reptile Medicine and Surgery.** W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania. p. 241–247, 1996.

Berridge, M.J.; Oschman, J.L. **Transporting Epithelia.** Academic Press, New York, 1972.

BICKHAM, J. W. et al. An annotated list of modern turtle terminal taxa with comments on areas of taxonomic instability and recent change. **Chel. Res. Mon.** v. 4, p. 173-199, 2007.

BIENZLE, D.; BOYD, C. J. Sedative effects of ketamine and midazolam in snapping turtles (*Chelydra serpentina*). **Journal of Zoology Wildlife Medicine**, v. 23, p. 201-204, 1992.

BISBY, F.A. et al. **Species 2011 & ITIS Catalogue of Life: 2012 Annual Checklist**, 2012. Available via <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2012/info/ac> [visitado em 24/02/2013].

BJORNDAL. et al. Population structure and diversity of Brazilian green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. **Chelonian Conservation and Biology**. v. 84, n. 2, p. 152-268, 2006.

BOJANUS, L. H. **Anatome Testudinae Europaeae**. Vols. 1, 2. Vilnius, Lithuania, 1821.

BONDAR, R. J.; MEAD, D. C. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* in the hexokinase method for determining glucose in serum. **Clin. Chem**. v. 20, n. 5, p. 586– 590, 1974.

BORTOLINI, Z. **Descrição anatomotomográfica do esqueleto apendicular de *Chelonoidis carbonaria*** (Spix, 1824). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 74, 2011.

BOSSO, A. C. S. et al. The use of rocuronium in giant Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testunies, Podocnemididae). **A. Cir. Bras**. v. 24, n. 4, p. 311-315, 2009.

BOYER, D. Hypoxia: Effects on heart rate and respiration in the snapping turtle. **Science**. v. 140, n. 3568, p. 813-814, 1963.

BRAINERD, E. L. New perspectives on the evolution of lung ventilation mechanisms in vertebrates. **Exp. Biol. On**. v.4, n. 2, p. 11-28, 1999.

BRAINERD, E. L.; OWERKOWICZ, T. Functional morphology and evolution of aspiration breathing in tetrapods. **Respir. Physiol. Neurob**. v. 154, p. 73-88, 2006.

BRANDÃO, R. A. et al. **Notes on distribution and habitats of *Acanthochelys spixii* and *Phrynops vanderhaegei*** (Testudines, Chelidae) in Central Brazil, 2002.

BRITES, V. L. D.; RANTIN, F. T. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two áreas of the

Uberabinha river. **Environ. Monit. Assess.** v. 96, n. 1-3, p. 273-281, 2004.

BRITO, F. M. M. **Aspectos anátomo-radiográficos e tempo do trânsito gastrintestinal em cágado-debarbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines, Chelidae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Saúde animal)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 46, 2007.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M. V. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Mar. Poll Bull.** v. 42, p. 1330-1334, 2001.

BUJES, C. Atividade de nidificação de *Phrynops hilarii* Duméril & Bibron (Testudines, Chelidae) na Reserva Biológica do Lami, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. Zool.** v.15, p. 921-928, (1998).

BURGGREN, W. W. A quantitative analysis of ventilation tachycardia and its control in two chelonians *Pseudemys scripta* and *Tettudo graeca*. **J. Exp. Biol.** v. 63, p. 367—380, 1975.

BURGGREN, W. W.; SHELTON, G. Gas exchange and transport during intermittent breathing in chelonian reptiles. **J. Exp. Biol.** v. 82, p. 75–92, 1979.

BURGHARDT, G.; WARD, B.; ROSSCOE, R. Problem of reptile play: environmental enrichment and play behavioral in a captive Nile soft-shelled turtle, *Trionyx triunguis*. **Zoo. Biol.** v. 15, n. 3, p. 223-238, 1996.

BURY, R.B. Population ecology of freshwater turtles In: M. Harless & H. Morlock (Eds.). **Turtles: perspectives and research.** John Wiley and Sons, New York, p. 571- 602, 1979.

BUTLER, P.; MILSOM, W.; WOAKES, A. Respiratory, cardiovascular and metabolic adjustments during steady state swimming in the green turtle, *Chelonia mydas*. **J. Comp. Physiol.** v. 154, n. 2, p. 167-174, 1984.

CARPENTER, C.C.; FERGUSON G.W. Variation and evolution of stereotyped behavior in reptiles. In: C. Gans & D. W. Tinkle (Eds.) **Biology of reptilia: ecology and behaviour.** Academic Press, London, p. 335-554, 1977.

CAVALCANTI R. L. et al. Protocolo anestésico em tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*) para celioscopia exploratória. **A. Scie. Vet.** v. 35(Suppl 2), p. s311-s312, 2007.

CERVELLI, M. et al. Structural and sequence evolution of U17 small nucleolar RNA (snoRNA) and its phylogenetic congruence in chelonians. **J. Mol. Evol.** v. 57, n. 1, p. 73-84, 2003.

CHESSMAN, B.C. Food of the snake-necked turtle, *Chelodina longicollis* (Shaw) (Testudines: Chelidae) in the Murray Valley, Victoria and New South Wales. **Australian Wildlife Research.** v.11, p. 573–578, 1984.

CHITTICK, E. J.; STAMPER, M. A.; BEASLEY, J. F. JEAN, F.; LEWBART, V. M. D. Medetomidine, ketamine and sevoflurane for anesthesia of injured loggerhead sea turtle: 13 cases (1996-2000). **J. Am. Vet. Med. Ass.** v. 221, n. 7, p. 1019-1025, 2002.

CIERI, R. L. et al. New insight into the evolution of the vertebrate respiratory system and the discovery of unidirectional airflow in iguana lungs. **PNAS.** v. 111, n. 48, p. 17218-17223, 2014

CLARK N. J., GORDOS; M. A., FRANKLIN, C. E. Thermal plasticity of diving behavior, aquatic respiration, and locomotor performance in the Mary River turtle *Elusor macrurus*. **Physiol. Bioch. Zoo.** v. 81, p. 301–309, 2008.

CLARK, N. J.; GORDOS, M. A.; FRANKLIN, C. E. Diving behaviour, aquatic respiration and blood respiratory properties: a comparison of hatchling and juvenile Australian turtles. **J. Zoo.** v. 275, p. 399-406, 2008.

CLARK N. J.; GORDOS; M. A., FRANKLIN, C. E. Implications of river damming: the influence of aquatic hypoxia on the diving physiology and behaviour of the endangered Mary River turtle. **Anim. Conserv.** v.12, p. 147–154, 2009.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Predation and defence amongst reptiles. **Taunton, R & A Publishing Limited**, VIII+ p. 138, (1994).

CORDEIRO, T. E. F. **Padrão ventilatório e custo metabólico da ventilação de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) e *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinidae, Pleurodira).** Dissertação (Mestrado em Diversidade Animal) – Instituto de Biologia,

Universidade Federal da Bahia, Salvador. p. 95, 2014.

CORDEIRO, T. E. F.; ABE, A. S.; KLEIN, W. Ventilation and gas exchange in two turtles: *Podocnemis unifilis* and *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Pleurodira). **Resp. Physiol. Neurobiol.** v.224, p. 125-131, 2016.

Cragg, P. A. **Respiration and body weight in the reptilian genus Laeerta: a physiological, anatomical and morphometric study.** PhD thesis, Bristol University, UK, 1975.

Cragg, P. Oxygen consumption in the lizard genus *Lacerta* in relation to diel variation, maximum activity and body weight. **J. Exp. Biol.** v. 77, p. 33-56, 1978

Cragg, P. A. Ventilatory patterns and variables in rest and activity in the lizard *Lacerta*. **Comp Biochem Physiol.** v. 60A, p. 399-411, 1978.

CROCKER, C. E.; ULTSCH, G. R.; JACKSON, D. C. The physiology of diving of north-temperate and three tropical turtle species. **J. Comp. Physiol. B.** v. 169, p. 249–255, 1999.

CROCKER, C.E. et al. Physiology of common map turtles (*Graptemys geographica*) hibernating in the Lamoille River, Vermont. **J. Exp. Biol.** v. 286, p. 143–148, 2000.

CROSSLEY, D., ALTIMIRAS, J., WANG, T. Hypoxia elicits an increase in pulmonary vascular resistance of anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*). **J. Exp. Biol.** v. 201, p. 3367–3375, 1998.

CROSSLEY, D. A.; WANG, T.; ALTIMIRAS, J. Role of nitric oxide in the systemic and pulmonary circulation of anesthetized turtles (*Trachemys scripta*). **J. Exp. Zool.** v. 286, n. 7, p. 683-689, 2000.

CRUZ, A. L. C.; PEDRETTI, A. C. E.; FERNANDES, M., N. Steriological estimation of the surface area and oxygen diffusing capacity of the respiratory stomach of air-breathing armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei: Loricariidae). **J. Morphol.** v. 270, n. 5, p. 601-614, 2009.

DANIELS, C.B. et al. The origin and evolution of the surfactant system in fish: insights into the evolution of lungs and swim bladders. **Physiol. Bioch. Zoo.** v. 77, n. 5, p. 732-749, 2004.

- DEL NEGRO, C. A.; KAM, K.; HAYES, J. A.; FELDMAN, J. L (2009). Asymmetric control of inspiratory and expiratory phases by excitability in the respiratory network of neonatal mice in vitro. **J. Physiol.** v. 587, p. 1217-1231.
- DRABKIN, D. L. AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. **J. Biol. Chem.** v. 112, p.51-65, 1935.
- DRUZISKY KA, BRAINERD EL Buccal oscillation and lung ventilation in a semi-aquatic turtle, *Platysternon megacephalum*. **Zoology.** v.104, n. 2, p. 143–152, 2001.
- DUNCKER, H. R. Coelom-Gliederung der Wirbeltiere – Funktionelle Aspekte. *Verh. Anat. Ges.* v. 72, p. 91-112, 1978a.
- DUNCKER, H. R. General morphological principles of amniotic lungs. In J. Piiper (Ed.), **Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic**. Springer, Berlin. P. 2-15, 1978b.
- DUNCKER, H. R.. Stammesgeschichte der Struktur- und Funktionsprinzipien der Wirbeltierlungen. **Verh. Anat. Ges.** v. 75, p. 279–303, 1981.
- DUNCKER, H. R. Vertebrates lungs: structure, topography and mechanics. A comparative perspective of the progressive integration of respiration system, locomotor apparatus and ontogenetic development. **Respir. Physiol. Neurobiol.** v. 144, p. 111-124, 2004.
- DUNSON, W. A. Pharygeal respiration in na Australian chelid tortoise. **Brit. J. Herpetol.** v. 6, p. 65, 1960.
- DUNSON, W. A. Sodium fluxes in freshwater turtles. **J. exp. Zoo.** v. 165, p. 171-182, 1967.
- EATWELL K. Options for analgesia and anaesthesia in reptiles. **In Practice.** v. 32, p. 306–311, 2010.
- EMERY, L. et al. Sedative effects of intranasal midazolam and dexmedetomidine in 2 species of tortoises (*Chelonoidis carbonaria* and *Geochelone platynota*). **J. Exot. Pet. Med.** v.23, n. 4, p. 380–383, 2014.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1989.

FACHÍN-TERÁN, A., VOGT, R. C., GOMEZ, M. F. S. Food habits of na assemblage of five species of turtles in the Rio Guapore, Rondônia, Brazil. **J. Herpetol.** v. 29, n. 4, p. 536-547, 1995.

FACHÍN-TERÁN, A., VOGT, R. C., THORBJARNARSON, J. Padrões de caça e uso de quelônios na Reserva Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. In: Cabrera, E., Mercolli, C., Resquin, R. **Manejo de fauna silvestre em Amazon y Latinoamericana**. Asunción, Paraguay. v. 1, p. 89-100, 2001a.

FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Guaporé (RO), norte do Brasil. **Phyllomedusa**. v. 3, n. 1, p. 29-42, 2004.

FERNANDES, M.N.; MORON, S.E.; SAKURAGUI, M.M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: Fernandes, M.N., Glass, M.L., Rantin, F.T., Kapoor, B.G. (Eds.), **Fish Respiration and Environment**. Science Publishers, Enfield, pp. 93–120.

FERREIRA JR., P. D. et al. Nesting of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) on sandy beaches along the Upper Xingu River, Brasil. **Zool.** v. 28, p. 571-576, 2011.

FERRONATO, B. O. et al. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. Short Communication – **Zoologia**, v. 26, n. 4, p. 795-798, 2009.

FLÔRES, F.N. (2008). Anestesia em tartaruga para a remoção cirúrgica de granuloma – relato de caso. *Revista da Faculdade de Zootecnia e Veterinária e Agronomia*, 15(1), 132-140.

FORMANOWICZ, D. R., JR.; BRODIE, D. R., JR.; WISE, S. C. Foraging behavior of matamata turtles: the effects of prey density and the presence of a conspecific. **Herpetologica**. v. 45, p. 61-67, 1989.

FORMENTI F. et al. Intra-breath arterial oxygen oscillations detected by a fast oxygen sensor in an animal model of acute respiratory distress syndrome. **Br J Anaesth.** v.114, p. 683-638, 2015.

FRANKLIN, C. E. Aquatic respiration and diving in the freshwater turtle, *Rheodytes leukops* (abstract). **J Physiol.** v. 87, p. 523, 2000.

FRASER, K.P.P. et al. Complete suppression of protein synthesis during anoxia with no post-anoxia protein synthesis debt in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans*. *J. Exp. Biol.* 204, 4353–4360.

FRIOL, R. **Filogenia e evolução das espécies do gênero *Phrynops* (Testudines, Chelidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Zoologia).** Instituto de Biociências. p. 109, 2014.

FUJITA, M. K. et al. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. **Mol. Phylo. Evol.** v. 31, p. 1031-1040, 2004.

GADOW, H. 1901. **Amphibia and reptiles.** Cambr. Nat. Hist., Vol. 8, London.

GAFFNEY, E. S.; MEYLAN, P. A. A phylogeny of turtles. In: **The Phylogeny and Classification of the Tetrapods** (ed. M. J. Benton). Oxford: Clarendon Press. P. 157-219, 1988.

GAGE, S. H.; GAGE, S. P. Aquatic respiration in soft-shelled turtles: a contribution to the physiology of respiration in vertebrates. **Am Nat.** v. 20, p.233–236, 1886.

GANS, C.; HUGHES, G. The mechanism of lung ventilation in the tortoise *Testudo graeca* Linné. **J.Exp. Biol.** v. 47, p. 1-20, 1967.

GANS, C.; CLARK, B. D. Studies on ventilation of *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia). **Respir. Physiol.** v. 26, p. 285-301, 1976.

GATTEN, R.E., Jr. Effects of temperature and activity on aerobic and anaerobic metabolism and heart rate in the turtles *Pseudemys scripta* and *Terrapene ornata*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 48, 619–648, 1974.

GATTEN, R.E., Jr. Aerobic metabolism in snapping turtles, *Chelydra serpentina*, after thermal acclimation. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 61: 325–337, 1978.

GATTEN, R. E., Jr. Aerobic and anaerobic metabolism of freely-diving loggerhead musk turtles (*Sternotherus minor*). **Herpetologica**. v. 40, p. 1–7, 1984.

GAUNT, A. S.; GANS, C. Mechanics of respiration in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina* (Linné). **J. Morphol.** v. 128, p. 195–228, 1969.

GEORGES, A. et al. A phlogeny for side-necked turtles (Chelonia: Pleurodira) based on mitochondrial and nuclear gene sequence variation. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 67, p. 213–246, 1999.

GIRGIS, S. Aquatic respiration in the common Nile turtle, *Trionyx triunguis* (Forskal). **Comp. Biochem. Physiol.** v.3, p. 206–217, 1961.

GLASS, M.L., et al. Chemical control of breathing in the lizard, *Varanus exanthematicus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 62A, p. 999–1003, 1979.

GLASS, M. L.; WOOD, S. C.; JOHANSEN, K. The application of pneumotachography on small unrestrained animals. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 59A, p. 425–427, 1978.

GLASS, M.L., BOUTILIER, R.G., HEISLER, N. Effect of body temperature on respiration, blood gases and acid-base status in the turtle, *Chrysemys picta bellii*. **J. Exp. Biol.** v. 114, p. 37–51, 1985.

GONZALEZ, G. N. **Structure and function of cloacal bursae in Cryptodiran turtle (Emydidae and Chelydridae)**. Thesis (Master of Science in Biology), College of Arts, Education, and Sciences, University of Louisiana at Monroe, 67, 2017.

GORDOS, M. A.; FRANKLIN, C. E. Diving behaviour of two Australian bimodally respiring turtles, *Rheodytes leukops* and *Emydura macquarii*, in a natural setting. **J. Zool.** (Lond.). v. 258, p. 335–342, 2002.

GORDOS, M.A. et al. Diving behaviour of *Elseya albagula* from a naturally flowing and hydrologically altered habitat. **J. Zool.** v. 272, p. 458–469, 2007.

GORDOS, M. A.; FRANKLIN, C. E.; LIMPUS, C. J. Seasonal changes in the diel surfacing behaviour of the bimodally respiring turtle *Rheodytes leukops*. **Can J Zool** v. 81, p. 1614–1622, 2003a.

GORDOS, M. A. Seasonal changes in the diving performance of the bimodally respiring freshwater turtle *Rheodytes leukops* in a natural setting. **Can J Zool** 81:617–625, 2003b.

GORDOS, M. et al. Blood-respiratory and acid-base changes during extended diving in the bimodally respiring freshwater turtle *Rheodytes leukops*. **J. Comp. Physiol. B.** v.174, p. 347-354, 2004.

GRAHAM, J. B. Aquatic respiration in the sea snake. **Respir. Physiol.** v. 21, p. 1–7, 1974.

GRAPER, L. Zur vergleichenden Anatomie der Schildkrotenlunge. **Morph. Jb.** v. 68, p. 325-375, 1931.

GREUNZ, E. M. et al. Elimination of intracardiac shunting provides stable gas anesthesia in tortoises. **Nature, Scientific Report**, v. 8, p. 17124, 2018.

GUILLOIN J. M. et al. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. **Contrib Zool** v. 81, p. 147–158, 2012.

GUIRRO, E. C. B. P. et al. Anestesia balanceada em lagarto-teiú (*Tupinambis merianae*): relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, n. 2, p. 458-460, 2010.

GUIX, J. C. et al. Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines, Chelidae). Grupo de Estudos Ecológicos, Série Documentos. v. 1, p. 1–19, 1989.

HAILEY, A.; I. M. COULSOM. The growth pattern of the African tortoise *Geochelone pardalis* and other chelonians. **Canadian Journal of Zoology**. v.77, p. 181– 193, 1999.

HARMS, C. A. et al. Sedation and anesthesia of hatchling leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) for auditory evoked potential measurement in air and in water. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**. v.45, n. 1, p. 86-92, 2014.

HAYS, G.C. et al. The diving behaviour of green turtles at Ascension Island. **Anim. Behav.** v. 59, p. 577–586, 2000.

HEARD, D. J. Reptile anesthesia. **Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice.** v. 4, p. 83–117, 2001.

HEISS, E. et al. The fish in the turtle: on the functionality of the oropharynx in the Common Musk Turtle *Sternotherus odoratus* (Chelonia, Kinosternidae) concerning feeding and underwater respiration. **Anat. Rec.** v. 293, n. 8, p. 1416–1424, 2010.

HEITHAUS, M. R.; FRID, A. Optimal diving under the risk of predation. **J. Theor. Biol.** v. 223, p. 79–92, 2003.

HELMICK, K. E. et al. Intestinal volvulus and stricture associated with a leiomyoma in a green turtle (*Chelonia mydas*). **J. Zoo. Wild. Med.** v. 31, n. 2, p. 221–227, 2000.

HENRY, LIONEL, AND HADLEY WICKHAM. **Purrr: Functional Programming Tools**, 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=purrr>.

HERBERT, C. V.; JACKSON, D. C. Temperature effects on the responses to prolonged submergence in the turtle *Chrysemys picta belli*. I. Blood acid-base and ionic changes during and following anoxic submergence. **Physiol. Zoo.** v. 58, p. 655–669, 1985a.

HERBERT, C. V.; JACKSON, D. C. Temperature effects on the responses to prolonged submergence in the turtle *Chrysemys picta belli*. II. Metabolic rate, blood acid-base and ionic changes, and cardiovascular function in aerated and anoxic water. **Physiol. Zoo.** v. 58, p. 670–681, 1985b.

HICKS, J.W.; WHITE, F.N. Pulmonary gas exchange during intermittent breathing in the American alligator. **Respir. Physiol.** v. 88, p. 23–36, 1992.

HICKS, J.W.; WANG, T. Hypoxic hypometabolism in the anesthetized turtle, *Trachemys scripta*. **Am. J. Physiol.** v. 277, p. R18–R23, 1999.

HICKS J. W.; WANG, T. Hypometabolism in reptiles: Behavioural and physiological mechanisms that reduce aerobic demands. **Resp. Physiol. Neurobio.** v. 141, n. 3, p. 261-271, 2004.

HIRANO, L. K. L. **Contenção farmacológica de jacaré-tinga *Caiman crocodilos* Linnaeus, 1758 com cetamina S (+) e cetamina racêmica, isolada ou em associação com midazolam.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Uberlândia, p. 55, 2011.

HOCHACHKA, P.W., LUTZ, P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 130, p. 435–459, 2001.

HOCHSCHEID, S. Why we mind sea turtles' underwater business: a review on the study of diving behaviour. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v. 450, p. 118-136, 2014.

HOLZ, P.; HOLTZ, R. M. Evaluation of ketamine, ketamine/xylazine, and ketamine/midazolam anesthesia in red-eared sliders. **J. Zoo. Wildl. Med.** v. 25, p. 531-537, 1994.

HOLZ P. et al. The anatomy and perfusion of the renal portal system in the red eared slider (*Trachemis scripta elegans*). **J. Zoo. Wild. Med.** v. 28, n. 4, p. 378-385, 1997a,

HOLZ, P. et al. The effect of the renal portal system on pharmacokinetic parameters in the red eared slider (*Trachemys scripta elegans*). **J. Zoo. Wild. Med.** v. 28, p. 386-393, 1997b.

HOPKINS, S. et al. Ventilation–perfusion relationships in the savannah monitor during treadmill exercise. **J. Exp. Biol.** v. 198, p. 1783–1789, 1995.

HOTHORN, T.; FRANK B.; WESTFALL P. “Simultaneous Inference in General Parametric Models.” **Biomet. J.** v.50, n. 3, p. 346–63, 2008

HOWARD, C.V.; M.G. REED. **Unbiased Stereology— Three-Dimensional Measurement in Microscopy.** 2nd ed, Garland Science/BIOSScientific, 2005.

HSIA C. C. et al. Evolution of air breathing: Oxygen homeostasis and the transitions from water to land and sky. **Compr. Physiol.** v. 3, p. 849–915, 2013.

HUGHES, G. M. et al. Respiratory exchange and body size in the Aldabra giant tortoise. **J. Exp. Biol.** v. 55, p. 651-665, 1971.

JACKSON, D. Buoyancy control in the freshwater turtle, *Pseudemys scripta elegans*. **Science**. v. 166, p. 1649-1651, 1969;

JACKSON, D.C. Respiration and respiratory control in the green turtle, *Chelonia mydas*. **Copeia**, v. 1985, p. 664-671, 1985.

JACKSON, D.C.; PALMER, S.E.; MEADOW, W.L.. The effects of temperature and carbon dioxide breathing on ventilation and acid-base status of turtles. **Respir. Physiol.** v. 20, p. 131-146, 1974.

JACKSON, D.C.; ALLEN, J.; STRUPP, P.K. The contribution of non-pulmonary surfaces to CO₂ loss in 6 species of turtles at 20°C. **Comp. Biochem. Physiol. A**. v. 55, p. 243–246, 1976.

JACKSON, D.C.; PRANGE, H.D. Ventilation and gas exchange during rest and exercise in adult green sea turtles. **J. Comp. Physiol.** v. 134, p. 315–319, 1979.

JACKSON, D. C; SINGER, J. H.; DOWNEY, P. T. Oxidative cost of breathing in the turtle *Chrysemys picta bellii*. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 261, p. R1325-R1328, 1991.

JACKSON, D. C. et al. Avenues of extrapulmonary oxygen uptake in western painted turtles (*Chrysemys picta belli*) at 10°C. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 139, p. 221-227, 2004.

JACOBS, W. Über die hydrostatische Bedeutung der Lungenfüllung bei Wasserschildkröten. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie**. v. 29, p. 249-282, 1942.

JACOBSEN, S. B. et al. Circulating nitric oxide metabolites and cardiovascular changes in the turtle *Trachemys scripta* during normoxia, anoxia and reoxygenation. **J. Exper. Biol.** v. 215, p. 2560-2566, 2012.

JACOBSON, E. R. Chromomycosis and fibrosarcoma in a mangrove snake. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v. 185, p. 1428–1430, 1984.

JEFFREE, R. A.; JONES, M. K. Accumulation of radiocalcium from the aquatic medium via the cloacal and buco-pharynx of australian freshwater turtles (Chelidae). **Comp. Bioch. Physiol.** v. 102A, n. 1, p. 85-91, 1992.

JOHNSON, S.M.; JOHNSON, R.A.; MITCHELL, G.S. Hypoxia, temperature, and pH/CO₂ effects on respiratory discharge from a turtle brain stem preparation. **J. Ap. Physiol.** v. 84, p. 649–660, 1998.

JORGENSEN, C. B. Role of urinary and cloacal bladders in chelonian water economy: historical and comparative perspectives. **Biol. Rev.** v. 73, p. 347-366.

JOYCE, W. et al. Venous pressures and cardiac filling in turtles during apnoea and intermittent ventilation. **J. Comp. Physiol. B.** v.207, p. 195-110, 2017b.

KAUFMAN, G.E., SEYMOUR, R.E., BONNER, B.B., COURT, M.H., KARAS, A.Z. Use of rocuronium for endotracheal intubation of North American gulf coast box turtles. **Journal American of Veterinary Medicine Association**, 222, 1111–1115, 2003.

KAZMAIER, R. T.; HELLGREN, E. C.; SYNATZSKE, D. R. Patterns of behaviour in the Texas tortoise, *Gopherus berlandieri*: a multivariate ordination approach. **Can. J. Zool.** v. 79, p. 1363–1371, 2001.

KING, P.; HEATWOLE, H. Non-pulmonary respiratory surfaces of the chelid turtle *Elseya latisternum*. **Herptol.** v.50, p. 262-265, 1994a.

KING, P.; HEATWOLE, H. Partitioning of aquatic oxygen uptake among different respiratory surfaces in freely diving pleurodiram turtle *Elseya latisternum*. **Copeia**. n. 3, p. 802-806, 1994b.

KINNEY, J.; MATSUURA, D.; WHITE, F. Cardiorespiratory effects of temperature in the turtle, *Pseudemys floridana*. **Resp. Physiol.** .v. 31, p. 309-325, 1977.

KIRCHGESSNER, M., MITCHELL, M.A. **Quelonians**, in **Mitchell & Tully** (Ed.) Manual of Exotic Pet Practice, Philadelphia, USA, Elsevier Saunders, p. 207-249. 2009.

KLEIN, W.; BÖHME, W.; PERRY, S. F. The mesopneumonia and the post-hepatic septum of

the Teiioidea (Reptilia: Squamata). **Acta. Zool.** v. 81, p. 109-119, 2000.

KLEIN, W. et al. Effects of temperature and hypercapnia on ventilation and breathing pattern in the lizard *Uromastix aegyptius microlepis*. **Comp. Biochem. Physiol. A.** v. 132, p. 847-859, 2002.

KLEIN, W. et al. Structure of Post-hepatic and Its Influence on Visceral Topology in the Tegu Lizard, *Tupinambis merianae* (Teiidae: Reptilia). **J. Morph.** 258, 151-157, 2003b.

KLEIN, W.; OWERKOWICZ, T. Function of intracoelomic septa in lung ventilation of amniotes: lessons from lizard. **Physiol. Biochem. Zool.** v. 79, p. 1019-1032, 2006.

KNOTEK, Z. Alfaxalone as an induction agent for anaesthesia in terrapins and tortoises. **Vet Record**, 175(13), 327, 2014.

KOOLHAAS, J.M. et al.. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v. 23, p. 925–935, 1999.

KOOYMAN, G.L. et al. Aerobic and anaerobic metabolism during diving in Weddell seals: Evidence of preferred pathways from blood chemistry and behavior. **J. Comp. Physiol.** v. 138, p. 335–346, 1980.

KOOYMAN, G. L. **Diverse Divers: Physiology and Behaviour**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1989.

KRAMER, D. Dissolved oxygen and fish behavior. **Enviorn. Biol. Fis.** v. 18, n. 2, p. 81-91, 1987.

KRAMER, D. L. The behavioral ecology of air breathing by aquatic animals. **Can. J. Zool.** v. 66, p. 89-94, 1988.

KRAMER, D. L.; MANLEY, D.; BOURGEOIS, R. The effect of respiratory mode and oxygen concentration on the risk of aerial predation in fishes. **Can. J. Zool.** v. 61, p. 653 -665. 1983.

KRENZ, J.G. et al. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. **Mol. Phyl. Evol.** v. 37, p.178-191, 2005.

KUZNETSOVA, A.; PER, B. B.; RENE, H. B. C. “lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models.” **Journal of Statistical Software** **82** (13): 1–26, 2017.

LAMBERTZ, M.; BÖHME, W.; PERRY, S. F. The anatomy of the respiratory system in *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 (Testudine: Cryptodira) and related species, and its phylogenetic implications. **Comp. Biochem. Physiol. A**. v. 156, p 330-336, 2010.

LAMBERTZ et al. Lungs of the first amniotes: Why simple if they can be complex? **Biol. Lett.** v. 15, p. 5, 2015.

LAND, S.C.; HOCHACHKA, P.W. Protein turnover during metabolic arrest in turtle hepatocytes: role and energy dependence of proteolysis. **Am. J. Physiol.** v. 266, p. C1028–C1036, 1994.

LANDBERG, T.; MAILHOT, J. D.; BRAINERD, E. L. Lung ventilation treadmill locomotion in a semi-aquatic turtle, *Trachemys scripta*. **J. Exp. Zool.** 311a, p. 551-562, 2009.

LE SUEUR, M. Vessies auxiliaires dans les tortues du genre Émyde. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences** (Paris), n. 9, p. 456-457, 1839.

LEE, S. Y.; MILSON, W. The metabolic cost of breathing in red-eared sliders: na attempt to resolve an old controversy. **Resp. Physiol. Neurobio.** v. 224, p. 114-124, 2016.

LENFANT C. et al. Respiration in the fresh water turtle, *Chelys fimbriata*. **Respir. Physiol.** v. 8, p. 261—275.

LEGLER, J. M. Morphology and physiology of the Chelonia. In: **Fauna of Australia**, Vol. 2^a, Amphibia and Reptilia (Ed. C. J. Glasby, G. J. B. Ross and P. L. Bealsey). P. 108-119. Canberra: Australia Government Publishing Service, 1993b.

LEGLER, J. M.; WINOKUR, R. M. Vascular papillae in the buccopharyngeal mucosa of *Carettochelys insculpta* (Cryptodira: Carettochelydidae). **Abstract, 26th annual meeting of The Society for study of Amphibians and Reptiles**, 1983.

- LEGLER, J. M.; CANN, J. A new genus and species of chelid turtle from Queensland, Australia. **Contributions to the Scientific Natural History Museum of Los Angeles County**. v. 324, p. 1-18, 1980.
- LEGLER, J.M.; GEORGES, A. Family Chelidae, Chapter 21. In R. E. Jones (ed.), **Fauna of Australia**, Australian Government Printing Service, Canberra, Australian Capital Territory, Australia, 1993.
- LEHNER, P.N. **Handbook of ethological methods**. — Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- LENFANT, C. et al. Respiratiol in the freshwater turtle *Chelys fimbriata*. **Respr. Physiol.** v. 8, p. 261-275, 1970.
- LENTH, RUSSELL. *Emmeans: Estimated Marginal Means, Aka Least-Squares Means*, 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- LI, C. et al. An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. **Nature**. v. 456, n.7221, p. 497–501, 2008.
- LIEM, K.F. Form and function of lungs: the evolution of air breathing mechanisms. **Am. Zool.** v. 28, p 739–759, 1988.
- LITZGUS, J.; HOPKINS, W. Effect of temperature on metabolic rate of the mud turtle (*Kinosternon subrubrum*). v. 28, n. 8, p. 595-600, 2003.
- LIU, Y. et al. Ethogram of *Scalia quadriocellata* (Reptilia: Testudines: Geoemydidae) in captivity. **J. Herpetol.** v. 43, n. 2, p. 318-325, 2009.
- LONGLEY, L. A. Reptile anaesthesia. In.: LONGLEY, L. A. **Anaesthesia of exotic pets**. London: Editora Elsevier Saunders, v.1, p. 185-219, 2008.
- LOURENÇO, J. M. et al. Dating cryptodiran nodes: origin and diversification of turtle superfamily Testudinoidea. **Mol. Phylog. Evol.** v. 62, p. 496-507., 2012.

LU, G. Studies on the metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B(1)-deficient states: A rapid, specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Bioch. J.** v. 33, n. 2, p. 249 – 259, 1939.

LÜDICKE, M. Über die Atmung von *Emys orbicularis*. **Zool. Jb., Physiol.** v. 56: p. 83-106, 1936.

LUTCAVAGE, M.E.; LUTZ, P.L.; BAIER, H. Respiratory mechanics of the loggerhead sea turtle: *Caretta caretta*. **Respir. Physiol.** v. 76, p. 13–24, 1989.

LUTZ, P. L.; NILSSON, G. E. Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or down. **J. Exp. Biol.** v. 200, p. 411-419, 1997.

LYSON, T. R. et al. Origin of the unique ventilator apparatus of turtles. **Nature.** p. 1-11, 2014.

MACIEL, L. C. **Respiração de *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1838) e *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) relacionada à flutuabilidade.** Dissertação (Mestrado em Diversidade Animal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. p. 59, 2011.

MADSEN, J.G et al. Detecting spring after a long winter: Coma or slow vigilance in cold, hypoxic turtles? **Biol. Let.** v. 9, (art. 20130602), 2013.

MAGNUSSON, W.E. et al. Home range of the turtle, *Phrynops rufipes*, in an isolated reserve in central Amazônia, Brazil. **Chel. Cons. Biol.** v. 2, p. 494–499, 1997.

MAINA, J. N. The morphology of the lung of the black mamba *Dendroaspis polylepis* (Reptilia: Ophidia: Elapidae): a scanning and transmission electron microscopic study. **J. Anat.** v. 167, p. 31–46, 1989b.

MAINA, J. N. Structure, function and evolution of the gas exchangers: comparative perspectives. **J. Anat.** v. 201, p. 281,304, 2002.

MAINA, J.N.; MALOIY, G. M. O. The morphometry of the lung of the African lungfish (*Protopterus aethiopicus*): Its structural- functional correlations. **Proc R Soc Lond Biol Sci.** v. 224, p. 399– 420, 1985.

MAINA, J.N.; WEST, J.B. Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. **Physiol Rev.** v. 85, p. 811–844, 2005.

MAKOWSKI, D. “The Psycho Package: An Efficient and Publishing-Oriented Workflow for Psychological Science.” *Journal of Open Source Software* 3 (22): 470, 2018. <https://doi.org/10.21105/joss.00470>.

MALLMANN-FRANCO, M. T. O. **Comparação da anatomia e estrutura histológica das bolsas cloacais de oito espécies de Testudines**. Tese. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2002.

MALTE, C.L.; MALTE, H.; WANG, T. Episodic ventilation lowers the efficiency of pulmonary CO₂ excretion. **J. Appl. Physiol.** v. 115, p. 1506-1518, 2013.

MALTE, C.L.; NØRGAARD, S.; WANG, T., 2016. Closed system respirometry may underestimate tissue gas exchange and bias the respiratory exchange ratio (RER). *Comp. Biochem. Physiol. A.* v. 192, p. 17- 27.

MALVASIO, A., SOUZA, A. M., MOLINA, F. B., SAMPAIO, F. A. Feeding behavior and food preference of *Podocnemis expansa* (Schweigger), *P. unifilis* (Troschel) and *P. sextuberculata* (Cornalia) in captivity (Testudines, Pelomedusidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 20, n. 1, p. 161-168, 2003.

MARCOVALDI, M. A.; MARCOVALDI, G. G. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. **Biol. Conserv.** n. 91, p. 35-41, 1999.

MARCOVALDI, M. A. et al. Fifteen years of hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting in northern Brazil. **Chelonian Conserv. Biol.** v. 6, p. 223–228, 2007.

MARSCHAND R. E. et al. Effects of prolonged lung inflation or deflation on pulmonary stretch receptor discharge in the alligator (*Alligator mississippiensis*). **Resp. Physiol. Neurobiol.** v. 200, p. 25-32, 2014.

MARTIN, P. & BATESON, P. **Measuring Behaviour: an Introductory Guide**. 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

- MATHIE, N.; FRANKLIN, C. The influence of body size on the diving behaviour and physiology of the bimodally respiring turtle, *Elseya albagula*. **J. Comp. Physiol. B.** v. 176, p. 739-747, 2006.
- MCCULLOCH, P. F.; JONES, D. R. Cortical influences on diving bradycardia in muskrats (*Ondatra zibethicus*). **Physiol. Zool.** v. 63, p. 1098-1117, 1990.
- MCCUTCHEON, F. H.. The respiratory mechanism in turtles. **Physiol. Zool.** v. 16, p. 255-269, 1943.
- MCDONALD, H. S. 1959. Respiratory functions of the ophidian air sac. **Herpetologica**. v.15, p. 193 - 198.
- MCFARLAND, D. 1987. **The Oxford Companion to Animal Behavior**. Oxford University Press, New York.
- MCGUIRE, J. L. et al. Safety and utility of an anesthetic protocol for the collection of biological samples from gopher tortoises. **Wild. Soc. Bull.** v. 38, p. 43–50, 2014.
- MEDEM, M. F. Observaciones sobre la distribucion geografica y ecologia de la tortuga *Phrynops geoffroanus* spp. em Colombia. **Informe sobre reptiles Colombianos (V)**. Nov. Colomb. v. 1, p. 291-300, 1960
- MILSOM, W. K. Intermittent breathing in vertebrates. **Annu. Rev. Physiol.** v. 53, p. 87-105, 1991.
- MILSOM, W. K.; JOHANSEN, K. The effect of buoyancy induced lung volume changes on respiratory frequency in a chelonian (*Caretta caretta*). **J. Comp. Physiol.** v. 98, p. 157-160, 1975.
- MINAMIKAWA, S., Y. et al. Maintenance of neutral buoyancy by depth selection in the loggerhead turtle *Caretta caretta*. **J. Exp. Biol.** v. 203, p. 2967-2975, 2000.
- MITTERMEIER, R. A.; MEDEM, F.; RHODIN, A. G. J. Vernacular Names of South American Turtles. **SSAR Herpetol Circ.** v. 10, p. 1-44, 1980

MLYNARSKI, M.; WERMUTH, H. The turtles. In: Grzimek, B. (ed). **Grzimek's Animal Life Encyclopedia**, vol. 6. Van Nostrand Reinhold Co., New York, New York. p. 103-104. 1975.

MOBERLY, W., 1968. The metabolic responses of the common iguana, *Iguana iguana*, to activity under restraint. **Comp. Bioch. and Physiol.** v. 27, n. 1, p. 1–20.

MOLINA, F.B. **Observações sobre a biologia e o comportamento de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae).** MS Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

MOLINA, F. B. Observações sobre os hábitos e o comportamento alimentar de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 7, p. 319-326, 1990.

MOLINA, F. B. Observações sobre o comportamento agonístico de cágados *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Reptilia, Testudines, Chelidade) em Cativeiro. **Biotemas.** v. 5, p. 79-84, 1992b.

MOLINA, F.B. Mating behavior of captive Geoffroy's side-necked turtles, *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). **Herpetol Nat Hist.** v. 4, p 155–160, 1996a.

MOLINA, F. B. Biologia e comportamento reprodutivo de quelônios. In Encontro Anual de Etologia, 14. Kleber del-Claro (org.). Uberlândia. **Sociedade Brasileira de Etologia and Universidade Federal de Uberlândia.** Anais Etol. v. 14, p. 211-221, 1996b.

MOLINA, F.B. **Observações sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Emydidae).** São Paulo, Universidade de São Paulo. (Tese de Doutorado em Zoologia – instituto de Biociências da universidade de São Paulo), p. 307, 1999.

MOLINA, F. B.; ROCHA, M. B.; LULA, L. A. B. M. Feeding behavior and diet of *Phrynops hilarii* (Reptilia, Testudines, Chelidae) in captivity. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 73-79, 1998.

MOLL, E.O.; LEGLER, J.M. The life history of a neotropical slider turtle, *Pseudemys scripta* (Schoepff). **Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History Science**. v. 11, p. 1–102, 1971.

MOON, P. F.; E. K. STABENAU. Anesthetic and post anesthetic management of sea turtles. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v. 208, p. 720–726, 1996.

MORICI, M. et al. Sedation with intracloacal administration of dexmedetomidine and ketamine in yellow-bellied sliders (*Trachemys scripta scripta*). **J. Exot. Pet. Med.** v. 26, n. 3, p. 188–91, 2017.

MORTIMER, J. A., AND A. CARR. Reproduction and migration of the Ascension Island green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**. v. 1987, p. 103–113, 1987.

MOSLEY, C. A. E. **Anesthesia and analgesia in reptiles. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 14, n. 4, p. 243–262, 2005.

NARO-MACIEL, E. et al. Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. **Mol. Phylog. Evol.** v. 49, p. 659–662, 2008.

NIELSEN, M. L. Cloacal bursae in recent turtles: The mucosal lining. **Abstract, 26th annual meeting of The Society for the Study of Amphibians and Reptiles**, 1983.

NILSSON G. N.; ALFARO A. A.; LUTZ P. L. Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia. **Am. J. Physiol.** v.259, p. R376–R384, 1990.

NOBLE, G. A.; NOBLE, E. R. A brief anatomy of the turtle. **Stanford University Press**, California, 1940.

O'MALLEY, B. General anatomy and physiology of reptiles, in O'Malley B (ed): **Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species: Structure and Function of Mammals, Birds, Reptiles and Amphibians**. London, UK, Elsevier, p. 17–39, 2005.

OPPENHEIM, Y. V.; MOON, P.F. Sedative effects of midazolam in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). **J. Zoo. Wild. Med.** v. 26, p. 409–413, 1995.

ORENSTEIN, R. **Turtles, tortoises and terrapins: a natural history**. 2^oed, 2012.

ORGEIG, S. et al. The anatomy, physics, and physiology of gas exchange surfaces: Is there a universal function for pulmonary surfactant in animal respiratory structures? **Integr. Comp. Biol.** v. 47, p. 610–627, 2007.

ORGEIG, S.; C.B. DANIELS. The evolutionary significance of pulmonary surfactant in lungfish (Dipnoi). **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 13, p. 161–16, 1995.

CRUZ-ORIVE, L.M.; WEIBEL, E.R. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. **Am. J. Physiol.** v. 258, p. 148–156, 1990.

OTONI, E. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behav Res Methods Instrum Comput.** v. 32, p. 446-449, 2000.

PARHAM, J.F. et al. The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. **Mol. Phylog. Evol.** v. 38, p. 50-64, 2006b.

PARRA, B. S. et al. Sedativos e anestésicos em répteis e aves ornamentais. **Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.** V. 12, p. 7, 2009.

PATEL, S. et al. Videography Reveals In-Water Behavior of Loggerhead Turtles (*Caretta caretta*) at a Foraging Ground. **Front. Mar. Sci.** v. 3, p. 1-11, 2016.

PEIXOTO, D. S. **Morfologia funcional dos pulmões de *Iguana iguana* (Squamata, Reptilia) em função da massa corpórea**. Dissertação (Mestre em Zoologia), Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, p. 77, 2015.

PEIXOTO, D. et al. Functional morphology of the lungs of the green iguana, *Iguana iguana*, in relation of body mass (Squamata : Reptilia). **Vert. Zoo.** v. 65, n. 1, p. 65-82, 2018.

PERRY, S. F. **The lungs of the red eared turtle *Chrysemys (Pseudemys) scripta elegans* as a gas exchange organ: a histological and quantitative morphological study**. Dissertation (Doctor of Philosophy). A. B. Middlebury College, Boston University. P. 178, 1972.

PERRY, S. F. Quantitative anatomy of the lungs of the red-eared turtle, *Pseudemys scripta elegans*. **Resp. Physiol.** v. 35, p. 245-262, 1978.

PERRY, S. F. Morphometric analysis of pulmonary structure: methods for evaluation and comparison of unicameral lungs. **Mikroskopie.** v. 38, p. 278-293, 1981.

PERRY, S. F. Reptilian Lungs. Functional anatomy and evolution. **Adv. Anat. Embriol. Cell. Biol.** v. 79, p. 1-81, 1983.

PERRY, S.F. Lung structure and function—reptiles. In: Wood, S.C. (Ed.), **Com- parative Respiratory Physiology**. Marcel Dekker, New York, EUA, p. 193–236, 1989.

PERRY, S. F.. Gas exchange strategy in the Nile crocodile: amorphometric study. **J. Comp. Physiol. B.** v. 159, p. 761–769, 1990.

PERRY, S. F.; HEIN. J.; VAN DIEKE, N. E. Gas exchange morphometry of the lungs of the tokay, *Gekko gecko* L. (Reptilia: Squamata; Gekkonidae). **J. Comp. Physiol. B.** v. 164, p. 206–214, 1994.

PERRY, S. F. Lungs: Comparative anatomy, functional morphology, and evolution. In **Biology of the Reptilia**. (Ed. C. Gans and A. S. Gaunt). 1-80. Ithaca, New York: Society for Study of Amphibians and Reptilians, 1998.

PETERS, J. A. Dictionary of herpetology. **A brief and meaningful definitions of words and terms used in herpetology**. Hafner Publishing Company, New York and London. Xii, p. 426, 1964.

PETITET, R.; MEURER, B. Estudo Comportamental De Tartarugas Marinhas Na Praia De Araçatiba , Ilha Grande , Angra Dos Reis - Rj – Brasil. Sociedade de Ecologia do Brasil. Anais do VII Congresso de Ecologia do Brasil. p. 2, 2007.

PICKEL, F. W. The accessory bladders of the Testudinata. **Zoo. Soc. B.** v. 2, p. 291-301, 1899.

PIIPER, J; SCHEID, P. Models for a comparative functional analysis of gas exchange organs in vertebrates. **J. Appl. Physiol.** v. 53, p. 1321-1329, 1982.

PIÑA, C. et al. Heavy Metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a River Basin, São Paulo, Brazil, 2009.

PORTEUS, C. et al. Time domains of the hypoxic ventilatory response in ectothermic vertebrates. **J. Comp. Physiol. B.** v. 181. P. 311-333, 2011.

POWELL, F. L.; GRAY, A. T. Ventilation–perfusion relationships in alligators. **Respiratory Physiology.** v. 78, p. 83–94, 1989.

POWELL, F.L.; MILSOM, W. K.; MITCHELL, G. S. Time domains of the hypoxic ventilatory response. **Respir. Physiol.** v. 112, p. 123–134, 1998.

POWELL, F.L.; HOPKINS, S.R. Comparative physiology of lung complexity: implications for gas exchange. **News Physiol Sci.** v. 19, p. 55–60, 2004.

PRASSACK, S.L.; BAGATTO, B.; HENRY, R.P. Effects of temperature and aquatic PO₂ on the physiology and behaviour of *Apalone ferox* and *Chrysemys picta*. **J. Exp. Biol.** v. 204, p. 2185–2195, 2001.

PRIEST, T. Bimodal respiration and dive behaviour of the Fitzroy River Turtle, *Rheodytes leukops*. B.Sc. Honours thesis, University of Queensland, Brisbane, Queensland, 1997.

PRIEST, T.; FRANKLIN, C. E. Effect of water temperature and oxygen levels on the diving behaviour of two freshwater turtles: *Rheodytes leukops* and *Emydura macquarii*. **Journal of Herpetology.** v. 36, p. 555–561, 2002.

PRITCHARD, P. C. H. **Encyclopedia of Turtles.** Neptune, New Jersey, T.F.H. Publications, p. 895, 1979.

PRITCHARD, P. C. H., TREBBAU, P. The Turtles of Venezuela. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. **Contrib. Herpetol.** v. 403, 1984.

PRITCHARD, P. C. H. Kemp's Ridleys are rarer than thought. **Mar. Turt. Newsl.** v. 49, p. 1-3, 1990.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. URL <https://www.R-project.org/>.

R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2019. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.

READ, M. R. Evaluation of the use of anesthesia and analgesia in reptiles. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v. 224, n. 4, p. 547-552, 2004.

REDDY, D. A Morphological and Morphometric Investigation into the Morphogenesis of the Crocodilian Lung. Thesis (Doctor of Philosophy). School of Anatomical Sciences, University of the Witwatersrand. p. 249, 2013.

REESE, S. A. et al. The physiology of hibernation among painted turtles: the midland painted turtle (*Chrysemys picta marginata*). **Respir. Physiol.** v. 124, p. 43–50, 2001.

REESE, S.A.; JACKSON, D. C.; ULTSCH, G. R. Hibernation in freshwater turtles: softshell turtles (*Apalone spinipera*) are the most intolerant of anoxia among northern North American species. **J. Comp. Physiol. B.** v. 173, p. 263-268, 2003.

REGO, M. A. F. **Anestesia em Répteis. Revisão de Literatura**. Monografia (Especialista *latu sensu* em Anestesiologista Veterinária). Faculdade de Jaguariúna e Instituto Bioethicus. 71, 2013.

RHODIN, A. G. J.; MITTERMEIER, R. A. Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of South American *Phrynops geoffroanus* complex. **Adv. Herpetol Evol. Biol.** p. 58-73, 1983.

RIVERA, A. **Comparative forelimb muscle function in turtles: test of environmental variation and neuromotor conservation**. Dissertation (Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy Biological Sciences), Graduate School of Clemson University, Clemson, p. 178, 2011.

ROOT, R. W. Aquatic respiration in the musk turtle. **Physiol. Zool.** v. 22, p. 172-178, 1949.

RStudio Team RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, 2015.
URL <http://www.rstudio.com/>.

RUBY, D. E.; NIBLICK, H. A. A behavioral inventory of the desert tortoise: development of an ethogram. **Herpetol. Mon.** v. 8, p. 88–102, 1994.

SANDERS, C. E. et al. Daily and annual cycles in thermoregulatory behaviour and cardio-respiratory physiology of black and white tegu lizards. **J. Comp. Physiol. B**, v. 185, p. 905–915, 2015.

SANTOS, A. L. Q. et al. Pharmacological restraint of captivity giant Amazonian turtle *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) with xylazine and propofol. **A. Cir. Bras.** v. 23, n. 3, p. 270–273, 2008.

SANTOS, A. L. Q. et al. Anestesia de cágado-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 (Testudines) com associação midazolan e propofol. **A. Scient. Biol. Scie.** v. 31, n. 3, p. 317–321, 2009.

SANTOS, A. L. Q. Avaliação do uso da combinação de propofol e midazolam na contenção farmacológica e anestesia do cágado-de-barbicha *Phrynops geoffroanus* SCHWEIGGER, 1812 (Testudines, Chelidae). **PUBVET.** v. 6, n. 12, p. 22, 2012.

SANTOS, E. A.; LAITANO, S. Y. T.; GENOFRE, G. C. Diving physiology of *Chrysemys dorbignyi* Dum & Bibr., 1835 (Reptilia: Chelonia). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 95A, n. 2, p. 229–236, 1990.

SCHNEIDER, L.; FERRARA, C.; VOGT, R. C. Description of behavioral patterns of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824) (Testudines: Podocnemididae) (Red-headed river turtle) in captivity, Manaus, Amazonas, Brazil. **A. Amaz.** v.40, n. 4, p. 763–770, 2010.

SCHNEIDER, L. et al. History of turtle exploitation and management techniques to conserve turtles in Rio Negro basin of the Brazilian Amazon. **Chelon. Cons. Biol.** v. 10, p. 149–157, 2011.

SCHNELLBACHER, R. W. et al. The efficacy of intranasal administration of dexmedetomidine and ketamine to yellow-bellied sliders (*Trachemys scripta scripta*). **J. Herpetol. Med. Surg.** v. 22, p. 91–98, 2012.

SCHUMACHER, J. **Reptiles and amphibians.** In: **Thurmon, J. C., Tranquilli, W. J., Benson, G. J. Lumb & Jones veterinary anesthesia.** 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 670-685, 1996.

SEABRA D. I., POMPEU E., VALENTI M. L. G. Anestesia E Analgesia De Animais Utilizados Em Protocolos Experimentais, 2015. Disponível em: http://www.bioterio.fm.usp.br/pdf/Anestesia_e_Analgesia.pdf.

SEDDON, J. M. et al. Phylogenetic relationships of chelids turtles (Pleurodira: Chelidae) based on mitochondrial 12S rRNA gene sequence variation. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 7, p. 55-61, 1997.

SETER, P., HARRIS, S. M., KENT, D. L. Phylogeny of courtship and male–male combat behavior in snakes. **PLoS ONE**, v. 9, e107528, 2014.

SEYMOUR, R.S. Physiological adaptations to aquatic life. In **Biology of the Reptilia.** Edited by C. Gans. Academic Press, London. p. 1–51, 1982.

SHAFFER H. B.; MEYLAN, P. A.; MCKNIGHT, M.L. Test of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. **Syst. Zoo.** v. 46, p. 235-268, 1997.

SILVA, R. Z.; VILELA, M. J. A. Nidificação de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Chelonia: Chelidae) na área do reservatório de Jupiá-Rio Paraná, Três Lagoas, **MS. Biol.** p. 107-115, 2008.

SKOVGAARD, N.; WANG, T. Cost of ventilatory and effect of digestive state on ventilatory response in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*). **Resp. Physiol. Neurobiol.** 141, 85-97, 2004.

SKOVGAARD N. et al. Endothelin-1 causes systemic vasodilatation in anaesthetised turtles (*Trachemys scripta*) through activation of ETB-receptors. **J. Exp. Biol.** v. 208, p. 3739–3746, 2005.

SKOVGAARD, N., CONLON, J. M., WANG, T. Evidence that neurotensin mediates postprandial intestinal hyperemia in the python, *Python regius*. **Am. J. Physiol.** v. 293, p. R1393–1399, 2007.

SLADKY, K. K.; MANS, C. Clinical anesthesia in reptiles. **J. Exot. Pet Med.** v. 21, n. 1, p. 17–31, 2012.

SMART, U.; DEEPAK, V.; VASUDEVAN, K. (2014). Preliminary ethogram and in situ time-activity budget of enigmatic cane turtle (*Vijayachelys sylvatica*) from Western Ghats, South India. *Herpetol. Conserv. Biol.* 9(1): 116-122.

SMITH, H. M.; JAMES, L. F. The taxonomic significance of cloacal bursae in turtles. **Trans. Kansas Acad. Sci.** 61, 86-96, 1958.

SOLOMON, S. E.; PURTON, M. (1984). The respiratory epithelium of lung in the green turtle (*Chelonia mydas* L.). *J. Anat.* 139(2): 353-370.

SOUZA, F. L. **Ecologia do cágado *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em ambiente urbano poluído (Reptilia, Testudines, Chelidae)**. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1999.

SOUZA, F.L. AND ABE, A.S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **J. Zoo.** v. 252, p. 437–446, 2000.

SOUZA, F. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros. **Phyllomedusa.** v. 3, p. 15-27, 2004.

SOUZA, F. L. Geographical distribution patterns of South American side-necked turtles (Chelidae), with emphasis on brazilian species. **Rev. Esp. Herp.** v. 19, p. 33-46, 2005.

SOUZA, F.L. et al. Dispersal of *Phrynops geoffroanus* (Chelidae) in an Urban River in Central Brazil. **Chel. Cons. Biol.** v. 7, n. 2, p. 257–261, 2008.

SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Observations on feeding habits of *Hydromedusa maximiliani* (Testudines: Chelidae) in Southeastern Brazil. **Chelon. Conserv. Biol.** v. 1, n. 4, p. 320-322, 1995.

SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. **Stud. Neotrop. Fauna E. J.** v. 36, n.1, p.57–62, 2001.

SOUZA, F. L., ABE, A. S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in the Southeastern Brazil. **Stud. Neotrop. Fauna E.** 36 (1), 57-62, 2011.

STAPLES, J. F.; BUCK, L. T. Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. **Comp. Biochem. Physiol. A.** v. 153, p. 95–105.

STERLI, J.; POL, D.; LAURIN, M. Incorporating phylogenetic uncertainty on phylogeny-based palaeontological dating and the timing of turtle diversification. **Cladistics.** v. 29, p. 233–246, 2013.

STINNER, J. N. Functional anatomy of the lung of the snake *Pituophis melanoleucus*. **Am. J. Physiol.** v. 243, p. R251–R257, 1982.

STOCKARD, M. E.; GATTEN, R.E., JR. Activity metabolism of painted turtles (*Chrysemys picta*). **Copeia.** p. 214–221, 1983.

STONE, P. A.; DOBIE, J. L.; HENRY, R. P. Cutaneous surface area and bimodal respiration in soft-shelled (*Trionyx spiniferus*), stinkpot (*Sternotherus odoratus*), and mud turtles (*Kinosternon subrubrum*). **Physiol. Zool.** v. 65, p. 311–330, 1992a.

STONE, P.A.; DOBIE, J.L.; HENRY, R.P. The effect of aquatic O₂ levels on diving and ventilatory behaviour in soft- shelled (*Trionyx spiniferus*), stinkpot (*Sternotherus odoratus*), and mud turtles (*Kinosternon subrubrum*). **Physiol. Zool.** v. 65, p. 331–345, 1992b.

STOREY, K.B. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. **Comp. Physiol. Biochem. B.** v. 113, 23–35, 1996.

STOREY, E. M. et al. Effect of water depth, velocity and temperature on the surfacing frequency of the bimodally respiring turtle *Elseya albagula*. **Functional Ecology**. v. 22, p. 840–846, 2008.

SULLIVAN, L. C.; ORGEIG, S.; WOOD, P.G.; DANIELS; C.B.. The ontogeny of pulmonary surfactant secretion in the embryonic green sea turtle (*Chelonia mydas*). **Physiol. Biochem. Zool.** v. 74, p. 493–501, 2001.

THOMÉ, J. C. A. et al. Nesting biology and conservation of the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriácea*) in the state of Espírito Santo, Brazil, 1988-1989 to 2003-2004. **Chelon. Res. Found.** v.6, p. 15-27, 2007.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. **Lumb & Jones veterinary anaesthesia**. 3. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 680-681, 1996.

TINBERGEN, N. (1963). On aims and methods of ethology. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, v. 20, p. 410–433.

TORTATO, M. Contribuição ao conhecimento de *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron , 1835) (Testudines , Chelidae) em área de restinga no estado de Santa Catarina , Sul do Brasil. **Biotemas**. v. 20, n. 1, p. 119-122, 2007.

TREVISAN-BAÚ, P.; ABE, A.; KLEIN, W. Effects of environmental hypoxia and hypercarbia on ventilation and gas exchange in Testudines. **PEERJ**. P. 1-27, 2018.

TRIER, J. S. Morphology of the epithelium of the small intestine. In: **Handbook of Physiology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1968.

TROBEC, T. N.; STANLEY, J. G. Uptake of Ions and Water By the Painted Turtle *Chrysemys picta*. **Copeia**. v. 3, p. 537-542, 1971.

ULTSCH, G. R. The viability of nearctic freshwater turtles submerged in anoxia and normoxia at 3 and 10°C. **Comp. Biochem. Physiol. A**. v. 81, p. 607-611, 1985.

ULTSCH, G. R. Ecology and physiology of hibernation and overwintering among freshwater fishes, turtles, and snakes. **Biol. Rev.** v. 64, p. 435-516, 1989.

ULTSCH, G.; JACKSON, D. Long-term submergence at 3°C of the turtle *Chrysemys picta bellii*, in normoxic and severely hypoxic water. **J. Exp. Biol.** v. 96, p. 11-28, 1982.

ULTSCH, G. R.; HERBERT, C. V.; JACKSON, D. C. The comparative physiology of diving in North American freshwater turtles. I. Submergence tolerance, gas exchange, and acid-base balance. **Physiol Zool.** v. 57, p. 620–631, 1984.

ULTSCH, G.R. et al. The physiology of hibernation among painted turtles: the Eastern painted turtle *Chrysemys picta picta*. **Physiol. Biochem. Zool.** v. 72, p. 493–501, 1999.

VAN DIJK, P.P. et al. Turtles of the world, 2012 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. In: **Conservation biology of fresh-water turtles and tortoises: a compilation project of the IUCN/SSC tortoise and freshwater turtle specialist group**. Rhodin, A.G.J., et al., Eds, Chelonian Research Monographs, Chelonian Research Foundation, Lunenburg, Massachusetts.

VAN DIJK, P. et al. Turtles of the world, 7th Edition: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation states. **Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group**. Chelonian Research Monographs. 5: 329-479, 2014.

VARGAS-RAMIREZ, M.; CASTANO-MORA, O. V.; FRITZ, U. Molecular phylogeny and divergence times of ancient South American and Malagasy river turtles (Testudines: Pleurodira: Podocnemididae). **Org. Div. & Evol.** v. 8, p. 388-398, 2008.

VITALIS, T. Z.; MILSOM, W. K. Pulmonary mechanics and the work of breathing in the semi-aquatic turtle, *Pseudemys scripta*. **J. Exp. Biol.** v. 125, p. 137-155, 1986a.

VITALIS, T. Z.; MILSOM, W. K. Mechanical analysis of spontaneous breathing in the semi-aquatic turtle, *Pseudemys scripta*. **J. Exp. Biol.** v. 125, p. 157-171, 1986b.

VOGT, R. C. **Natural history of amphibians and reptiles of Wisconsin**. Milwaukee Public Museum, Milwaukee, Wisconsin, 1981.

VOGT, R. C.; BULL, J. J. Temperature controlled sex-determination in turtles: ecological and behavioral aspects. **Herpetologica**. v. 38, n. 1, p. 156-164, 1982.

WALKER, W. F. An analysis of forces developed at the feet of turtles during walking. **Am. Zoologist**. v. 3, p. 488, 1963.

WANG, T.; BRAUNER, C. J.; MILSOM, W. K.; The effect of isovolemic anaemia on blood O₂ affinity and red-cell triphosphate concentrations in the painted turtle (*Chrysemys picta*). **Comp. Biochem. Physiol. A**. v. 122, p. 341–345, 1999.

WANG, Z. X.; SUN, N. Z.; SHENG, W. F. Aquatic respiration in soft- shelled turtles, *Trionyx sinensis*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 92A, p. 593–598, 1994.

WANG, T.; SMITH, A. W.; BURGGREN, W. W. Pulmonary function in reptiles. In: Gans, C., Gaunt, A. S. (Eds.), **Morphology G: Visceral Organs, Biology of Reptiles**. Vol.19. SSAR Press, Ithaca N. Y. p. 297-374, 1988.

WANG, T., WARBURTON, S. J. Breathing pattern and cost of breathing in American alligators. **Respir. Physiol.** v. 102, p. 29-37, 1995.

WANG, T. et al. Cardiovascular actions of python bradykinin and substance P in the anesthetized python, *Python regius*. **Am. J. Physiol.** v. 279, p. R531–R538, 2000.

WARREN, D.E.; REESE, S.A.; JACKSON, D.C. Tissue glycogen and extracellular buffering limit the survival of red-eared slider turtles during anoxic submergence at 3°C. **Physiol. Biochem. Zool.** v. 79, p. 736–744, 2006.

WARREN, D.E.; JACKSON, D.C. 2008. Lactate metabolism in anoxic turtles: An integrative review. **J. Comp. Physiol. B** v. 178, p. 133–148.

WEIBEL, E. R. **The Pathway for Oxygen. Structure and Function in the Mammalian Respiratory System**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1984.

WEIBEL, E. R.; HSIA, C. C. W.; OCHS, M. How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. **J. Appl. Physiol.** v. 102, p. 459-467, 2007.

WEST, N. H.; SMITS, A.W.; BURGGREN, W. W. Factors terminating nonventilatory periods in the turtle, *Chelydra serpentina*. **Resp. Physiol.** v. 77, p. 337–350, 1989.

Wickham, Hadley. 2017. *Tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse'*. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>.

WILLIAMS, C; HICKS, J. Continuous arterial PO₂ profiles in unrestrained, undisturbed aquatic turtles during routine behaviors. **J. Exp. Biol.** v. 219, p. 3616-3625, 2016.

WINKLER, J. Testing phylogenetic implications of eggshell characters in side-necked turtles (Testudines: Pleurodira). **Zoology.** v. 109, n. 2, p. 127-136, 2006.

WINOKUR, R . M.; LEGLER, J. M. The histology of the cloacal bursae of Australian chelid turtles. **Am. Zoo.** v. 22, n. 4, p. 886.

WOLF, S. Zur Kenntnis von Bau und Funktion der Reptilienlunge. **Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere.** v. 57, p. 139–190, 1933.

WU, P; ZHOU, K-Y; YANG Q. Phylogeny of Asian freshwater and terrestrial turtles based on sequence analysis of 12S rRNA gene fragment. **Acta Zool Sinica.** v. 45, p. 260–267, 1999.

YAMAMOTO, M. E. Percorrendo a história do estudo do comportamento animal: origens e influências. In: Yamamoto, M. E., Volpato, G. L. **Comportamento Animal. Natal: EDUFRN**, v. 2, p. 10-23, 2011.

YOKOSUKA, H. et al. 2000. Villiform processes in the pharynx of the soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis japonicus*, functioning as a respiratory and presumably salt uptaking organ in the water. **Arch. Histol. Cytol.** v. 63, p. 181–192.

ZIMMERMAN, L.C. et al. Thermal ecology of desert tortoises in the Eastern Mojave desert: seasonal patterns of operative and body temperature and microhabitat utilization. **Herp. Monogr.** v. 8, p. 45–59, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Levantamento bibliográfico dos fármacos testados em diferentes espécies de Testudines.

E – epidural, IM - intramuscular, IV - intravenoso, IC - intracloacal, IN - intranasal, SC - subcutâneo. Dados ausentes estão sinalizados com um traço.

Fármacos	Espécie	Rota	Dose (mg.kg ⁻¹)	Temperatura (°C)	Referência
Acepromazina		IM	0,1-0,5	-	Millichamp, 1998
Alfaxalona	<i>Trachemys scripta</i>	IV	5	37,5	Knotek, 2014
	<i>T. scripta elegans</i>				
Alfaxalona + Butorfanol + Meloxicam	<i>Testudo hermani</i>	IV + IM			
	<i>Testudo graeca</i>	+ IM	5 + 2 + 1	37,5	Knotek, 2014
	<i>Testudo marginata</i>				
	<i>Testudo horsfield</i>				
	<i>Gopherus agassizii</i>	IM, IV	0,5	-	Sleeman & Gaynor, 2000; Denis & Heard, 2002
Atipamezol	<i>Geochelone pardalis</i>		0,4		
	<i>G. denticulata</i>	IV		29,5	Lock <i>et al.</i> , 1998
	<i>Aldabrachelys gigantea</i>		0,1 – 0,38		
	<i>Caretta caretta</i>		0,25	25	Chittick <i>et al.</i> , 2002
Butorfanol + Cetamina	<i>Caretta caretta</i>		0,4 + 15	-	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2007
	<i>T. scripta elegans</i>	IM	60	23 – 25	Holz & Holz, 1994
	<i>Chelydra serpentina</i>		40	21	Bienzle <i>et al.</i> , 1992
	<i>T. scripta elegans</i>		60	23-25	Holz & Holz, 1994
Cetamina	<i>Chelydra serpentina</i>	IM	40	21	Bienzle <i>et al.</i> , 1992
	<i>T. scripta</i>		90 – 100	-	Rivera, 2012
Cetamina+					
Dexmedetomidina + Atipamezole	<i>Dermochelys coriacea</i>	IV	6 + 0,03 + 0,3	-	Harms <i>et al.</i> , 2014
Cetamina + Dexmedetomidina	<i>T. scripta elegans</i>	IC	10 + 0,2	23	Morici <i>et al.</i> , 2017
Cetamina + Dexmedetomidina + Morfina	<i>Gopherus polyphemus</i>	IM	75 (mc/kg) + 8 + 1	26,7	McGuire <i>et al.</i> , 2014
			5 + 50	-	Kelly <i>et al.</i> , 2005
	<i>Geochelone pardalis</i>				
	<i>G. denticulata</i>	IV	3 – 8 + 0,25 – 0,8	29,5	Lock <i>et al.</i> , 1998
Cetamina + Medetomidina	<i>Aldabrachelys gigantea</i>				
	<i>Caretta caretta</i>		5 + 0,05	25 – 35	Chittick <i>et al.</i> , 2002
	<i>T. scripta</i>	IM	5 – 10 + 0,1 – 0,2	27 – 29	Greer <i>et al.</i> , 2001
	<i>Chelonia mydas</i>	IV	04 + 0,04	-	Helnick <i>et al.</i> , 2000
			60 + 2	23 – 25	Holz & Holz, 1994
	<i>T. scripta elegans</i>		20 – 40 + 2	-	Schumacher, 1996
Cetamina + Midazolam		IM	10 – 40 + 2	-	Hernandez-Diver <i>et al.</i> , 2007
	<i>Trachemys dorbigny</i>		2 + 20	22,9	Flôres <i>et al.</i> , 2008
	<i>Chelydra serpentina</i>		2 + 20 – 40	21	
	<i>Podocnemis expansa</i>		20 – 60 + 2	< 26	Alves-Júnior; 2006
Cetamina + Morfina	Jabuti	IM	3 + 0,7	-	Valau <i>et al.</i> , 2011
Cetamina + Rompun	<i>T. scripta</i>	-	60 + 4	-	Moreira & Silva, 2013
Cetamina + Xilasina	<i>T. scripta elegans</i>	IM	60 + 2	23 – 25	Madsen <i>et al.</i> , 2013
	<i>T. scripta elegans</i>				
Citrato de fentanila	<i>T. dorbgni</i>	SC	0,05	25 – 29	Kaminishi, 2013
Cloreto de succinilcolina	<i>Lepidochelys kemp</i>	IM	0,5	-	Moon & Stabenau, 1996
Dexmedetomidina	<i>Chelonoidis carbonaria</i>	IN			
	<i>Geochelone platynota</i>		0,5 – 1,5	-	Emery <i>et al.</i> , 2014
Etomidato	<i>Phrynops geoffroanus</i>		1 – 3		Santos <i>et al.</i> , 2012
Etomidato + butorfanol	<i>Podocnemis expansa</i>	IV	2 + 1	28 – 30	Ávila-Júnior, 2005
Etomidato + fentanila	<i>Podocnemis expansa</i>		2 + 0,01		Ávila-Júnior, 2005
Lidocaína + Bupivacaína	<i>Phrynops geoffroanus</i>	E	4,6 + 1,15	25 – 27	Ribeiro, 2011

	<i>Dermochelys coriacea</i>	IV	2 ou 3	-	Harms <i>et al.</i> , 2014
	<i>Phrynos geoffroanus</i>		2	-	Santos <i>et al.</i> , 2009
	<i>Chelydra serpentina</i>	IM	2	21	Bienzele <i>et al.</i> , 1992
Midazolam	<i>T. scripta elegans</i>		até 1,5	-	Oppenheim & Moon, 1995
	<i>T. scripta elegans</i>		2 – 20	-	Harvey-Clark, 1993
	<i>Chelonoidis carbonaria</i>	IN	0,5 – 1,5	-	Emery <i>et al.</i> , 2014
	<i>Geochelone platynota</i>				
Midazolam + Dexmedetomidina	<i>T. scripta elegans</i>	IN	10 + 0,2		Schnellbacher <i>et al.</i> , 2012
	<i>Phrynos geoffroanus</i>	IM	10	26	Santos <i>et al.</i> , 2009
	<i>Phrynos geoffroanus</i>				
Propofol	<i>Podocnemis unifilis</i>	IV	10		Hirano <i>et al.</i> , 2009
	<i>Trachemys scripta</i>		0,15	21	Jacobsen <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chelonoidis carbonaria</i>		20	-	Bortolini, 2011
Propofol + Acepromazina	<i>Podocnemis expansa</i>	IV + IM	5 – 10 + 0,5		Alves-Junior, 2006
Propofol + Xilasina	<i>Podocnemis expansa</i>	IV + IM	5 – 10 + 1,5	< 26	Alves-Junior, 2006
	<i>Terrapene carolina major</i>	IM	0,25 – 0,5	-	kaufman <i>et al.</i> , 2003
Rocuronium					
Rocuronium + Neostigmina	<i>Podocnemis expansa</i>	IM	0,25 – 0,5	33,73±1,88	Bosso <i>et al.</i> , 2009

APÊNDICE B - Tabela usada para a avaliação física e monitoramento dos parâmetros fisiológicos de *P. Geoffroanus* ao longo de tempo.

Animal: _____

Anestésico: _____

Concentração: _____

Dose: _____

Hora	Freq. cardíaca	Freq. respiratória	Movimentos espontâneos	Tônus muscular	Reflexos: pálpebras	Reflexos: córneas	Reflexos: toque nas patas	Resposta a estímulo doloroso

Frequência cardíaca: bat/min

Frequência respiratória: resp/min

Movimentos espontâneos: presente/ausente

Tônus muscular: 0 - 3, sendo 3 o tônus quando não está anestesiado e 0 quando não é observado qualquer tipo de resistência,

Reflexos: presente/ausente

Resposta a estímulo doloroso: presente/ausente

APÊNDICE C - Escores totais dos espécimes de *P. geoffroanus* calculados a partir da pontuação atribuída durante a avaliação física, sob efeito de diferentes combinações anestésicas.

Cetamina (60 mg/kg) e Midazolam (2 mg/kg)		tempo (min)															
animal	0'	10'	20'	30'	40'	50'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'		
PG 9	0	0	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
PG 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PG 11	0	0	3	5	5	5	5	5	4	3	4	5	2	1	1	1	1
PG 12	0	0	4	4	5	5	5	5	5	3	4	5	5	4	4	4	4
PG 13	0	0	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
PG 14	0	0	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4
PG 15	0	0	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
PG 16	0	0	4	4	5	5	5	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4
Cetamina (40 mg/kg) e Midazolam (2 mg/kg)		tempo (min)															
animal	0'	10'	20'	30'	40'	50'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'		
PG 9	0	3	3	6	6	5	4	3	5	5	2	3	3	3	3	3	3
PG 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PG 11	0	4	5	5	5	5	5	6	5	4	3	5	5	5	5	5	5
PG 12	0	2	2	5	5	5	3	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
PG 13	0	5	3	5	3	5	4	5	4	5	3	3	4	4	4	4	4
PG 14	0	3	6	6	5	6	5	5	5	4	5	1	3	4	4	4	4
PG 15	0	6	5	4	5	5	5	5	5	5	5	4	3	3	3	3	3
PG 16	0	5	4	5	4	4	3	5	5	5	4	5	4	4	4	4	4
Cetamina (40 mg/kg) e Midazolam (3 mg/kg)		tempo (min)															
animal	0'	10'	20'	30'	40'	50'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'	270'	300'		
PG 9	0	5	5	6	4	3	3	4	5	5	3	2	2	2	2	2	2
PG 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PG 11	0	2	5	6	6	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	4	4
PG 12	0	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	2	2
PG 13	0	1	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4
PG 14	0	4	6	6	6	6	4	5	4	4	4	3	4	4	4	3	3
PG 15	0	6	5	5	5	5	5	3	5	4	3	5	4	5	4	4	4
PG 16	0	3	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4	3	3

APÊNDICE D - Volume de referência (Vref), volume do parênquima (Vpar) das diferentes regiões das bolsas cloacais de *P. geoffroanus* e os seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea (Vref/MC e Vpar/MC), e a razão entre o volume do parênquima e o volume de referência (Vpar/Verf),

	Ápice					Corpo					Cólo				
	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/ MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/ MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/ MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf
PG 13	15,49	9,51	5,96	3,66	0,61	56,62	27,82	21,78	10,70	0,49	21,20	14,38	8,16	5,53	0,68
PG 15	6,31	6,31	1,75	1,75	1,00	39,10	31,47	10,86	8,74	0,80	10,32	10,11	2,87	2,81	0,98
PG 17	9,60	9,6	2,91	2,91	1,00	43,78	21,74	13,26	6,59	0,50	8,90	8,19	2,70	2,48	0,92
Média	10,47	8,48	3,54	2,77	0,87	46,50	27,01	15,30	8,67	0,60	13,48	10,89	4,57	3,61	0,86
Desvio Padrão	4,65	1,87	2,17	0,96	0,22	9,07	4,91	5,73	2,057	0,18	6,73	3,17	3,10	1,67	0,16

APÊNDICE E - Volume de referência (Vref), volume do parênquima (Vpar) das diferentes regiões dos pulmões de *P. geoffroanus* e os seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea (Vref/MC e Vpar/MC), e a razão entre o volume do parênquima e o volume de referência (Vpar/Verf),

	Pré-hilar					Cranial Externo					Cranial Interno					Caudal				
	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/MC (cm ³ .kg ⁻¹)	Vpar/ Verf
PG 13	38,55	34,67	14,83	13,33	0,90	75,16	62,95	28,91	24,21	0,84	75,16	62,95	28,91	24,21	0,84	20,80	17,75	8,00	6,83	0,85
PG 15	46,54	43,69	12,93	12,14	0,94	127,91	117,80	35,53	32,72	0,92	127,91	117,80	35,53	32,72	0,92	35,71	30,85	9,92	8,57	0,86
PG 17	46,99	40,47	14,24	12,26	0,86	137,30	117,48	41,61	35,60	0,86	137,30	117,48	41,61	35,60	0,86	32,53	28,46	9,86	8,62	0,87
Média	44,03	39,61	14,00	12,58	0,90	113,46	99,41	35,35	30,85	0,87	113,46	99,41	35,35	30,85	0,87	29,68	25,68	9,26	8,01	0,86
Desvio Padrão	4,75	4,57	0,97	0,66	0,04	33,50	31,57	6,35	5,92	0,04	33,50	31,57	6,35	5,92	0,04	7,85	6,97	1,09	1,02	0,01

APÊNDICE F - Volume de referência (Vref), volume do parênquima (Vpar) das bolsas cloacais e pulmões de *P. geoffroanus* e os seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea (Vref/MC e Vpar/MC), e a razão entre o volume do parênquima.

	Pulmões					Bolsas Clocais				
	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/MC (cm ³ /kg)	Vpar/MC (cm ³ /kg)	Vpar/Verf	Vref (cm ³)	Vpar (cm ³)	Vref/MC (cm ³ /kg)	Vpar/MC (cm ³ /Kg)	Vpar/Verf
PG 13	128,41	114,54	49.39	44,05	0,89	83,46	53,16	18,99	16,94	0,64
PG 15	225,15	208,90	62.54	58,03	0,93	59,33	50,56	17,37	16,12	0,85
PG 17	229,21	197,53	69.46	59,86	0,86	67,71	42,62	21,05	18,14	0,63
Média	194,25	173,65	60.46	53,98	0,89	70,17	48,78	19,14	17,07	0,71
Desvio Padrão	57,06	51,51	10.20	8,64	0,03	12,25	4,57	1,84	1,02	0,13

APÊNDICE G - Fração de volume do lúmen (Vv par ar), parênquima total (Vv par tecido) e vasos sanguíneos (Vv par vaso) nas diferentes regiões das bolsas cloacais de *P. geoffroanus*.

	Ápice				Corpo			Colo	
	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso
PG 13	0,740	0,188	0,073	0,386	0,523	0,091	0,475	0,386	0,138
PG 15	0,163	0,724	0,114	0,461	0,420	0,119	0,223	0,688	0,089
PG 17	0,543	0,360	0,097	0,571	0,323	0,106	0,505	0,440	0,056
Média	0,482	0,424	0,094	0,473	0,422	0,106	0,401	0,505	0,094
Desvio Padrão	0,293	0,273	0,021	0,093	0,100	0,014	0,155	0,161	0,041

APÊNDICE H - Fração de volume do lúmen (Vv par ar), parênquima total (Vv par tecido) e vasos sanguíneos (Vv par vaso) nas diferentes regiões dos pulmões de *P. geoffroanus*.

	Pré-hilar			Cranial externo			Cranial interno			Caudal		
	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso
PG 13	0,589	0,242	0,169	0,587	0,209	0,203	0,579	0,231	0,190	0,538	0,279	0,184
PG 15	0,393	0,480	0,126	0,513	0,277	0,210	0,673	0,140	0,187	0,563	0,243	0,195
PG 17	0,497	0,347	0,156	0,592	0,232	0,176	0,581	0,263	0,156	0,463	0,336	0,201
Média	0,493	0,356	0,151	0,564	0,240	0,196	0,611	0,211	0,178	0,493	0,356	0,151
Desvio Padrão	0,098	0,119	0,022	0,045	0,035	0,018	0,054	0,064	0,019	0,098	0,119	0,022

APÊNDICE I - Fração de volume do lúmen (Vv par ar), parênquima total (Vv par tecido) e vasos sanguíneos (Vv par vaso) dos pulmões e das bolsas cloacais de *P. geoffroanus*.

	Pulmões			Bolsas Cloacais		
	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso	Vv par ar	Vv par tecido	Vv par vaso
PG 13	0,007	0,531	0,222	0,053	0,536	0,277
PG 15	0,012	0,457	0,257	0,028	0,203	0,646
PG 17	0,006	0,460	0,275	0,083	0,539	0,258
Média	0,008	0,483	0,251	0,055	0,426	0,394
Desvio Padrão	0,003	0,042	0,027	0,028	0,193	0,219

APÊNDICE J - Área superficial do parênquima respiratório (S par) e não respiratório (S par N-resp), seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea e a proporção de superfície respiratória das diferentes regiões das bolsas cloacais de *P. geoffroanus*.

		PG 13	PG15	PG17	Média	Desvio Padrão
S par (cm ²)	Ápice	9,28	2,16	5,56	5,67	3,56
S par (cm ² .kg ⁻¹)		3,57	0,60	1,68	1,95	1,50
S par N-resp (cm ²)		12,19	6,16	10,16	9,50	3,07
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)		4,69	1,71	3,08	3,16	1,49
S total (cm ²)		21,47	8,32	15,72	15,17	6,59
Proporção da superfície respiratória		0,43	0,26	0,35	0,35	0,09
S par (cm ²)	Corpo	24,99	7,92	9,43	14,11	9,45
S par (cm ² .kg ⁻¹)		9,61	2,20	2,86	4,89	4,10
S par N-resp (cm ²)		18,10	49,28	13,23	26,87	19,56
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)		6,96	13,69	4,01	8,22	4,96
S total (cm ²)		43,10	57,20	22,66	40,99	17,37
Proporção da superfície respiratória		0,58	0,14	0,42	0,38	0,22
S par (cm ²)	Cólo	8,42	4,08	5,11	5,87	2,26
S par (cm ² /kg)		3,24	1,13	1,55	1,97	1,11
S par N-resp (cm ²)		20,89	15,20	10,20	15,43	5,35
S par N-resp (cm ² /kg)		8,04	4,22	3,09	5,12	2,59
S total (cm ²)		29,31	19,29	15,31	21,30	7,22
Proporção da superfície respiratória		0,29	0,21	0,33	0,28	0,06

APÊNDICE K - Área superficial do parênquima respiratório (S par) e não respiratório (S par N-resp), seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea e a proporção de superfície respiratória das diferentes regiões dos pulmões de *P. geoffroanus*.

		PG 13	PG15	PG17	Média	Desvio Padrão
S par (cm ²)	Pré-hilar	79,38	55,89	94,68	76,65	19,54
S par (cm ² .kg ⁻¹)		30,53	15,52	28,69	24,92	8,19
S par N-resp (cm ²)		24,94	20,35	53,31	32,86	17,85
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)		9,59	5,65	16,15	10,47	5,30
S total (cm ²)		104,32	76,23	147,98	109,51	36,15
Proporção da superfície respiratória		0,76	0,73	0,64	0,71	0,06
S par (cm ²)	Cranial externo	203,24	376,73	344,97	308,31	92,37
S par (cm ² .kg ⁻¹)		78,17	104,65	104,54	95,78	15,26
S par N-resp (cm ²)		35,89	109,03	106,78	83,90	41,59
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)		13,80	30,29	32,36	25,48	10,17
S total (cm ²)		239,13	485,76	451,75	392,21	133,66
Proporção da superfície respiratória		0,85	0,78	0,76	0,80	0,05
S par (cm ²)	Cranial interno	215,16	622,32	299,21	378,90	214,96
S par (cm ² .kg ⁻¹)		82,76	172,87	90,67	115,43	49,90
S par N-resp (cm ²)		60,65	109,77	117,39	95,94	30,80
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)		23,33	30,49	35,57	29,80	6,15
S total (cm ²)		275,82	732,09	416,61	474,84	233,64
Proporção da superfície respiratória		0,78	0,85	0,72	0,78	0,07
S par (cm ²)	Caudal	34,23	104,36	77,86	72,15	35,41
S par (cm ² .kg ⁻¹)		13,16	28,99	23,59	21,92	8,04
S par N-resp (cm ²)		23,35	54,53	46,90	41,60	16,25
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)		8,98	15,15	14,21	12,78	3,32
S total (cm ²)		57,58	158,89	124,76	113,75	51,55
Proporção da superfície respiratória		0,59	0,66	0,62	0,63	0,03

APÊNDICE L - Área superficial do parênquima respiratório (S par) e não respiratório (S par N-resp), seus respectivos valores padronizados pela massa corpórea e a proporção de superfície respiratória das dos pulmões e bolsas cloacais de *P. geoffroanus*.

	PG 13	PG15	PG17	Média	Desvio Padrão
S par (cm ²)	70,80	102,41	79,28	84,16	16,36
S par (cm ² .kg ⁻¹)	27,23	28,45	24,02	26,57	2,29
S par N-resp (cm ²)	22,94	34,83	41,16	32,98	9,25
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)	8,82	9,67	12,47	10,32	1,91
S total (cm ²)	93,74	137,24	120,44	117,14	21,93
Proporção da superfície respiratória	0,76	0,75	0,66	0,72	0,05
S par (cm ²)	6,76	1,90	6,31	4,99	2,68
S par (cm ² .kg ⁻¹)	2,60	0,53	1,91	1,68	1,05
S par N-resp (cm ²)	9,25	7,62	10,01	8,96	1,22
S par N-resp (cm ² .kg ⁻¹)	3,56	2,12	3,03	2,90	0,73
S total (cm ²)	16,00	9,52	16,32	13,95	3,84
Proporção da superfície respiratória	0,42	0,20	0,39	0,34	0,12

ANEXOS

ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

Campus de Ribeirão Preto

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada “**Estratégias de respiração bimodal em espécies do gênero *Phrynops* (Wagler, 1830) e em *Chelus fimbriata* (Schneider, 1783)**”, registrada com o protocolado nº 16.5.818.59.8, sob a responsabilidade de **Tábata Elise Ferreira Cordeiro** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP (CEUA FFCLRP) em reunião de 27/04/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/05/2017 a 28/02/2019
Nº da solicitação ou Autorização SISBIO:	35221-8
Atividade(s)	☐ Captura ☒ Coleta de espécimes ☐ Marcação ☒ Outras: Transporte, experimentação e manutenção em cativeiro
Espécies/Grupos Taxonômicos	<i>Phrynops</i> e <i>Chelus fimbriata</i>
Locais de realização das atividades	Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 19 de maio de 2017.

Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo
 Presidente da CEUA FFCLRP

ANEXO B – Autorização de instalação para empreendimentos de cativeiro

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE
CBRN - Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais
AUTORIZAÇÃO DE INSTALAÇÃO PARA EMPREENDIMENTOS DE CATIVEIRO

AUTORIZAÇÃO

Número/Ano: **Número: 0000011834 Ano: 2017 Data Emissão: 10/02/2017 Data Validade: 10/02/2019**
 Processo: **Sigla: SMA Número: 000000015340 Ano: 2012**
 Interessado: **CPF/CNPJ: 63.025.530/0081-99 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO**
 Finalidade: **Autorização de Instalação**
 Receber no Biotério de Tetrápode Silvestre da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, a doação de exemplares da espécie Phrynos geoffroanus, provindos Bosque Zoológico Fábio Barreto, para fins científicos.

EMPREENDIMENTO

Tipo: **Criadouro Científico de Fauna Silvestre para Fins de Pesquisa**
 CNPJ / CTF: **CNPJ: Não informado.**
 Razão Social / Nome: **CRIDAURO CIENTIFICO DE FAUNA SILVESTRE P/ FINS DE PESQUISA FFCL/USP-RIBEIRÃO PR**
 Endereço: **AV. BANDEIRANTES, 3900**
 Bairro e CEP: **MONTE ALEGRE CEP: 14040901**
 Município e UF: **RIBEIRÃO PRETO - SP**
 Responsável: **Pietro Ciancaglini (CPF: 6257703824)**

RECINTOS AUTORIZADOS

Recintos do Empreendimento	Setor
1	Manutenção de animais
10	Manutenção de animais
2	Manutenção de animais
3	Manutenção de animais
4	Manutenção de animais
5	Manutenção de animais
6	Manutenção de animais
7	Manutenção de animais
8	Manutenção de animais
9	Manutenção de animais

INSTALAÇÕES AUTORIZADAS

Instalação
Biotério de Tetrápodes Silvestres da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

UTILIZAÇÃO

Esta autorização permite o início das obras do empreendimento, conforme parecer técnico número de .

ATIVIDADES PERMITIDAS

Realização de obras de instalação de base, infra-estrutura ou reforma, conforme projeto apresentado.

ATIVIDADES NÃO PERMITIDAS

Esta Autorização de Instalação não autoriza o funcionamento, somente a realização das obras para implantação do empreendimento.

CONDICIONANTES

Quaisquer alterações quanto à localização do empreendimento deverão ser precedidas de anuência do órgão ambiental competente.

Os custos com projetos/documentações/assessorias serão de total responsabilidade do empreendedor, sem ônus de suas atividades ao órgão ambiental competente.

OBSERVAÇÕES

O órgão ambiental competente, mediante decisão motivada, poderá modificar as condicionantes e as medidas de controle e adequação, suspender ou cancelar esta autorização, caso ocorra:

- Violação ou inadequação de quaisquer condicionantes ou norma legal;

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE
CBRN - Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais
AUTORIZAÇÃO DE INSTALAÇÃO PARA EMPREENDIMENTOS DE CATIVEIRO

- Omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição da autorização; ou
- Superveniência de graves riscos ambientais e da saúde pública.

BASE LEGAL

RESOLUÇÃO SMA 48/14
Legislação: RESOLUÇÃO SMA 92/14
IN IBAMA 07/2015

A não observância das exigências descritas em legislação específica vigente será considerada infração administrativa ambiental e estará sujeita às sanções cabíveis.

AUTENTICAÇÃO

Autenticação: 1723494.3230008.1586885/2017

ANEXO C – Autorização de uso e manejo para empreendimentos de cativeiro

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE
CBRN - Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais
AUTORIZAÇÃO DE USO E MANEJO PARA EMPREENDIMENTOS DE CATIVEIRO

AUTORIZAÇÃO

Número/Ano: **Número: 0000012667 Ano: 2017 Data Emissão: 14/02/2017**

Processo: **Sigla: SMA Número: 000000015340 Ano: 2012**

Interessado: **CPF/CNPJ: 63.025.530/0081-99 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO**

Finalidade: **Autorização de Uso e Manejo**

Receber no Biotério de Tetrápode Silvestre da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, a doação de exemplares da espécie *Phrynos geoffroanus*, provindos Bosque Zoológico Fábio Barreto, para fins científicos. Os espécimes serão o modelo biológico na investigação da fisiologia da respiração de quelônios de água doce. Esse estudo está atrelado ao projeto de doutorado de Tábata Elise Ferreira Cordeiro, do Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada.

EMPREENDIMENTO

Tipo: **Criadouro Científico de Fauna Silvestre para Fins de Pesquisa**

CNPJ / CTF: **CNPJ: Não informado.**

Razão Social / Nome: **CRIAOURO CIENTIFICO DE FAUNA SILVESTRE P/ FINS DE PESQUISA FFCL/USP-RIBEIRÃO PR**

Endereço: **AV. BANDEIRANTES, 3900**

Bairro e CEP: **MONTE ALEGRE CEP: 14040901**

Município e UF: **RIBEIRÃO PRETO - SP**

Responsável: **Pietro Ciancaglini (CPF: 6257703824)**

FAUNA AUTORIZADA MANEJO

Classificação	Denominação
ESPECIE	<i>Phrynos geoffroanus</i> (CÁGADO DE BARBICHA) - Herpetofauna / REPTILIA / TESTUDINES / CHELIDAE / <i>Phrynos</i>

ATIVIDADES PERMITIDAS

Funcionamento de empreendimento de fauna silvestre em cativeiro, conforme atribuições definidas pela IN IBAMA nº07/2015.

ATIVIDADES NÃO PERMITIDAS

Desenvolvimentos de atividades não previstas para a categoria pela IN IBAMA nº07/2015.

CONDICIONANTES

Quaisquer alterações quanto à documentação/projeto do empreendimento deverão ser precedidas de anuência do órgão ambiental competente.

Em caso de ampliação das instalações ou de inclusão de nova espécie da fauna silvestre no plantel do empreendimento, o interessado deverá solicitar outra autorização prévia e autorização de instalação. Ao concluir as novas obras conforme projeto aprovado, deverá ser solicitada vistoria dos recintos e inclusão da nova espécie na autorização de manejo da fauna silvestre já emitida.

Em caso de exclusão de espécie já autorizada, o interessado deverá comunicar ao órgão ambiental competente, que providenciará a retirada da espécie desta autorização. Os custos de construção, manutenção das instalações, manejo e alimentação dos espécimes da fauna silvestre serão de total responsabilidade do empreendedor, sem ônus de suas atividades ao órgão ambiental competente.

OBSERVAÇÕES

O órgão ambiental competente, mediante decisão motivada, poderá modificar as condicionantes e as medidas de controle e adequação, suspender ou cancelar esta autorização, caso ocorra:

- Violação ou inadequação de quaisquer condicionantes ou norma legal;
- Omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição da autorização; ou
- Superveniência de graves riscos ambientais e da saúde pública.

BASE LEGAL

RESOLUÇÃO SMA 48/14
 Legislação: RESOLUÇÃO SMA 92/14
 IN IBAMA 07/2015

A não observância das exigências descritas em legislação específica vigente será considerada infração administrativa ambiental e estará sujeita às sanções cabíveis.

AUTENTICAÇÃO

Autenticação: 1723494.3230014.1587673/2017

ANEXO D – SIGAM – Extrato de Empreendimento de Fauna

<div> <p>Extrato de Empreendimento Fauna</p> <p>CRIADOURO CIENTIFICO DE FAUNA SILVESTRE P/ FINS DE PESQUISA FFCL/USP-RIBEIRÃO PRETO</p> </div>
CNPJ:	Tipo: Criadouro Científico de Fauna Silvestre para Fins de Pesquisa Situação: Autorizado Ano Referência: 2014			
Razão Social:	CRIADOURO CIENTIFICO DE FAUNA SILVESTRE P/ FINS DE PESQUISA FFCL/USP-RIBEIRÃO PR			
Endereço:	AV. BANDEIRANTES, 3900			
Complemento:	COMPLEMENTO			
Bairro:	MONTE ALEGRE CEP: 14040901			
Município:	RIBEIRÃO PRETO UF: SP			
Localização:	LOCALIZAÇÃO			
Telefone:	DDD: 16 Número: 3602 3670 Fax:			
E-mail:	esoliveira@usp.br / lispinelli@hotmail.com			
Web Site:				
Interessado:	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO			
Responsável:	Pietro Ciancaglini			
CTF IBAMA:				
Técnico Responsável:	CPF: ART:			
Funcionários:	Administrativos: 0 Técnicos: 0 Tratadores: 0			
Recursos:				
Atividades:	FAUNA SILVESTRE			
Observações:	Processo IBAMA: 02027.000503/2005-25 Tel.: (16) 3602 3633 / 3602 3655			
PROPRIEDADE				
Nenhuma Propriedade Seleccionada!				
PESSOAS				
CPF	Nome	Função		
	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO	Não Definida		
	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO	Não Definida		
06257703824	Pietro Ciancaglini	Responsável Legal - Empreendimento		
RECURSOS				
Tipo Recurso	Nome do Recurso	Quantidade		
Biotério	Biotério de Tetrápodes Silvestres da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto	1		
RECINTOS				
Tipo Recinto	Nome do Recinto	Área (m2)		
Caixa	1	0		
Caixa	10	0		
Caixa	2	0		
Caixa	3	0		
Caixa	4	0		
Caixa	5	0		
Caixa	6	0		
Caixa	7	0		
Caixa	8	0		
Caixa	9	0		
PLANTEL LOTES				
Nenhum Plantel Registrado!				
PLANTEL INDIVÍDUOS				
Identificação	Espécie	Nome do Indivíduo	Sexo	Descrição
REGISTRO p 1329/17	Phrynops geoffroanus	p 1329/17	I	
REGISTRO p 1662/18	Phrynops geoffroanus	p 1662/18	F	
REGISTRO p 1855/18	Phrynops geoffroanus	p 1855/18	F	
REGISTRO p 2104/19	Phrynops geoffroanus	p 2104/19	I	
REGISTRO p 2113/19	Phrynops geoffroanus	p 2113/19	I	
REGISTRO p 2170/19	Phrynops geoffroanus	p 2170/19	I	
REGISTRO p 2188/19	Phrynops geoffroanus	p 2188/19	I	
REGISTRO p 2218/19	Phrynops geoffroanus	p 2218/19	I	
REGISTRO p 2251/19	Phrynops geoffroanus	p 2251/19	I	
REGISTRO p 2258/19	Phrynops geoffroanus	p 2258/19	I	
REGISTRO p 2275/19	Phrynops geoffroanus	p 2275/19	I	
REGISTRO p 2285/19	Phrynops geoffroanus	p 2285/19	I	
	Phrynops geoffroanus	r 1297	I	