

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

DISSERTAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA TRAQUEIA E PULMÃO
DE *Podocnemis expansa* (Podocnemidae, Chelonia)

ROSILENE FREIRE VARGAS

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA TRAQUEIA E PULMÃO
DE *Podocnemis expansa* (Podocnemidae, Chelonia)**

ROSILENE FREIRE VARGAS

Sob a Orientação do Professor

Marcelo Abidu Figueiredo

e Co-orientação da Professora

Lycia de Brito Gitirana

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Seropédica, RJ

Julho de 2015

597.92

V297c

T

Vargas, Rosilene Freire, 1981-

Caracterização morfológica da traquéia e pulmão de *Podocnemis expansa* (Podocnemidae, Chelonia) / Rosilene Freire Vargas. - 2015. 58 f.: il.

Orientador: Marcelo Abidu Figueiredo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Bibliografia: f. 53-58.

1. Tartaruga - Teses. 2. Tartaruga - Aparelho respiratório - Teses. 3. Tartaruga - Aparelho respiratório - Histologia - Teses. 4. Tartaruga - Morfologia - Teses. I. Figueiredo, Marcelo Adibu. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

ROSILENE FREIRE VARGAS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,
no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

Examinadores:



Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo
Departamento de Biologia Animal - UFRRJ
(Orientador)



Prof. Dr. Clarice Machado dos Santos
Departamento de Morfologia - UFF



Prof. Dr. Mauricio Alves Chagas
Departamento de Morfologia - UFF

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,
Marco Antonio Vargas e Rose mary Freire V.
Vargas, pelo amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela saúde, fé e perseverança que tem me dado e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais com todo o meu amor e gratidão, por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida, pelo amor incondicional, pelo incentivo na minha busca pelo conhecimento e pela formação do meu caráter.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo, por ter me aceitado como sua orientanda, pela seriedade profissional e ensinamentos transmitidos.

A Prof^a. Dr^a. Lycia de Brito Gitirana, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Histologia Integrativa.

Aos meus avós (in memoriam) e a todos os meus familiares que acompanham a minha história desde o meu nascimento e que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao meu afilhado Maksuel, por ter compreendido minha ausência, devido ao tempo que me dediquei a este trabalho.

Ao meu namorado Pablo Lima, pela dedicação, pelo companheirismo e paciência em me ouvir falar todos os dias sobre este trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Histologia Integrativa Amanda Abe, Juliane Siqueira, Adriana Alves Pelli Martins, Isabella Cabral, João Soares, Sebastião Junior, Prof^a. Dr^a Morgana Castelo Branco, pela parceria dentro e fora do laboratório, me ajudando em vários momentos.

A minha amiga Daniela Felix, que me recebeu tão bem no alojamento feminino da pós-graduação da UFRRJ, pelos conselhos, além de dividir a geladeira comigo. E a todas as companheiras do alojamento pelo convívio e pelas conversas produtivas na cozinha.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, como o Luiz Felipe e Carlos Augusto, pela colaboração na busca de algumas bibliografias.

As minhas amigas da graduação Ludmila Andrade, Bianca Kopinits e Jamille Silva, pela verdadeira amizade, mesmo distante sempre se prontificaram em me ajudar.

Aos meus amigos de longa data Palloma Medeiros, Bruno Aragão, Daniel Medina, Walter Lima, Joyce Cunha, Társila Esteves, Natália Peçanha, Renata Damásio, Rodrigo Monteiro e Keila Machado, por terem acompanhado minha trajetória e tantas vezes terem provado serem meus verdadeiros amigos.

Aos meus animais de estimação, as minhas gatinhas Princesa, Tica e Cacinha, a presença delas fizeram meus momentos de estudos mais agradáveis.

Aos membros da banca examinadora por terem atendido ao convite, dispondo parte do seu tempo para contribuir neste trabalho.

Ao Instituto de Biologia da UFRRJ, por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho, e a sua secretaria da pós-graduação, por toda atenção prestada.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

VARGAS, Rosilene Freire. **Caracterização morfológica da traqueia e pulmão de *Podocnemis expansa* (Podocnemidae, Chelonia)**. 2015. 46p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a traqueia e pulmão da espécie *Podocnemis expansa*, utilizando-se a análise macroscópica, a microscopia estereoscópica e a microscopia de luz. A *P. expansa* possui alto potencial para a exploração zootécnica com alto valor econômico de sua carne e seus subprodutos, o que ocasionou uma caça predatória e com isso esse animal desapareceu de muitos rios, surgindo assim, o interesse por sua criação em cativeiro. Para este estudo, foram utilizados cinco tartarugas machos adultos doados de um criadouro comercial, os mesmos foram eutanasiados e a traqueia e os pulmões removidos. Estes órgãos foram clivados e imediatamente fixados por imersão em formol neutro tamponado a 10% e/ou líquido de Bouin. Depois disso, os fragmentos foram processados de acordo com a técnica padrão histológica para inclusão em parafina. Após a microtomia os cortes foram submetidos a técnicas de coloração, como a hematoxilina-eosina, tricrômico de gomori e alcian blue (AB) em pH 2,5. A microscopia de luz revela que a traqueia e os brônquios extrapulmonares são longos e apresentam formato cilíndrico, sustentados por uma série de anéis cartilagosos. O pulmão de *P. expansa* possui parênquima semelhante a favos de mel, formado por um único brônquio intrapulmonar e por três formas distintas de trabéculas: primária, secundária e terciária. Assim, o pulmão apresenta-se como um órgão esponjoso sem lobulação, altamente vascularizado e multicameral. A análise histológica mostrou que a traqueia é revestida por um epitélio respiratório do tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes, sustentados por uma lâmina própria, seguida de uma peça de cartilagem hialina e de uma camada serosa. A camada submucosa não foi observada. Assim, o muco que mantém a mucosa respiratória umedecida é elaborado apenas pelas células caliciformes do epitélio. No pulmão as trabéculas primárias são revestidas por um epitélio pseudoestratificado composto por células ciliadas, mucossecretoras e basais. Na superfície luminal das trabéculas secundárias se observa a mudança progressiva do epitélio pseudoestratificado para o epitélio pavimentoso simples típico de troca gasosa. As trabéculas terciárias são revestidas por dois tipos celulares, o pneumócito tipo I, responsável pelas trocas gasosas, e os pneumócitos tipo II, relacionados com a produção de surfactantes.

Palavras-chave: Tartaruga da Amazônia, Quelônios, Histologia, Sistema Respiratório.

ABSTRACT

VARGAS, Rosilene Freire. **Morphological characterization of the trachea and lung of *Podocnemis expansa* (Podocnemidae, Chelonia)**. 2015. 46 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Biology). Institute of Biology, Rio de Janeiro Federal Rural University, Seropédica, RJ. 2015.

This study was carried out to characterize the trachea and lung of the giant South American turtle, *Podocnemis expansa*. For this purpose, macroscopy, stereoscopic microscopy and light microscopy were used. This species was chosen because of its potential for zootechnical exploitation and the high value of its meat and byproducts, which have caused overhunting and thus interest in commercial breeding. Five adult male turtles were examined, donated by a commercial breeder. The specimens were euthanized and the trachea and lungs were removed and cut into 5-mm thick fragments and immediately fixed by immersion in neutral formal buffered to 10% and/or Bouin's fluid. After that, the fragments were processed according to the standard histological technique for embedding in paraffin. The sections were stained with hematoxylin-eosin, Gomori's trichrome and Alcian blue (AB) at pH 2.5. The trachea and extrapulmonary bronchi are elongated and cylindrical, supported by a series of cartilaginous rings. The lung of *P. expansa* has a parenchyma in the shape of a honeycomb, formed by a single intrapulmonary bronchus and three distinct types of trabeculae: primary, secondary and tertiary. Therefore, the lung is a spongy, highly vascularized and multi-chambered organ without lobules. The histological analysis revealed that the trachea is covered with ciliated columnar pseudostratified respiratory epithelium with goblet cells, supported by a lamina propria, followed by a piece of hyaline cartilage and a serosa layer. The trachea of *P. expansa* does not have a submucosa layer. Therefore, the mucous that maintains the respiratory mucosa moist is secreted only by the goblet cells of the epithelium. The primary trabeculae are covered by a pseudostratified epithelium composed of ciliated, mucous-secreting and basal cells. On the luminal surface of the secondary trabeculae a progressive change can be observed from a pseudostratified to a simple squamous epithelium, typical of a structure for gas exchange. The tertiary trabeculae are covered by two cell types, the type I pneumocytes, responsible for the gas exchange and pneumócitos type II, associated with the production of surfactants.

Keywords: Giant South American turtle, Chelonians, Histology, Respiratory System.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Visão geral da anatomia interna de um réptil	4
Figura 2	Anatomia interna de uma fêmea de lagarto	5
Figura 3	Circulação venosa em tartaruga	6
Figura 4	Localização do órgão de Jacobson.....	7
Figura 5	Esqueleto, carapaça e plastrão de tartaruga	8
Figura 6	Ovo de réptil com embrião em desenvolvimento	9
Figura 7	Ventilação dos pulmões no jacaré Caiman	11
Figura 8	Localização do pulmão dentro da carapaça de um quelônio	12
Figura 9	Músculos envolvidos com os movimentos respiratórios de um quelônio	12
Figura 10	<i>Podocnemis expansa</i>	12
Figura 11	Ilustração do movimento da retração do pescoço de testudinos	13
Figura 12	Mapa de distribuição geográfica de <i>P. expansa</i>	14
Figura 13	Etapas da técnica histológica	20
Figura 14	Fotografia de <i>P. expansa</i> . Notar a traqueia se bifurcando	23
Figura 15	Fotografia do pulmão de <i>P. expansa</i> . Dentro do pulmão, o brônquio se ramifica e, a medida que penetra no parênquima do órgão, suas dimensões diminuem e sua parede se torna mais simplificada.	24
Figura 16	Fotografia de <i>P. expansa</i> . Notar o aspecto esponjoso do parênquima pulmonar.....	25
Figura 17	Detalhe das câmaras pulmonares com pequenos alvéolos.....	25
Figura 18	Fotomicrografia da traqueia de <i>P. expansa</i>	26
Figura 19	Fotomicrografia da traqueia de <i>P. expansa</i> . Notar células caliciformes por entre as células ciliadas epiteliais (→). Notar a peça de cartilagem hialina.	27
Figura 20	Fotomicrografia da traqueia de <i>P. expansa</i> . Notar que a matriz cartilaginosa é alcianofílica assim como as células caliciformes presentes no epitélio (→).....	28
Figura 21	Visão geral da traqueia de <i>P. expansa</i> , mostrando o epitélio respiratório (E) sustentado pelo tecido conjuntivo, formando a camada mucosa.....	29
Figura 22	Fotomicrografia do pulmão de <i>P. expansa</i> . Notar um brônquio intrapulmonar, revestido por epitélio respiratório (E).	30

Figura 23	Fotomicrografia de <i>P. expansa</i> . Notar a trabécula primária, onde a sustentação é feita por tecido muscular do tipo liso.	31
Figura 24	Fotomicrografia do pulmão de <i>P. expansa</i> . Notar septos que se projetam para a luz do pulmão.	32
Figura 25	Fotomicrografia do pulmão de <i>P. expansa</i> . Notar células musculares lisas sustentados as extremidades dos septos, os quais são revestidos por células ciliadas, agora organizadas em uma única camada, entremeadas por células caliciformes.	33
Figura 26	Fotomicrografia do pulmão de <i>P. expansa</i> . Note a mudança abrupta do epitélio cilíndrico ciliado (E) para o epitélio simples que reveste a lateral dos septos.	33
Figura 27	Fotomicrografia de um septo pulmonar. Notar na trabécula terciária as células pavimentosas e cubóides revestindo a superfície do septo (setas).....	34

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii
1.0. INTRODUÇÃO	1
2.0. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Classe Reptilia: generalidades	2
2.2. Ordem Chelonia.....	7
2.3. Aparelho respiratório dos répteis.....	9
2.4. Espécie <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812.....	12
3. OBJETIVO	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Captura e transporte.....	19
4.2. Procedimento para o estudo macroscópico	19
4.3. Procedimento para a estereomicroscopia	19
4.4. Procedimento para estudo em microscopia de luz de campo claro (ML)	20
4.4.1. Técnicas histoquímicas para observação da morfologia do órgão	20
4.4.1.1. Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE) (LILLIE e FULLMER, 1976).....	20
4.4.1.2. Técnica de coloração pelo Tricrômico de Gomori (LILLIE e FULLMER, 1976).....	21
4.4.1.3. Técnica de coloração pelo Alcian Blue (AB) pH 2,5 (KIERNAN, 1990).....	21
4.4.2. Técnica de imuno-histoquímica para detecção de células de serotonina	21
5. RESULTADOS	23
5.1. Macroscopia	23
5.2. Microscópio estereoscópico	24
5.3. Microscopia	26
5.3.1. Traqueia	26
5.3.2. Pulmões	29
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

Os répteis surgiram na Terra aproximadamente há cerca de 325 milhões de anos após um período onde os anfíbios, por mais de 50 milhões de anos, foram os maiores animais vivos fora da água. Nos dias de hoje, existem 23 ordens de répteis existentes, apenas quatro sobreviveram até hoje, estando agrupadas em: Crocodylia (crocodilos, jacarés, aligátores e gavial), Chelonia ou Testudinata (tartarugas, cágados e jabutis), Squamata (lagartos, serpentes e anfisbena) e Rynchocephalia (tatuara). Essas ordens são bastante distintas, tanto em suas origens como em sua morfologia (POUGH e col., 2003; HICKMAN e col. 2004).

A maioria dos répteis só consegue sobreviver em um ou em poucos ambientes distintos, sendo desta forma especialista em habitats. A grande maioria das espécies de lagartos e serpentes das florestas tropicais brasileiras não consegue sobreviver em ambientes alterados, como pastos, plantações de diversos tipos e até de florestas monoespecíficas para extração de madeira e celulose, como eucaliptais e pinheirais (MARTINS e MOLINA, 2008).

Além da importância ecológica, várias espécies de répteis possuem também importância socioeconômica, como, por exemplo alguns quelônios, por servir de alimento a populações humanas. Das serpentes venenosas, seus venenos dão origem a medicamentos utilizados amplamente no Brasil e ao redor do mundo (MARTINS e MOLINA, 2008).

Vários estudos tem sido realizados sobre o sistema respiratório de diferentes espécies de répteis, como crocodilos (SOLOMON e PURTON, 1984; PERRY, 1988). No entanto, a morfologia do sistema respiratório da *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) não tem sido amplamente estudado.

A *P. expansa*, conhecida popularmente como tartaruga gigante ou tartaruga da Amazônia, tem ampla distribuição no rio Amazonas e seus afluentes (LUZ e col. 2003), sendo o maior quelônio de água doce da América do Sul, podendo ter seu comprimento superior a 80 cm e a largura acima de 60 cm, até 107 cm de comprimento, pesando em torno de 60Kg (ANDRADE, 2007).

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi caracterizar a morfologia da traqueia e pulmão de *P. expansa*, a fim de ampliar os conhecimentos sobre o seu sistema respiratório, para isto utilizamos um microscópio estereoscópico, microscopia de luz de campo claro e a técnica de imuno-histoquímica para a detecção de células de serotonina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Classe Reptilia: generalidades

A classe Reptilia incluem os primeiros vertebrados a conquistarem independência total do ambiente aquático, há cerca de 325 milhões de anos. Isso se deu principalmente devido ao surgimento das três membranas extraembrionárias (âmnion, córion e alantoide), que evitam a dessecação e promovem proteção do embrião durante seu desenvolvimento, bem como a excreção de metabólitos e a respiração desse embrião (MARTINS e col., 2012). Além disso, sobre essas membranas desenvolveu-se uma casca suficientemente porosa para permitir a passagem de gases respiratórios, mas sólida o suficiente para propiciar proteção contra o ambiente, além de conter uma grande quantidade de vitelo fornecendo assim, o alimento para o crescimento do embrião, o que favoreceu aos répteis conquistarem ambientes com escassez de água (ORR, 1986).

Os répteis atuais compreendem duas linhagens de vertebrados amniotas que se originaram a partir de tetrápodes semelhantes aos anfíbios existentes no final da Era Paleozóica. Essas duas linhagens são os amniotas anápsidos (sem fenestras temporais), representados pelas tartarugas, e os amniotas diápsidos (duas fenestras temporais), representados pelos lagartos, cobras, crocodilianos e tuataras (HICKMAN e col., 2004).

Embora reunidos em uma mesma classe, os répteis compreendem pelo menos três grupos distintos: os escamados (serpentes, lagartos e anfisbenas), os quelônios (tartarugas, jabutis e cágados) e os crocodilianos (crocodilos e jacarés) (MARTINS e col., 2012).

Até dezembro de 2012, são reconhecidas 744 espécies de répteis naturalmente ocorrentes no Brasil: 36 quelônios, 6 jacarés, 248 lagartos, 68 anfisbenas e 386 serpentes (SBH, 2014). Desta forma, o Brasil ocupa a segunda colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de répteis, ficando atrás apenas da Austrália (SBH, 2014).

A classe Reptilia está amplamente distribuída em todos os continentes, apesar de não ocorrer na Antártida, sendo que sua distribuição ocorre principalmente nos trópicos e subtropicais (HICKMAN e col., 2004). Isso ocorre devido aos répteis serem animais ectotérmicos, ou seja, eles dependem de fontes externas de calor para manutenção da temperatura corporal (MARTINS e col., 2012) e por esse motivo são mais diversos e abundantes nas regiões mais quentes (MARTINS e MOLINA, 2008).

Em geral, os répteis são cobertos com escamas (MADER, 2009). A sua pele consiste de uma epiderme relativamente delgada que se sobrepõem a derme, não havendo tecido adiposo da hipoderme (PARÉ, 2006). As escamas são formadas em grande parte por queratina, derivadas principalmente da epiderme, não sendo assim, homólogas as escamas dos peixes, que são estruturas ósseas dérmicas (HICKMAN e col., 2004). A distribuição e disposição dessas escamas sobre o corpo são notavelmente consistentes dentro de cada espécie, sendo elas muitas vezes utilizadas na sistemática como chaves de identificação de répteis. Além disso, possuem a função de evitar a perda de água quando esses animais encontram-se expostos ao sol (PARÉ, 2006).

Em relação a anatomia interna dos répteis é possível tecer algumas considerações (Fig. 1). No sistema digestório existe pouca variação entre os répteis. A cavidade oral se abre para faringe, a qual segue para o esôfago, que se continua com o estômago, intestinos delgado e grosso, ceco, finalizando numa cloaca. Os répteis também possuem um fígado bem desenvolvido. Todos os répteis apresentam dentes, exceto os quelônios que são desprovidos destes, mas apresentam um bico córneo, que o auxilia no corte do alimento (PARÉ, 2006).

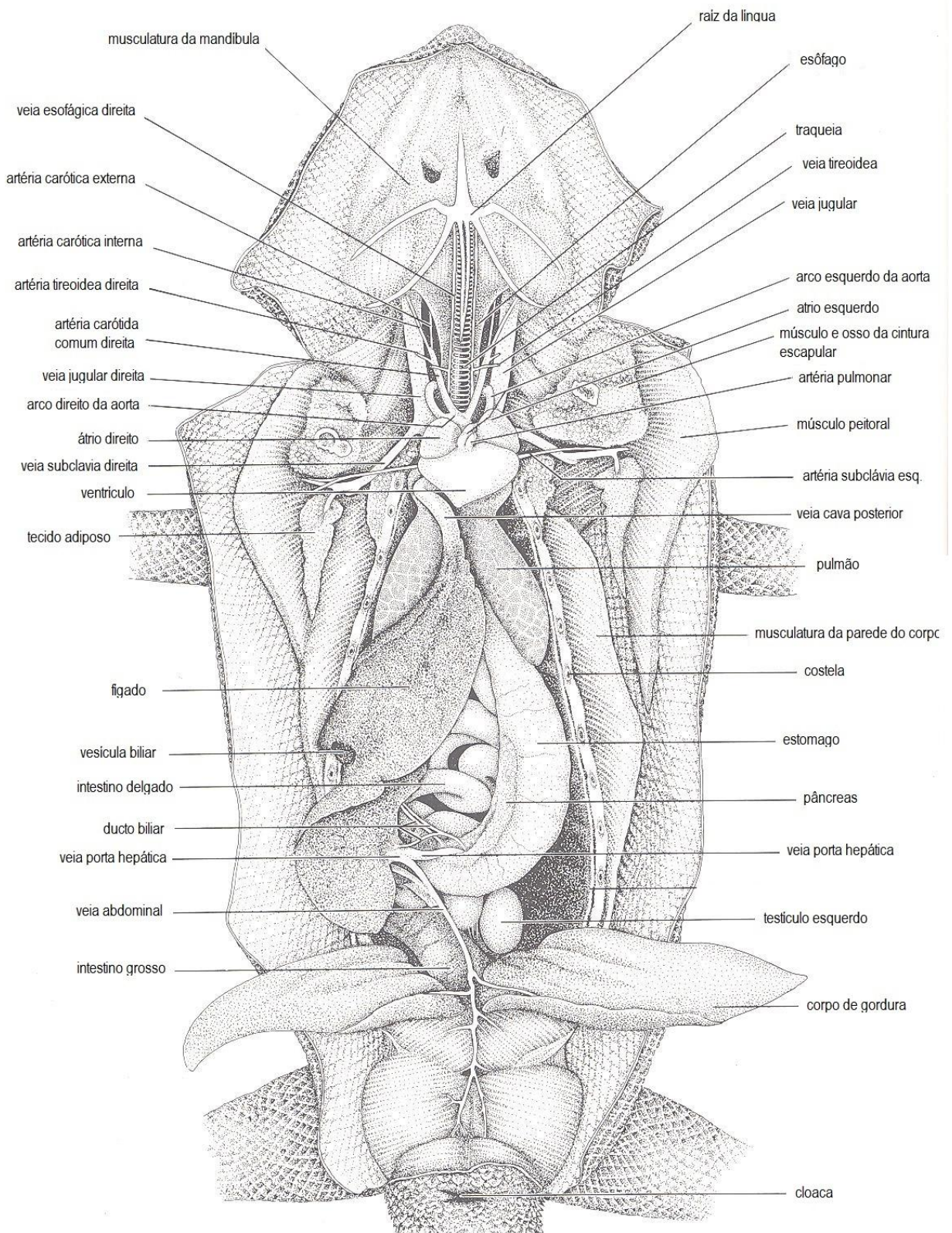


Fig. 1: Visão geral da anatomia interna de um réptil (Storch e Welsch, 1996; modificado)

As maxilas reptilianas são projetadas para um rápido fechamento, mas, uma vez que a presa é capturada, pouca força pode ser aplicada. Entre os répteis, os músculos das maxilas tornam-se maiores, mais longos e organizados para uma melhor eficiência mecânica (HICKMAN e col., 2004).

Os ovários e testículos são pares nos répteis. No crocodilo, os machos em estado maduros possuem dois testículos arredondados situados perto dos bordos mediano-ventrais aos rins. De cada testículo parte um ducto deferente que se dirige para trás em direção à cloaca, na frente do ureter, unindo-se com o pênis mediano no assoalho ventral da cloaca. Nas fêmeas adultas, dois ovários estão dispostos em posição semelhante, próximos aos rins (fig. 2). Próximo à parte anterior de cada rim, situa-se o funil aberto de um oviduto, o qual se dirige para trás até desembocar na cloaca. Nos ovários, os óvulos se formam, sendo liberados, passando para o infundíbulo, seguindo pelos ovidutos, onde cada um é fecundado e envolvido por albumina, membranas da casca e uma casca antes da postura (STORER e col., 1991).

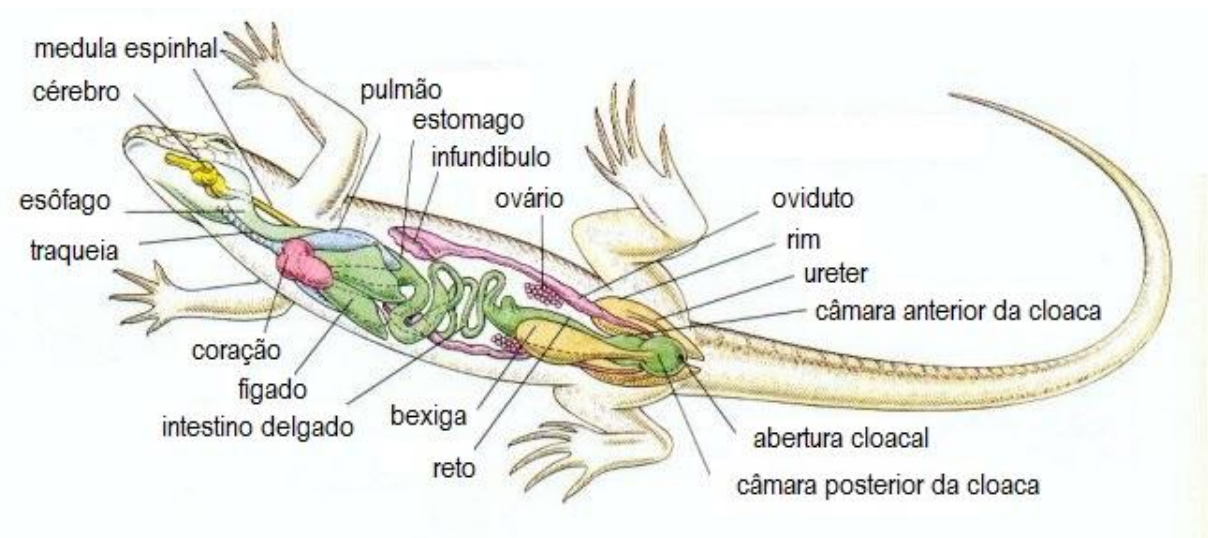


Fig. 2: Anatomia interna de uma fêmea de lagarto.
Fonte: <http://universe-review.ca/R10-33-anatomy09.htm>; modificado

Para que ocorra a fecundação interna, os répteis possuem sempre algum tipo de órgão copulatório, para que assim ocorra a transferência dos espermatozoides dos machos para as fêmeas. Nos lagartos e serpentes há uma estrutura par na cloaca, chamada hemipênis, que serve para este propósito (ORR, 1986).

Os répteis possuem um sistema circulatório eficiente e com uma pressão sanguínea mais alta que a dos anfíbios. Em todos os répteis, o átrio direito, que recebe sangue não oxigenado que vem do corpo, é completamente separado do átrio esquerdo, que recebe sangue

oxigenado dos pulmões (Fig.3). Já o ventrículo é parcialmente dividido por um septo, na maioria dos répteis, o que contribui para a mistura de sangue oxigenado e desoxigenado nessa região (ORR, 1986). Nos aligátors e crocodilianos o completamente dividido em duas câmaras, entretanto exista essa separação no ventrículo, a mistura de sangue ocorre no Forâmen de Panizza, que é o local de comunicação entre a artéria aorta e artéria pulmonar, porém essa mistura é menor do que nos demais outros répteis (MORANDINI, 1969).

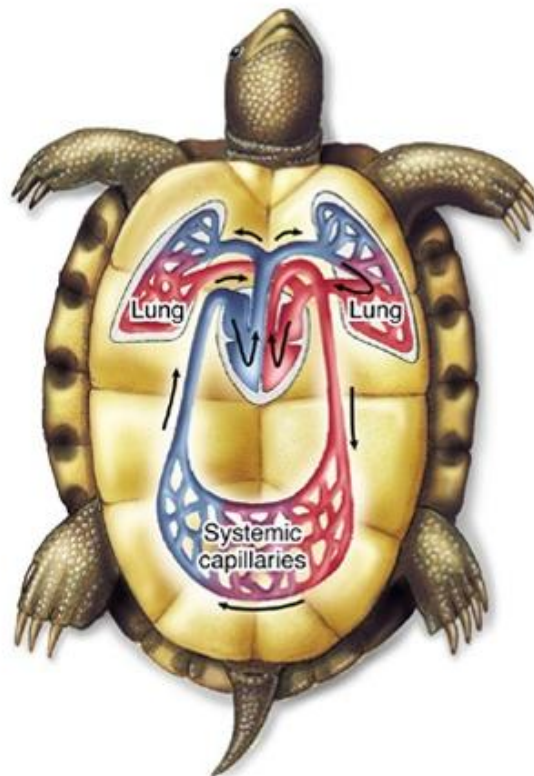


Fig. 3: Esquema da circulação sanguínea em tartaruga.
Fonte: <http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/f29.13.jpg>; modificado

Os répteis desenvolveram adaptações eficientes de economia hídrica. Muitos deles possuem glândulas de sal, localizadas perto das narinas ou dos olhos, a finalidade destas glândulas é promover a rápida eliminação de sal no sistema, que passa por meio de um ducto, ou ductos, para a cavidade nasal. Acredita-se que a eliminação de sal por este método extrarrenal esteja associada a preservação da água. Reduzindo a concentração de sal na urina, uma quantidade maior de urina pode ser reabsorvida na cloaca. Isso seria muito vantajoso para um réptil que vive em ambientes secos (ORR, 1986).

O sistema nervoso reptiliano é consideravelmente mais complexo que dos anfíbios. No sistema nervoso central dos répteis há um aumento dos hemisférios cerebrais e com isso ocorre a mudança do centro nervoso para a região do cérebro, os répteis assim como os

anfíbios também apresentam 15 nervos cranianos (ORR, 1986). Apesar do pequeno tamanho do encéfalo dos répteis, o telencéfalo é maior em relação ao resto do encéfalo. Os crocodilianos possuem o primeiro córtex cerebral verdadeiro (neopálio). Com exceção da audição, os órgãos dos sentidos são em geral bem mais desenvolvidos do que os observados em anfíbios. Cobras e lagartos possuem uma estrutura sensorial chamada de órgão de Jacobson ou órgão vomeronasal, onde os odores são transportados através da língua até órgão de Jacobson (Fig. 4) (MADER, 2009).

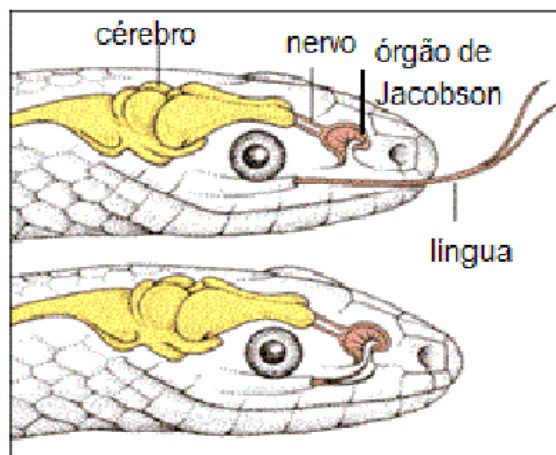


Fig. 4: Localização do órgão de Jacobson.

Fonte: <http://honorsbiology6.wikispaces.com/Reptiles+-+Sensory+Systems>

2.2 – Ordem Chelonia

A principal característica morfológica de um quelônio é a presença de um casco (POUGH e col., 2003) que protege os órgãos internos, sendo este formado pela fusão das costelas, externo e vértebras (Fig. 5). Em geral, denomina-se casco ao conjunto das partes rígidas dorsal e peitoral. Contudo, a parte superior denomina-se carapaça, sendo achatada, mais larga na região posterior, com coloração marrom, cinza ou verde-oliva, e a inferior plastrão, sendo ambos compostos por placas ossificadas revestidas por uma camada queratinosa de forma convexa e achatada, quase horizontal, unidas por uma estrutura óssea conhecida por ponte (ANDRADE, 2007).

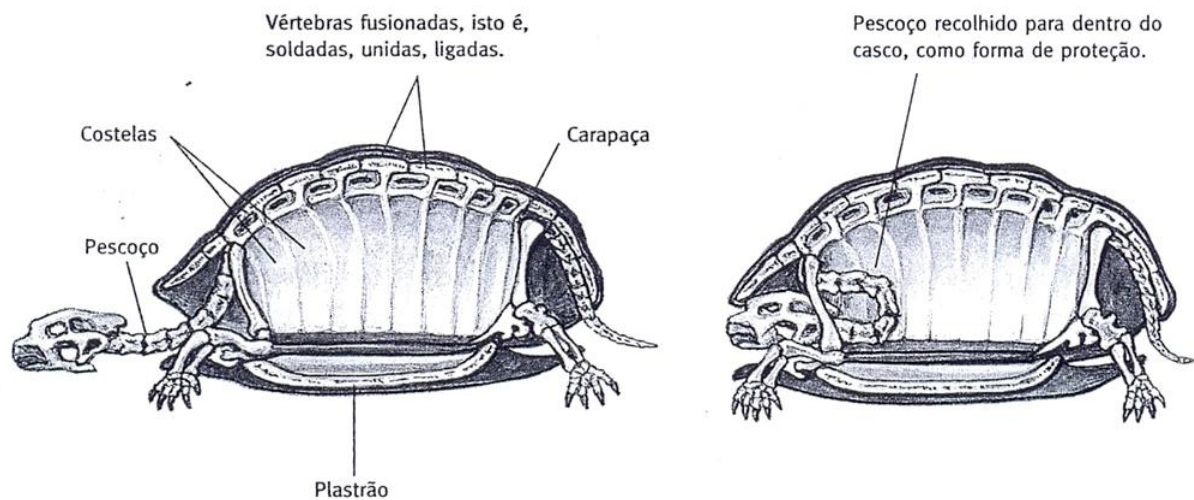


Fig. 5: Esqueleto, carapaça e plastrão de tartaruga.

Fonte: <http://4anopurissimo.blogspot.com.br/2013/10/esqueleto-de-tartaruga.html>

Em relação à taxonomia, os quelônios estão incluídos nas seguintes categorias: Classe Reptilia, Ordem Testudines, Subordens Cryptodira e Pleurodira. Sendo que, nos criptodiros o pescoço se retrai para dentro do casco acompanhando o plano sagital, enquanto que nos pleurodiros o pescoço se retrai lateralmente (NASCIMENTO e col., 2012).

O crânio dos quelônios se apresenta de forma anapsida, ou seja, crânio sem abertura temporal, e os mesmos são desprovidos de dentes (LEGLER e GEORGES, 1993).

Entre os quelônios existem tanto espécies herbívoras quanto carnívoras, e ainda há algumas espécies da família Podocnemididae que são onívoras, ou seja, se alimentam tanto de animais quanto de vegetais (MARTINS e col., 2012).

A anatomia de um animal define como ele pode viver e interagir com o seu ambiente, sendo assim, a sua forma e estrutura em geral mostram como o animal pode se mover (LUTZ e col., 2003). Com isso podemos observar em algumas espécies os membros em forma de remo, como nos quelônios marinhos, enquanto que nas demais espécies de quelônios, tanto nas aquáticas quanto nas semi-aquáticas, os membros têm cinco dedos individualizados, com unhas, sendo o quinto dedo posterior inerte, palmados ou não. Nas espécies terrícolas, os membros são colunares e robustos, sendo que esta adaptação tem a finalidade de suportar o peso do corpo, além de não apresentarem a membrana interdigital e apenas as unhas são individualizadas (NASCIMENTO e col., 2012).

Os quelônios são ectotérmicos e por meio da termorregulação, ou seja, através da troca de energia térmica com o ambiente podem atingir um grau considerado de estabilidade da temperatura corpórea. A temperatura corporal desses animais que se aquecem ao sol é mais elevada do que a temperatura dos que se aquecem na água. Este maior aquecimento pode

acelerar a digestão, o crescimento e o desenvolvimento dos ovos desses animais (ANDRADE, 2007).

Os quelônios, em geral, possuem um tubo digestório completo, seu estômago apresenta-se sendo uma dilatação do tubo digestivo, terminando em um orifício chamado de cloaca, semelhante ao das aves, pelo qual desemboca a urina, fezes e material seminal, ocorrendo também a vascularização nas paredes como “brânquias cloacais”. Essa região, possivelmente, realiza uma respiração cutânea mínima (sangue-parede/vascular-água). O fígado e o pâncreas auxiliam a digestão, onde ocorre parcialmente no estômago e é finalizada no intestino, havendo, neste último, a absorção do alimento, que foi digerido no duodeno. No intestino grosso ocorre a formação de fezes (ANDRADE, 2007).

Os quelônios são ovíparos e não exibem o cuidado parental (POUGH e col., 2003).

2.3 - Aparelho respiratório dos répteis

A troca gasosa nos embriões dos répteis acontece por meio da membrana alantoide (Fig. 6), que é uma membrana extraembrionária vascularizada que se estende a partir do intestino posterior para se unir ao córion, logo abaixo da casca do ovo (LIEM e col., 2013).

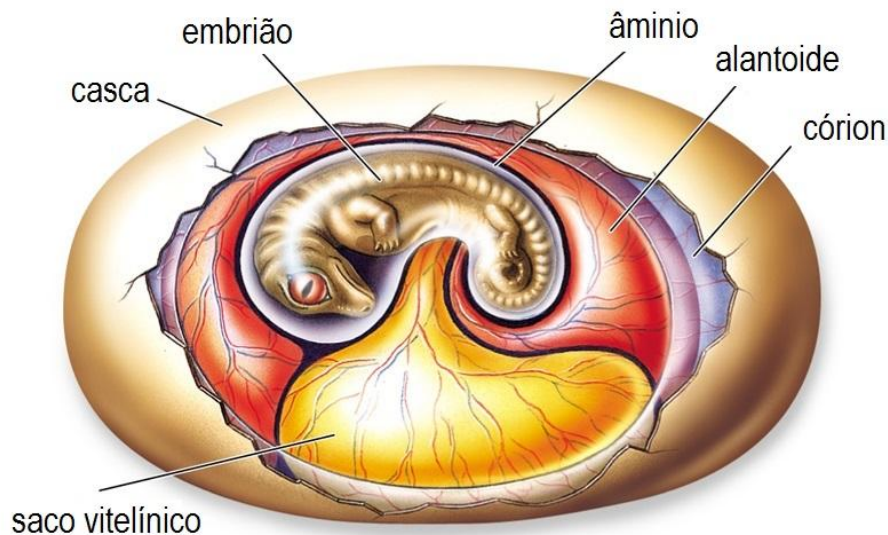


Fig. 6: Ovo de réptil com embrião em desenvolvimento.

Fonte: <http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/f26.17.jpg>, modificado

O sistema respiratório dos répteis é composto pela traqueia, brônquios e pulmão direito e esquerdo (WYNEKEN, 2001). O ar entra pelas narinas e segue para as coanas,

presente na maioria dos répteis, em seguida flui para a laringe, traqueia e brônquios a partir do qual entra dos pulmões (STORER e col., 1991).

Os répteis apresentam um pescoço longo e um tubo laringotraqueal dividido em uma laringe e uma traqueia (LIEM e col., 2013; HSIA e col., 2013). A parede da laringe apresenta-se suportada por um par de cartilagens aritenoides que flanqueiam a glote e por uma cartilagem cricoide em forma de anel (MORANDINI, 1969). Nos répteis, a traqueia, assim como a laringe, também é composta por anéis cartilagosos. Estas estruturas de apoio à traqueia tem a função de evitar o colapso da luz traqueal (WYNEKEN, 2001).

O enchimento dos pulmões em répteis é baseado em um mecanismo de bomba de aspiração, onde a mesma atua nas paredes do pulmão alterando sua forma e induzindo o fluxo de ar para dentro e para fora. As costelas alteram a forma das paredes do corpo ao redor dos pulmões e os músculos intercostais que localizados entre essas costelas as movimentam. Nos lagartos, por exemplo, conjuntos de músculos intercostais movem ativamente as costelas para frente e para fora durante a inalação. O resultado é o aumento da cavidade ao redor dos pulmões, a diminuição da pressão entre eles e a sucção de ar para dentro dos pulmões. Durante a exalação ativa, diferentes conjuntos de músculos intercostais se contraem para dobrar as costelas de volta para trás e para dentro, comprimindo, desta forma, os pulmões na sua cavidade e expelindo o ar. Ocasionalmente, a exalação é passiva. Nesse caso, a contração muscular é mínima e a gravidade (e algum recuo elástico) atua nas costelas fazendo-as comprimir a cavidade do pulmão. Entre as respirações, a glote é fechada para evitar o escape prematuro de ar (KARDONG, 2011).

Como os pulmões são órgãos que necessitam de espaço para se expandirem durante a respiração, possuir dois pulmões expandindo a cada ciclo respiratório poderia ser um problema para as cobras, em função do espaço interno reduzido do seu corpo. Então esse órgão passou por modificações anatômicas para se ajustar ao formato cilíndrico e alongado de seu corpo, reduzindo o seu tamanho ou ocorrendo a perda completa do pulmão esquerdo. Para compensar essa perda e garantir que as trocas gasosas sejam realizadas com eficiência, o pulmão direito é grande e bem desenvolvido (FRAGA e col., 2013).

Nos crocodilos, a ventilação pulmonar acontece por meio de uma bomba de pistão hepática, além da bomba de aspiração costal, isto por que seus pulmões se encontram anteriores ao fígado e a contração de um diafragma muscular exclusivo (que não é homólogo ao diafragma dos mamíferos), que se estende do fígado à cintura pélvica, move o fígado caudalmente e aumenta as cavidades pleurais, provocando a entrada de ar fresco para

pulmões. A expiração ocorre pela contração dos músculos abdominais do flanco, que aumentam a pressão intra-abdominal e deslocam o fígado para frente (Fig. 7) (LIEM e col., 2013; TAYLOR e col., 2010).

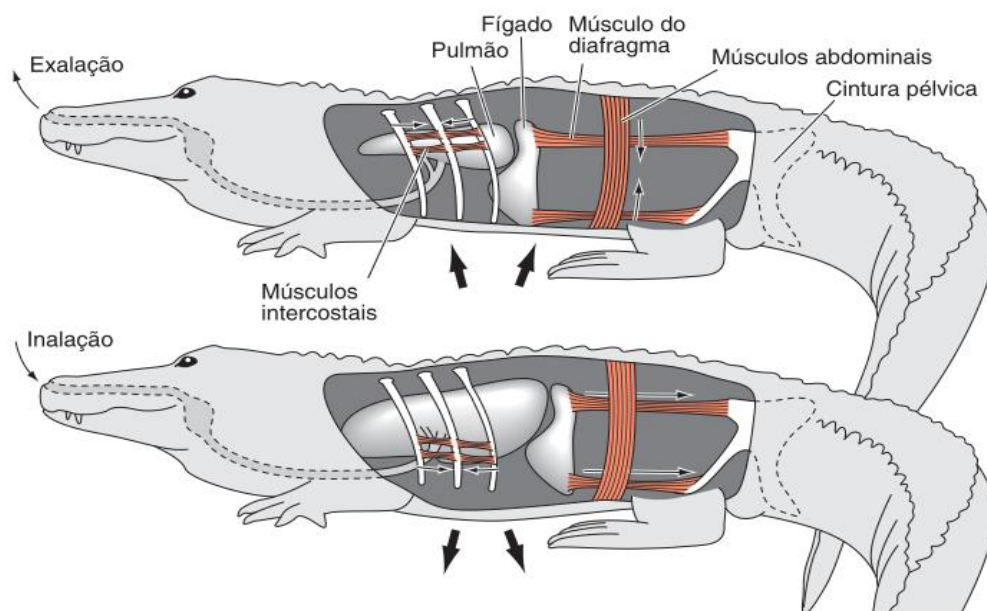


Fig. 7: Ventilação dos pulmões no jacaré Caiman. As setas pequenas dentro do corpo mostram a contração de diferentes músculos. As setas grandes abaixo do animal mostram os movimentos da parede abdominal.
Fonte: LIEM, 2013.

Nos quelônios, os pulmões estão localizados dorsalmente e ligados a carapaça. Ventralmente e à esquerda, o pulmão está ligado ao estômago através do ligamento gastropulmonar, sendo que o pulmão direito está ligado ao lobo direito do fígado pelo ligamento hepatopulmonar. Posteriormente, os pulmões estão ligados ao peritônio que recobre os rins e as glândulas adrenais e são adjacentes a gônadas (WYNEKEN, 2001).

Em razão dos quelônios serem, dentre os vertebrados, os únicos animais que possuem o seu corpo envolto por casco, o que afeta diretamente o seu processo respiratório, estes precisaram adaptar-se ao mecanismo de inalação e exalação para uma estrutura rígida (ALMONACID e col., 2007). Acreditava-se que esses animais movimentando seus membros anteriores e posteriores para dentro e para fora, poderia mudar a pressão dos pulmões (TAYLOR e col., 2010); porém, estudos recentes mostraram que esses movimentos não são suficientes para a ventilação pulmonar. Para que a respiração pulmonar ocorra com sucesso, a ventilação é realizada pela ação de um músculo transversal do abdômen e um “diafragma”

muscular, que elevam o plastrão ventral em direção à carapaça, diminuindo o volume da cavidade do corpo e provocando, conseqüentemente, a exalação do ar dos pulmões. A inalação ocorre com o aumento do volume da cavidade corpórea pelo músculo oblíquo do abdômen (Fig. 8 e 9) (LIEM e col., 2013).

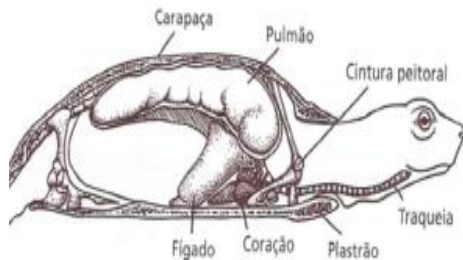


Fig. 8: localização do pulmão dentro da carapaça de um quelônio.
Fonte: KARDONG, 2011

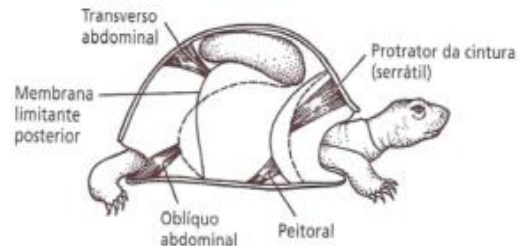


Fig. 9: músculos envolvidos com os movimentos respiratórios de um quelônio.
Fonte: KARDONG, 2011

Alguns quelônios também realizam a troca gasosa através da cavidade bucofaríngea ou mesmo através da cloaca, onde existe uma região vascularizada chamada bursa, onde a água é bombeada a fim de absorver oxigênio, além de auxiliar na flutuabilidade (ALMONACID e col., 2007).

2.4 - Espécie *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812

A espécie *Podocnemis expansa* (fig. 10) pertence ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, classe Reptilia, subclasse Anapsida, ordem Chelonia (Testudinata), subordem Pleurodira, superfamília Chelonioidea, família Pelomedusidae, gênero *Podocnemis* e espécie *P. expansa* Schweigger (1812) (CENAQUA, 1992).



Fig. 10: *Podocnemis expansa*
Fonte: <http://combinacionanimal.blogspot.com.br/2010/06/tortuga-gigante-del-orinoco-podocnemis.html>

Essa espécie é o maior pleurodira, e também o maior quelônio de água doce da América do Sul (VOGT, 2008), podendo medir de 75 a 107 cm de comprimento, sendo em média 91 cm, por 50 a 75 cm de largura, com média de 62 cm, pesando em torno de 60 kg (ANDRADE, 2007). Por ser um pleurodira, retraem o pescoço curvando-o horizontalmente (NASCIMENTO e col., 2012) (Fig. 11).

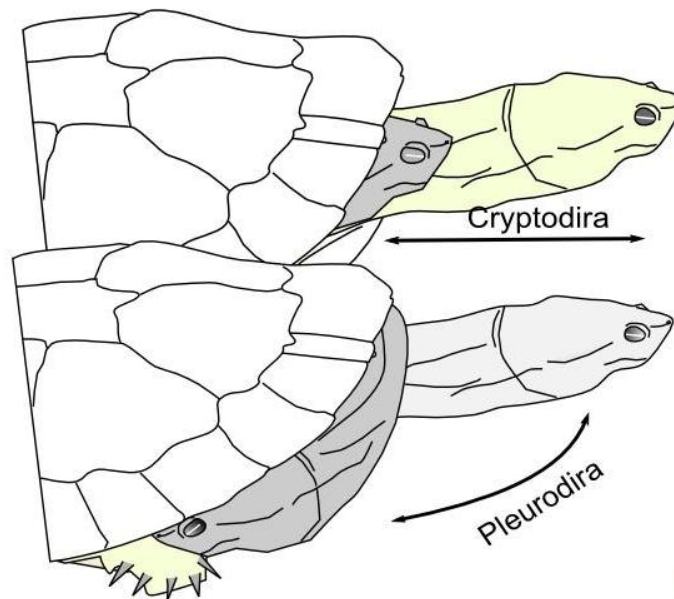


Fig. 11: Ilustração do movimento da retração do pescoço de testudinos.
Fonte: http://www.testudines.org/mmedia/Articles/biology/anatomy/diagrams/cryptodira_vs_pleurodira_v_niclos_www_testudines_org_001_002_ful.jpg

A *P. expansa* também é conhecida popularmente como tartaruga da Amazônia ou tartaruga-gigante (LUZ e col., 2003). Esse quelônio tem ampla distribuição nos rios Orinoco, Essequibo (IVERSON, 1992) e também nas drenagens do rio Amazonas na Colômbia, Venezuela, Guiana, Noroeste do Peru, Leste do Equador, Norte da Bolívia e Norte do Brasil (Fig. 12) (VOGT, 2008).

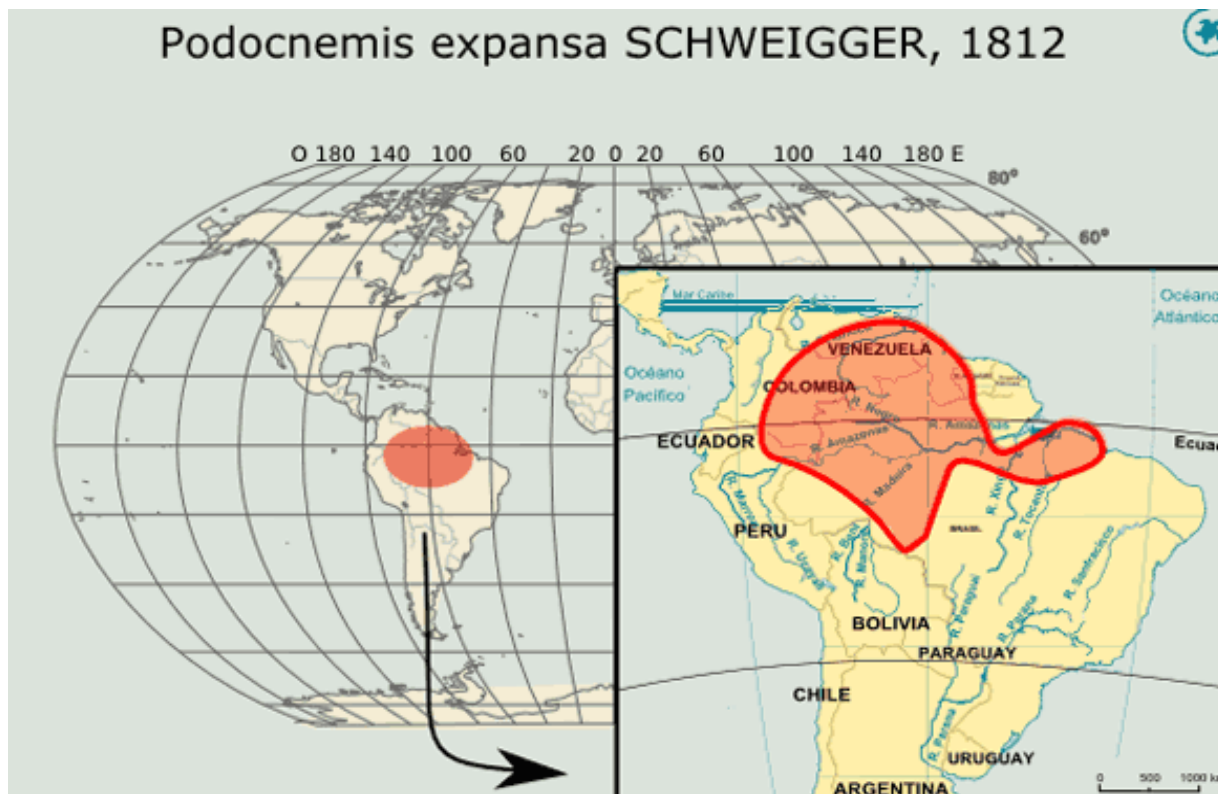


Fig. 12: Mapa de distribuição geográfica de *P. expansa*. Fonte: <http://www.testudines.org/en/medias/media/749>

Nos indivíduos jovens não há dimorfismo sexual externo. Já nos adultos podemos identificar que, nos machos, a cauda mais espessa e comprida, a cloaca está localizada mais próxima da extremidade, o tamanho corporal é menor quando comparado ao da fêmea de mesma idade e sua fenda da placa anal apresenta-se em formato de "U". As fêmeas apresentam a cauda mais curta e menos espessa, enquanto a cloaca se localiza intermediariamente entre a base e a extremidade da cauda e sua fenda da placa anal tem formato de V (ANDRADE, 2007).

Apresentam tanto o membro anterior quanto o posterior com 5 dedos completamente palmados, com unhas, 5 no membro anterior e no posterior um 5º dedo é inerte (NASCIMENTO e col., 2012).

A espécie na natureza é herbívora, se alimenta de frutas, sementes, folhas e demais partes vegetais (VOGT, 2008). No entanto, em ambiente confinado aceita carnes e, principalmente ração preparada com proteína animal e vegetal (NASCIMENTO, 2012).

Em relação ao seu habitat, essa espécie pode ser encontrada em rios e lagos. Durante o período de cheias indivíduos de todas as faixas etárias adentram os lagos de meandro (lagos originados da curva acentuada de um rio) e as florestas alagadas para se alimentarem de frutas

e sementes. Durante a estação da seca, adultos adentram aos rios, enquanto juvenis e sub-adultos frequentemente permanecem em lagos e grandes poças formados por águas recuadas. Assim que o nível da água cai, as fêmeas são estimuladas a migrarem para tributários acima do Amazonas e rios maiores em busca das mais altas praias para nidificarem (VOGT, 2008).

A *P. expansa* inicia a sua fase de reprodução entre cinco e sete anos de idade (ANDRADE, 2007). Um estudo realizado no Baixo Rio Branco no Estado de Roraima mostrou que o período de desova, nessa região, ocorre de novembro a dezembro, e algumas vezes pode chegar até meados de janeiro (NASCIMENTO, 2002). No final de outubro, a fêmea começa a se preparar, se expondo ao sol, pois esse comportamento permite a formação mais rápida de ovos (VOGT, 2008). Após a escolha do local, é feita uma escavação da cova que varia de 50 e 60 cm de profundidade. Neste local ocorrerá a ovoposição, processo esse que pode durar de 1,5 a 4 horas, aproximadamente, sendo feito geralmente à noite e, ocasionalmente, à tarde ou de manhã (ANDRADE, 2007). O período de incubação dura em torno de 45 a 50 dias, sendo que a fêmea deposita em média 120 ovos de formato alongado (NASCIMENTO, 2002). Esses ovos podem mostrar um padrão fêmea-macho-fêmea ou a determinação do sexo pode ocorrer sob influência da temperatura de incubação, onde o período termossensível geralmente ocorre no último terço do período de incubação, sendo que praticamente todas as fêmeas nascem em temperaturas superiores a 34,5°C (BONACH e col., 2011).

As tribos indígenas foram os primeiros povos a explorarem a *P. expansa*, em seguida foram os europeus. As tribos indígenas exploraram as populações de tartarugas por milênios, sem efeito negativo aparente sobre essas espécies, isto por que os índios não possuíam tecnologia e caçavam somente o que poderiam consumir. Dessa forma, podemos compreender quanto que as populações de tartarugas foram exploradas de forma sustentável; isso não ocorria de forma planejada, mas sim porque a população humana não era grande o suficiente para causar impactos significativos que resultassem nas extinções locais das espécies. Mas essa realidade mudou com o início da colonização europeia, já que a comercialização de tartarugas e de seus ovos se intensificou. As formas de comércio mercantil europeu resultaram em um drástico declínio das populações naturais, sendo que hoje muitas espécies de tartarugas estão quase em extinção local (SOUZA e CASTELLÓN, 2012).

Esse quelônio e seus ovos não eram explorados apenas para alimentação, a gordura e ovos foram manufaturados em óleo para ser queimado na iluminação pública de Manaus

(VOGT, 2008). Sua carapaça era utilizada como utensílio ou as misturavam ao barro com a finalidade de fabricação de potes (NASCIMENTO e col., 2012).

Devido a exploração predatória de tantos anos, em 1975 a *P. expansa* estava incluída na Lista Oficial da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção e no Anexo II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção. Para evitar a extinção da espécie, em 1979 foi criado o projeto Proteção e Manejo de Quelônios da Amazônia, gerenciado pelo IBDF (Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal), que era o órgão federal de proteção ambiental na época. Este projeto protegia não só a *P. expansa*, mas também a *P. unifilis*, conhecida como tracaçá (NASCIMENTO e col., 2012).

Essa exploração ocorre até os dias atuais; inclusive o comércio ilegal de ovos de tartaruga causa muito mais danos para as espécies, uma vez que impede o surgimento de novas gerações de quelônios reduzindo suas populações que já são naturalmente submetidas a intensa predação natural especialmente na fase juvenil, nos rios que eles habitam (SOUZA e CASTELLÓN, 2012), visto que esses ovos são predados por aves, mamíferos de pequeno porte, como o *Nasua nasua* (coati), entre outros (JÚNIOR e col., 2009).

Um dos principais motivos para ainda ocorrer essa exploração seria o crescimento da população local ao longo dos rios, conhecidas como populações ribeirinhas. Como são muitas vezes forçadas a viver em tais locais devido a pouca oportunidade no mercado de trabalho, essas pessoas procuram atividades extrativistas para sobreviverem e com isso alimentam um mercado ilegal e lucrativo de tartarugas, o qual cresce a cada dia de acordo com o aumento populacional da região (SOUZA e CASTELLÓN, 2012). Assim, a caça, que antes era apenas para consumo próprio, agora é dividida entre a família e o comércio nas cidades (LUZ e col., 2003).

Uma estratégia para coibir a caça predatória foi a criação de quelônios em viveiros artificiais. Os pontos principais deste processo foram dados pelas Portarias do IBAMA 142/92 e 070/96, que normatizaram a produção de quelônios em criadouros licenciados por este órgão. A partir desse momento, surgiram os projetos para produção comercial, principalmente de *P. expansa* e *P. unifilis* (NASCIMENTO e col., 2012). Com isso, a exploração zootécnica de quelônios com fins comerciais tem despertado o interesse de produtores para novas formas de produção. Por não ser somente uma atividade nova, a criação comercial contribui na diminuição da pressão sobre os animais no ambiente natural, como também oferecer

alternativas econômicas para utilização sustentada e racional dos recursos da fauna (LUZ e col., 2003).

Apesar de a maioria das espécies de tartarugas serem protegidas, atualmente essas leis não são rigidamente seguidas e as pequenas cidades e vilas do interior da Amazônia têm um mercado ilegal de tartarugas. As tartarugas da Amazônia ainda estão entre os animais mais populares para consumo da região, uma vez que elas são fonte de proteína tradicional para a população local, bem como pela sua elevada posição nas festividades regionais e comemorações familiares (SOUZA e CASTELLÓN, 2012).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a estrutura morfológica da traqueia e do pulmão da espécie *Podocnemis expansa*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Descrever através da análise estereoscópica a traqueia e pulmão da *P. expansa*.
- ✓ Analisar as glicosaminoglicanas ácidos sulfatados e carboxilados através do método de alcian blue PH 2,5 na traqueia e pulmão.
- ✓ Identificar através da técnica histoquímica do tricromico de gomori as fibras colagenosas e tecido muscular.
- ✓ Verificar a existência de células enteroendócrinas secretoras de serotonina (5HT) na traqueia e pulmão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Captura e transporte

Para este estudo foram utilizados cinco exemplares de tartarugas machos adultos da espécie *P. expansa*, doados pela Fazenda Comercial Pró-fauna localizada em Miracatu no Estado de São Paulo.

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética, sob a responsabilidade do professor Marcelo Abidu Figueiredo do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia, processo 23083.006101/2011-86. Desta forma, este trabalho atende aos princípios básicos para a pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais em experimentação.

4.2 - Procedimento para o estudo macroscópico

Os órgãos foram observados, obtendo-se imagens através de uma câmera fotográfica digital comum da marca Olympus, modelo F-12 com resolução de 5 Mega pixels.

4.3 - Procedimento para a estereomicroscopia

Para esse estudo, um dos pulmões foi retirado e analisado em um microscópio estereoscópico (Stemi SV 11 Zeiss) para a observação da superfície macroscópica do pulmão, tendo sido as imagens obtidas através do sistema de captura Axion Vision 2.05.

4.4 - Procedimento para estudo em microscopia de luz de campo claro (ML)

Após a dissecação dos animais e a retirada da traqueia e dos pulmões, esses foram clivados em fragmentos de 5mm e imediatamente fixados por imersão em formol neutro tamponado à 10% e ou líquido de Bouin (KIERMAN, 1990). Em seguida, o material foi lavado várias vezes em álcool 70% e processado seguindo-se a técnica histológica padronizada no laboratório para processamento para obtenção de material incluído em parafina. Essa etapa consistiu na desidratação, utilizando-se álcool etílico em concentrações crescentes (álcool etílico à 70%, 80%, 90% e 100% - um banho de 20 minutos em cada),

clarificação em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Posteriormente, cortes de 5 µm de espessura foram confeccionados com o auxílio de um micrótomo modelo Spencer 45, sendo estes coletados em lâminas e levados a estufa à 37°C para secagem (Fig. 13). Os cortes foram submetidos à técnicas de coloração com a finalidade de caracterizar a morfologia geral da traqueia e do pulmão.

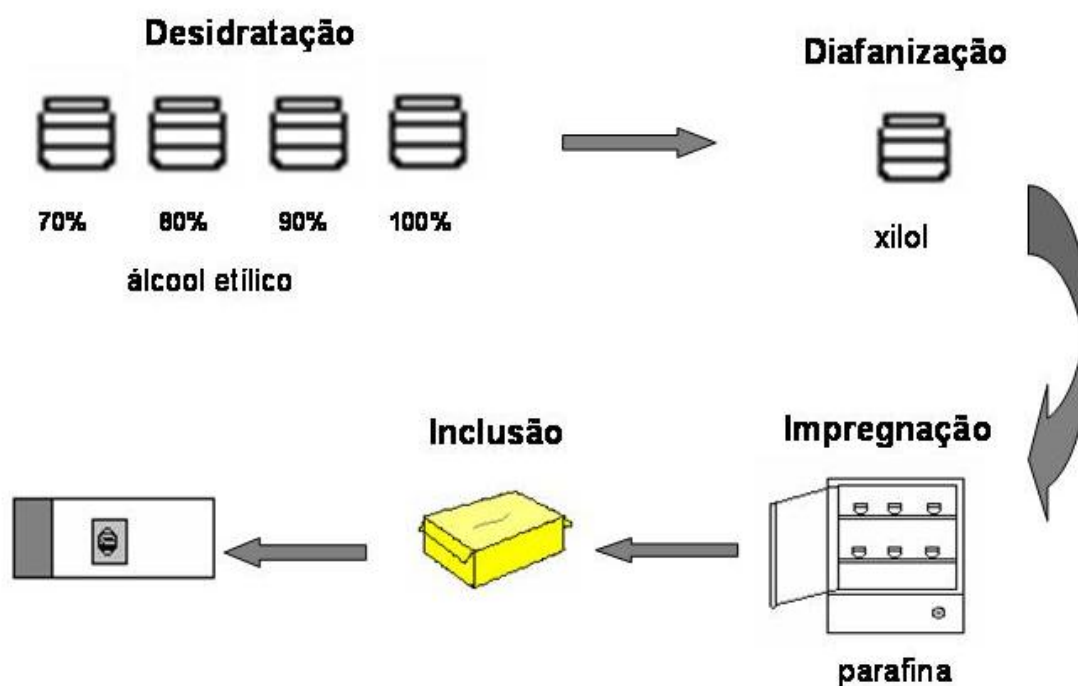


Fig. 13: Etapas da técnica histológica (desidratação até a inclusão em parafina)
Esquema: Vanessa Gonçalves, 2007

4.4.1 – Técnicas histoquímicas para observação da morfologia do órgão

4.4.1.1 – Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE) (LILLIE e FULLMER, 1976)

Os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados e lavados em água destilada. Procedeu-se a coloração pela Hematoxilina de Harris por 10 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram corados por 10 segundos pela Eosina. Após rápida lavagem em água destilada, os cortes foram desidratados, clarificados em três banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se entelan (Entellan® new, Merck).

Neste método os núcleos coram-se em azul, e o citoplasma em rosa.

4.4.1.2 – Técnica de coloração pelo Tricrômico de Gomori (LILLIE e FULLMER, 1976)

Os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados e lavados em água destilada. Procedeu-se a coloração pela Hematoxilina de Harris por 10 segundos, que foi seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram corados por 15 minutos pela mistura Tricrômica de Gomori e diferenciados em ácido acético glacial a 0,2%. Após rápida lavagem em água destilada, os cortes foram desidratados, clarificados em três banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se entelan (Entellan® new, Merck).

Os núcleos coram-se em azul, as fibras colagenosas em verde e o tecido muscular em vermelho.

4.4.1.3 – Técnica de coloração pelo Alcian Blue (AB) pH 2,5 (KIERNAN, 1990)

Os cortes, após serem desparafinizados, hidratados e lavados em água destilada, foram corados pela solução aquosa de AB em pH 2,5 por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em solução de ácido acético (CH₃COOH) a 3% e, após lavagem em água destilada, foram submetidos à coloração com “nuclear fast red” por 1 minuto. Depois de lavados em água destilada, os cortes foram desidratados, clarificados e montados com lamínulas, usando-se entelan como meio de montagem.

Nesta técnica de coloração, os polímeros de polissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados com características de glicosaminoglicanos são evidenciados em azul.

4.4.2 – Técnica imuno-histoquímica para detecção de células de serotonina

Para a análise imuno-histoquímica foram utilizadas lâminas previamente tratadas com o selante poli-L-lisina, com o objetivo de se evitar o desprendimento do corte durante a técnica. Em seguida, os cortes sofreram dois banhos em xilol, durante 15 minutos cada, para remoção da parafina. Posteriormente, os cortes foram hidratados através de concentrações decrescente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) e com um banho final em água destilada. Para a realização da recuperação antigênica, os cortes foram imersos em solução tripsina a 0,1% em tampão TRIS durante 20 minutos e, após lavagem em salina em tampão fosfato (PBS – Phosphate Buffered Saline), a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando-se H₂O₂ 3% em PBS. Após, foi realizado outro banho em PBS e os cortes foram colocados em albumina sérica bovina (BSA – Bovine Serum Albumin) durante 1 hora para bloquear as reações inespecíficas, sendo lavado novamente em PBS. Após essa etapa, os cortes foram incubados com anticorpo primário (Mouse monoclonal anti-condroitinsulfato. Abcam,

código: ab11570. Diluição: 1:200) “overnight”, seguido de lavagem com PBS. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Multilink suíno. Dako, código: E0453. Diluição 1:100).

Para mostrar o resultado da reação, os cortes foram incubados com diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos lavados com água corrente seguida de lavagem em tampão PBS. Depois de lavados em água destilada, os cortes desidratados, clarificados e montados com lamínulas, usando-se entellan® como meio de montagem.

5. RESULTADOS

5.1 – Macroscopia

Ao olho desarmado, o aparelho respiratório é formado por uma porção condutora de ar, ou seja, a traqueia e os brônquios principais extrapulmonares, de coloração esbranquiçada, com formato cilíndrico, sendo facilmente individualizados, que penetram no pulmão.

A traqueia é longa, medindo cerca de 8 cm, acompanhando o comprimento do pescoço do animal e se bifurca em dois longos brônquios primários extrapulmonares, um direito e um esquerdo, que penetram no hilo dos respectivos pulmões (Fig. 14). A traqueia e os brônquios primários apresentam uma nítida segmentação devido à organização de uma série de anéis cartilagosos que sustentam essas estruturas (Fig. 14).

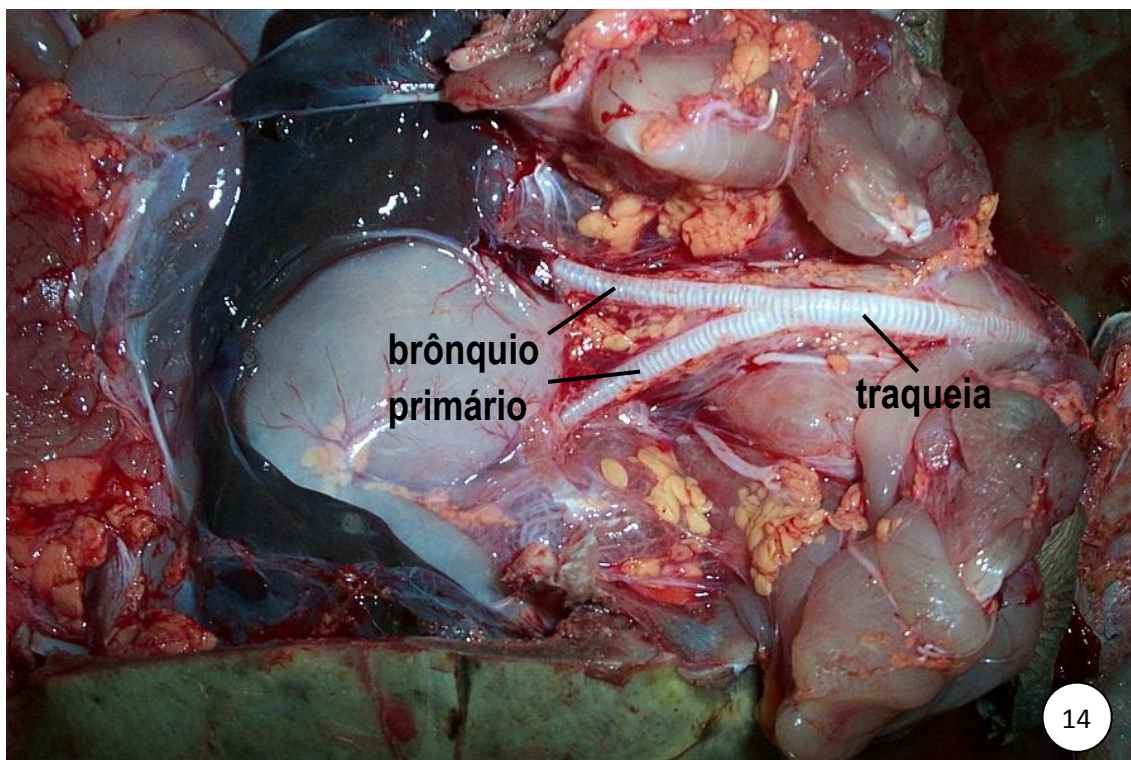


Fig. 14: Fotografia de *P. expansa*. Notar a traqueia se bifurcando, dando origem aos brônquios primários que penetram nos pulmões.

O pulmão, em número de dois, é grande e esponjoso. Esse órgão se dispõe na forma de pequenos sacos aéreos e não possui lobulação, apresentando uma coloração rósea devido a grande vascularização.

5.2- Microscópio estereoscópico

A visualização do pulmão revelou que o brônquio primário penetra no pulmão e se ramifica pelo interior deste órgão, formando vários outros segmentos menores que terminam diretamente nas câmaras alveolares (Fig. 15).

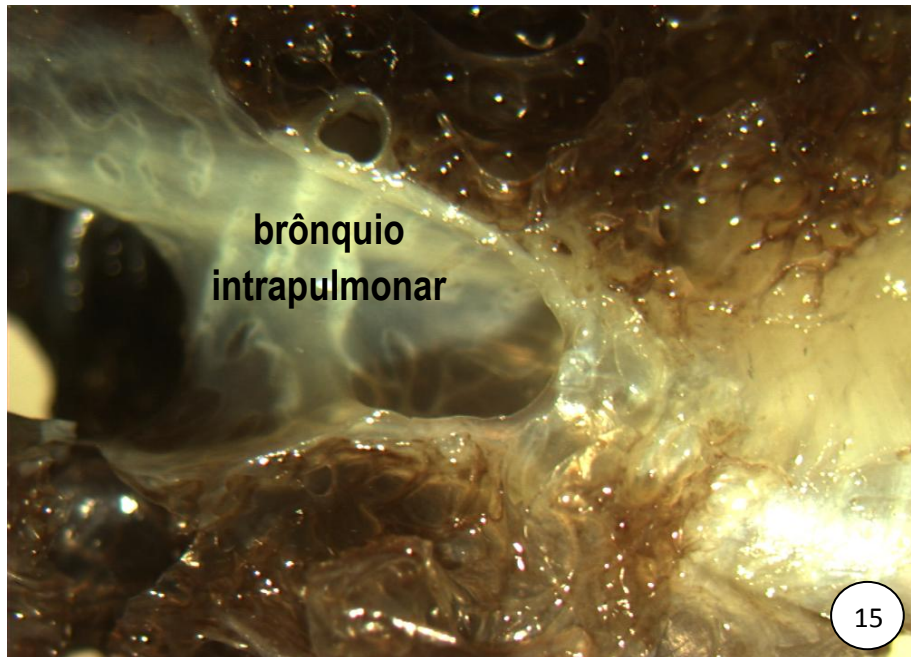


Fig. 15: Fotografia do pulmão de *P. expansa*. Dentro do pulmão, o brônquio se ramifica e, a medida que penetra no parênquima do órgão, suas dimensões diminuem e sua parede se torna mais simplificada.

Conforme o brônquio principal penetra no pulmão, nota-se redução dos anéis cartilagosos. Os septos esbranquiçados apresentam-se de diferentes dimensões, com alturas e espessuras variáveis, constituindo uma rede altamente anastomosada que delimita as pequenas câmaras alveolares e subdivide os pulmões internamente (Fig. 16).

O pulmão de *P. expansa* é subdividido em compartimento que se abrem em um brônquio intrapulmonar, sendo que o parênquima pulmonar assemelha-se a favos de mel (faviform-ing) (Fig. 17).

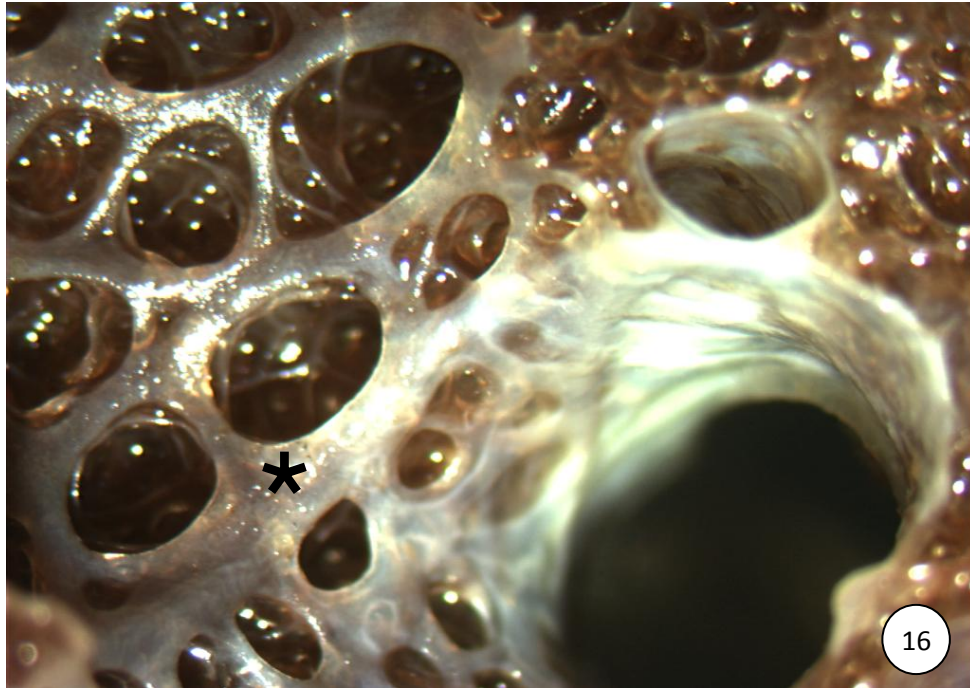


Fig. 16: Notar o aspecto esponjoso do parênquima pulmonar. Os septos se apresentam de coloração esbranquiçada (*).

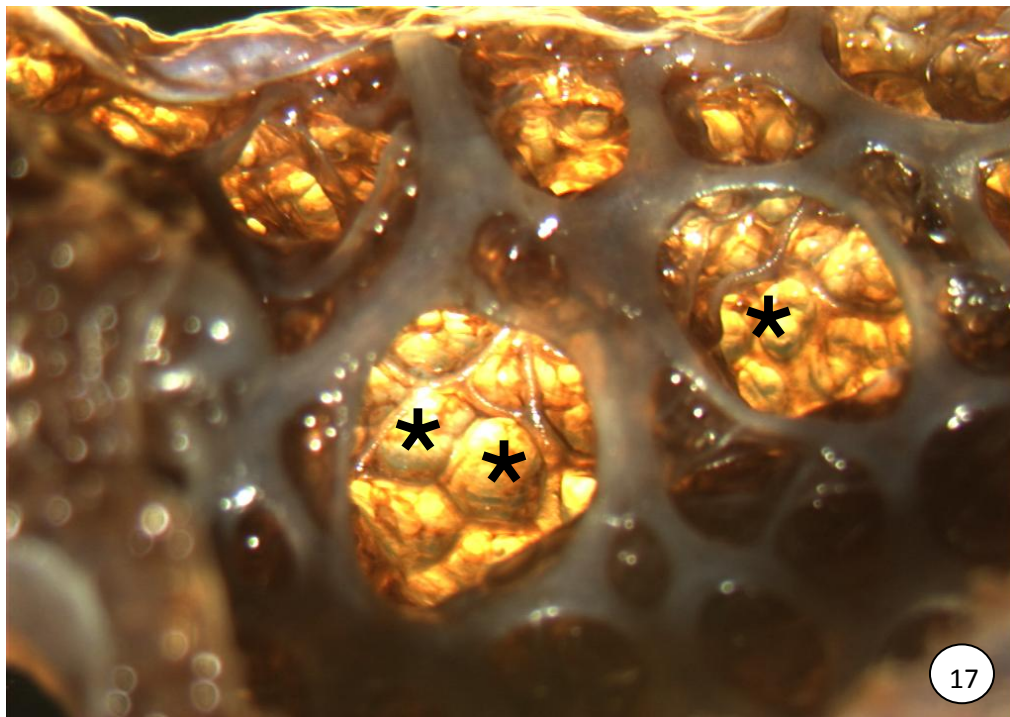


Fig. 17: Detalhe das câmaras pulmonares com pequenos alvéolos (*).

5.3 – Microscopia

5.3.1 – Traqueia

A análise ao microscópio de luz revelou que a traqueia de *P. expansa* é formada por uma camada mucosa, submucosa e adventícia. A camada mucosa é revestida por um epitélio respiratório do tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes (Fig. 18). As células cilíndricas ciliadas é a população celular predominante e, na sua maioria, se estende do lúmen até a região da membrana basal. As células basais repousam sobre a lâmina basal, mas não se atinge o lúmen da traqueia. Não foram observadas glândulas intraepiteliais.

As células caliciformes revelaram citoplasma apical claro após a coloração pela HE e Tricrômico de Gomori (fig. 19).

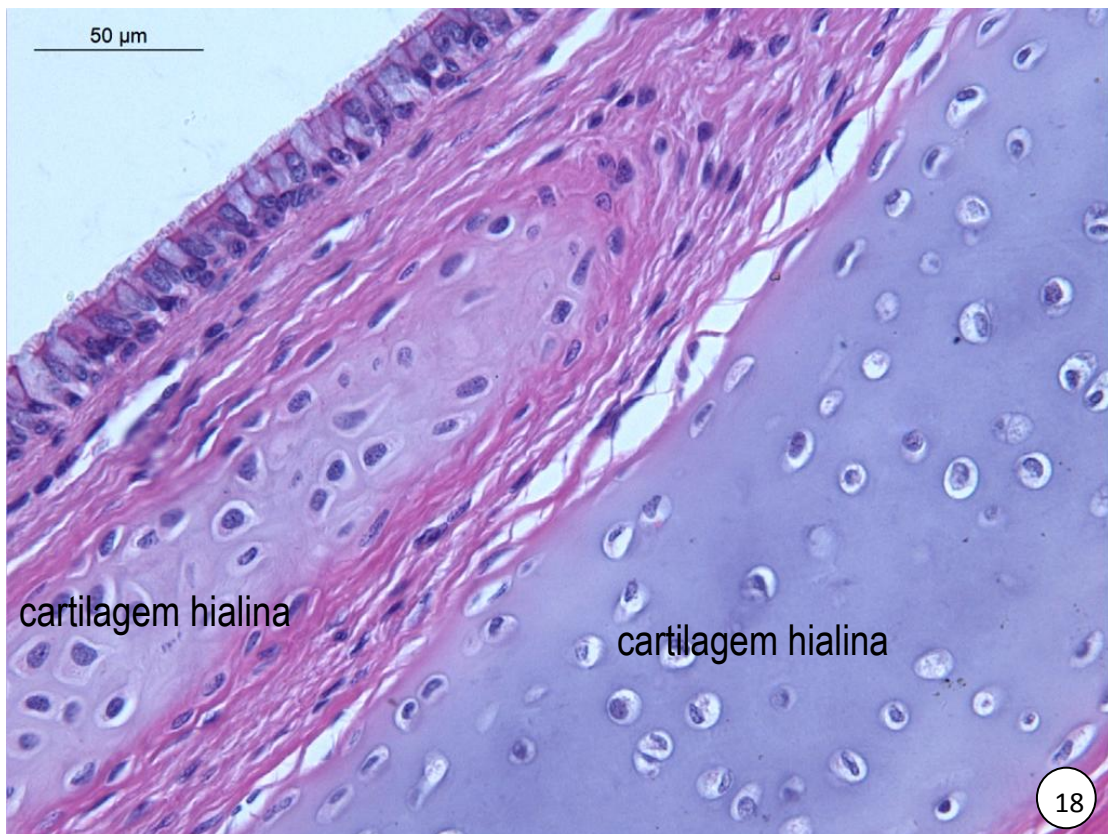


Fig. 18: Fotomicrografia da traqueia de *P. expansa*. O epitélio respiratório (epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes) reveste lúmen, sendo sustentado por tecido conjuntivo. Note que a cartilagem hialina se estrutura em duas peças que se sobrepõe.

Coloração: HE

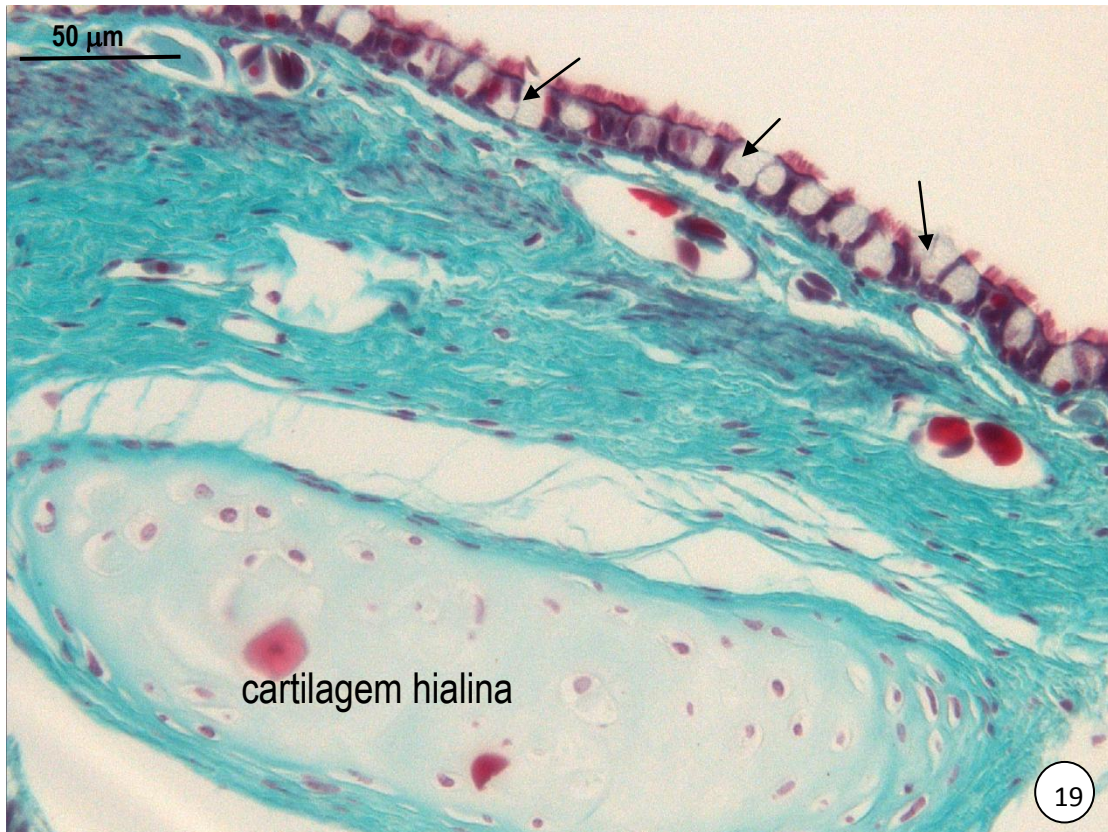


Fig. 19: Fotomicrografia da traqueia de *P. expansa*. Há várias células caliciformes (→) por entre as células ciliadas epiteliais. Notar a peça de cartilagem hialina.
Coloração: Tricrômico de Gomori

No entanto, essas células mostraram reação positiva ao método do AB, indicando a presença de mucossecção ácida (Fig. 20).

Abaixo do epitélio tem-se a lâmina própria, uma pequena camada de tecido conjuntivo frouxo, rica em vasos sanguíneos, mas sem limites nítidos distintos para a camada submucosa. Não foram observadas a presença de glândulas ou ductos excretorios na lâmina própria e camada submucosa.

A traqueia possui anéis descontínuos de peças de cartilagem hialina, envolta pelo tecido conjuntivo denso do pericôndrio. Eventualmente, as peças de cartilagem se sobrepõem (Fig. 18). Na cartilagem os condrócitos estão organizados em grupos isogênicos, ou de forma isolada, estando imersos em uma matriz extracelular alcianofílica (Fig. 20), indicando a presença de polímeros sulfatados e carboxilados com características de glicosaminoglicanos.

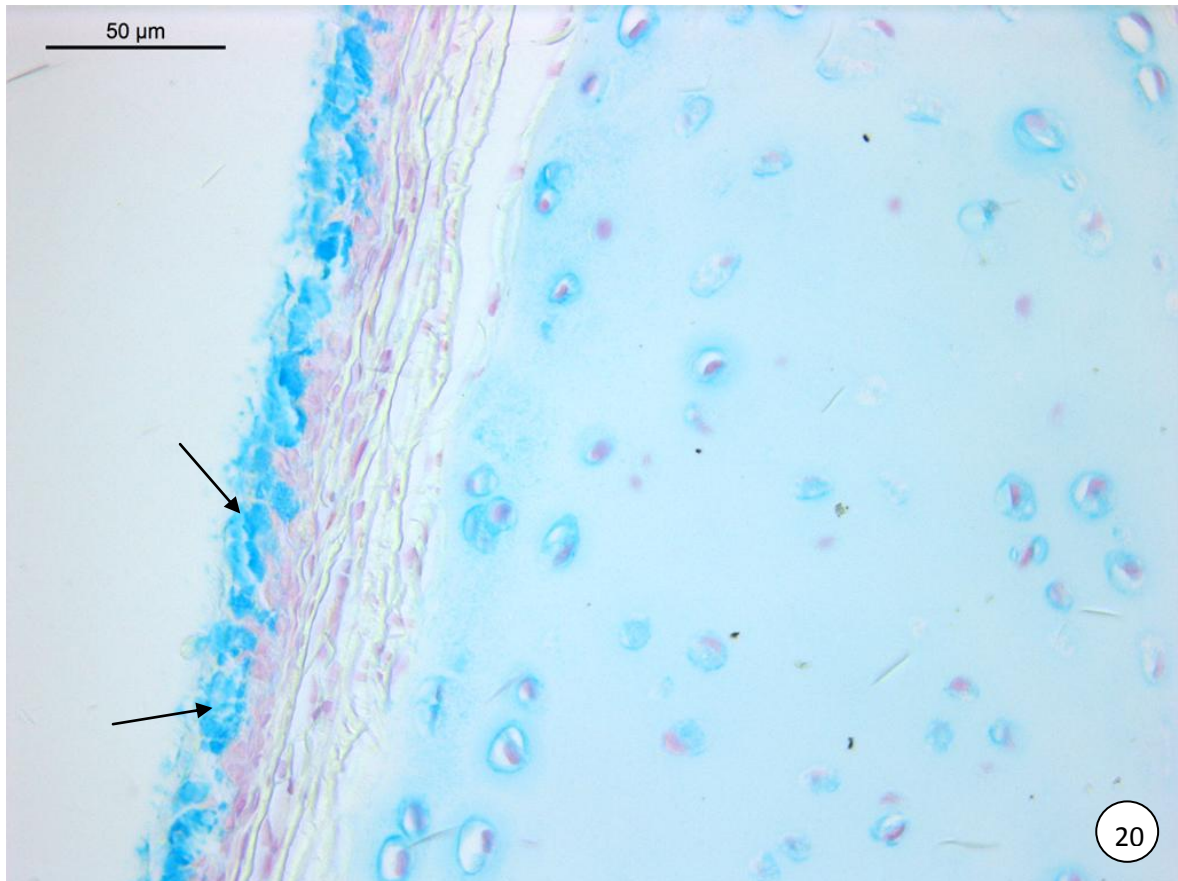


Fig. 20: Fotomicrografia da traqueia de *P. expansa*. Notar que a matriz cartilaginosa é alcianofílica assim como as células caliciformes (→) presentes no epitélio.
Colocação: Método do AB em pH 2,5.

Os grupos isogênicos coronários são circundados por uma matriz territorial mais alcianofílica em comparação com a matriz interterritorial.

Células enteroendócrinas secretoras de serotonina não foram identificadas pela imunohistoquímica.

Uma camada de tecido conjuntivo frouxo externa à peça de cartilagem contém vasos sanguíneos, podendo apresentar células adiposas. Essa camada representa a camada serosa do órgão, por possuir revestimento de células mesoteliais (Fig. 21).



Fig. 21: Visão geral da traqueia de *P. expansa*, mostrando o epitélio respiratório (E) sustentado pelo tecido conjuntivo, formando a camada mucosa. Abaixo tem-se a peça de cartilagem hialina (C) e a camada adventícia (A).

Coloração: HE;

5.3.2 – Pulmões

Ao penetrar no pulmão, o brônquio permeia o parênquima pulmonar que é formado por alvéolos de diferentes dimensões, constituindo um parênquima que se assemelha a favos de mel (faviform-ing), sendo formado por três formas de trabéculas: primárias, secundária e terciária.

Os brônquio intrapulmonar é revestido por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células mucossecretoras, sustentado por um tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos. Abaixo da lâmina própria nota-se tecido muscular liso e a presença de fragmentos de cartilagem hialina (Fig. 22).

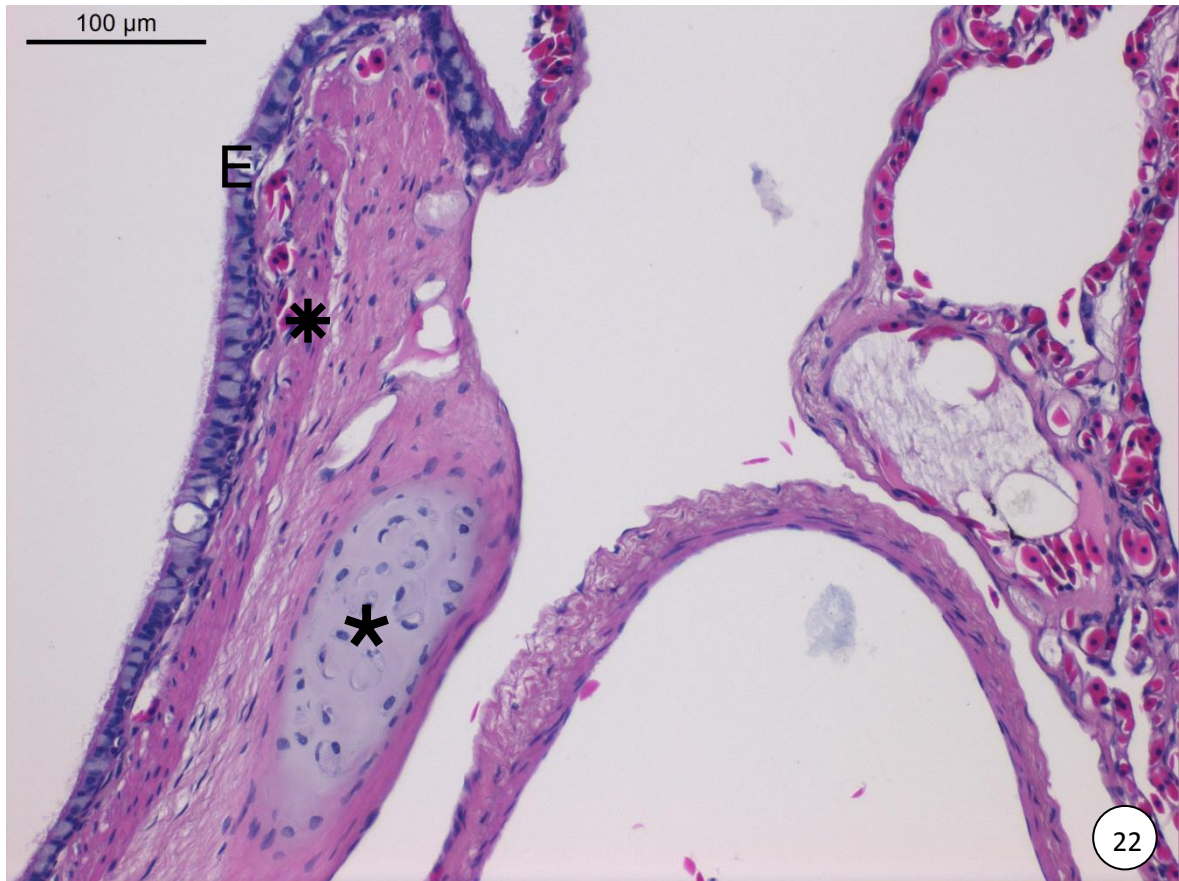


Fig. 22: Fotomicrografia do pulmão de *P. expansa*. Notar um brônquio intrapulmonar, revestido por epitélio respiratório (E). No tecido conjuntivo, nota-se peças de cartilagem hialina (*).

A medida que o brônquio se ramifica, sua parede torna-se mais simples, desaparecendo a peça de cartilagem e, concomitantemente, o epitélio de revestimento torna-se mais baixo e suas células passam de cilíndricas a cúbica, a sustentação se faz a custas de tecido muscular do tipo liso, dando origem a trabécula primária (Fig. 23).

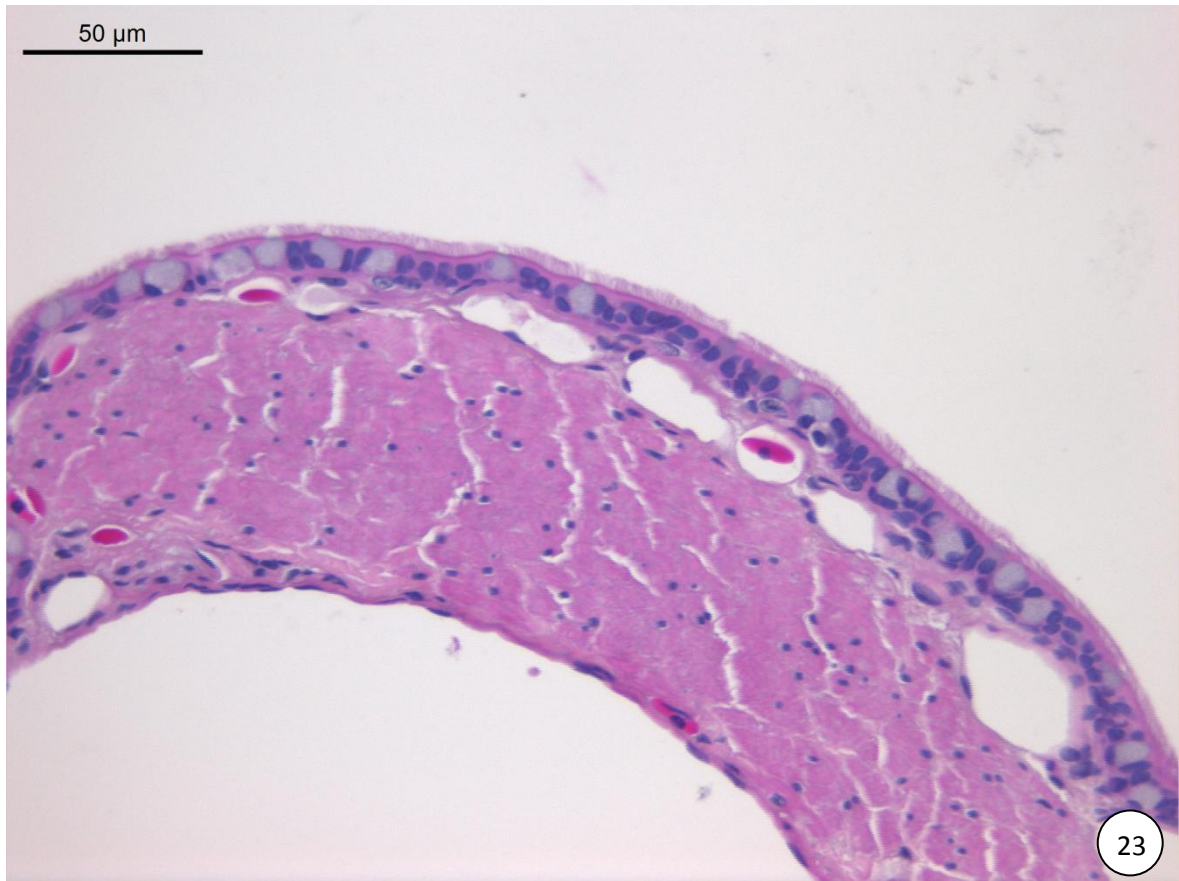


Fig. 23. Fotomicrografia de *P. expansa*. Notar a trabécula primária, onde a sustentação é feita por tecido muscular do tipo liso.

Em contraposição, da face interna da parede pulmonar partem projeções, sustentadas por tecido muscular liso imerso numa matriz conjuntiva. Essas projeções formam septos de diferentes tamanhos que se projetam para a luz do pulmão. Alguns destes septos se anastomosam entre si, constituindo pequenas câmaras (Fig. 24).

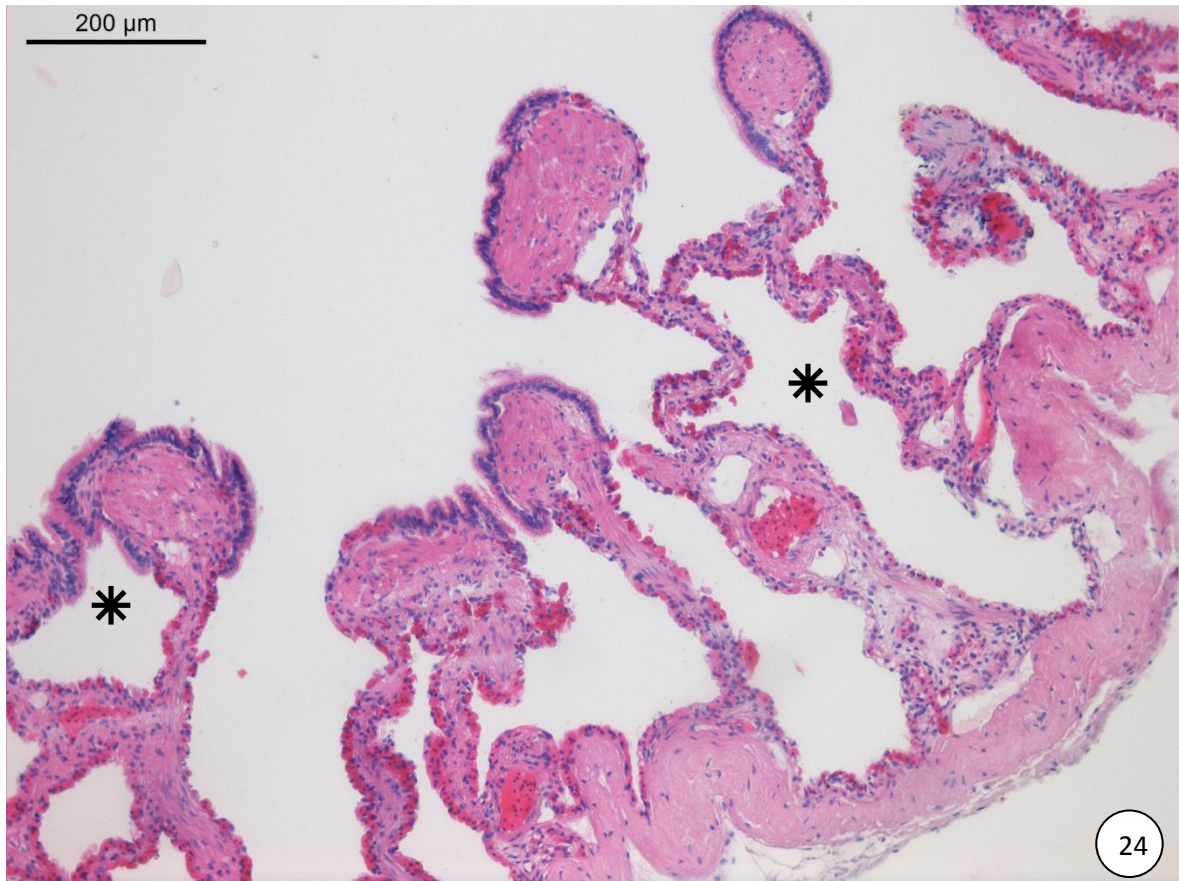


Fig. 24: Fotomicrografia do pulmão de *P. expansa*. Notar septos que se projetam para a luz do pulmão. Esses septos se anastomosam formando compartimentos menores (*).
Coloração: HE.

Na extremidade desses septos, que são sustentados por feixes de células musculares lisas, nota-se o revestimento de um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células mucossecretoras (Fig. 25).

A superfície luminal das trabéculas secundárias são revestidas por epitélio simples, em íntima associação com vasos sanguíneos. A mudança do epitélio cilíndrico simples, que reveste a extremidade dos septos, para o epitélio pavimentoso simples, que reveste a lateral do septo é abrupta (Fig. 26).

Nas superfícies luminal das trabéculas terciárias nota-se o epitélio pavimentoso simples, cujas células encontram-se em íntima associação com os capilares sanguíneos (Fig. 27).



Fig. 25: Notar células musculares lisas (*) sustentados as extremidades dos septos, os quais são revestidos por células ciliadas, agora organizadas em uma única camada, entremeadas por células caliciformes (→). Coloração: HE.



Fig. 26: Fotomicrografia do pulmão de *P. expansa*. Note na trabécula secundária a mudança abrupta do epitélio cilíndrico ciliado (E) para o epitélio simples que reveste a lateral dos septos. Notar a presença de eritrócitos que transitam nos vasos sanguíneos em íntima associação com a célula epitelial pavimentosa de revestimento (→). Coloração: HE.

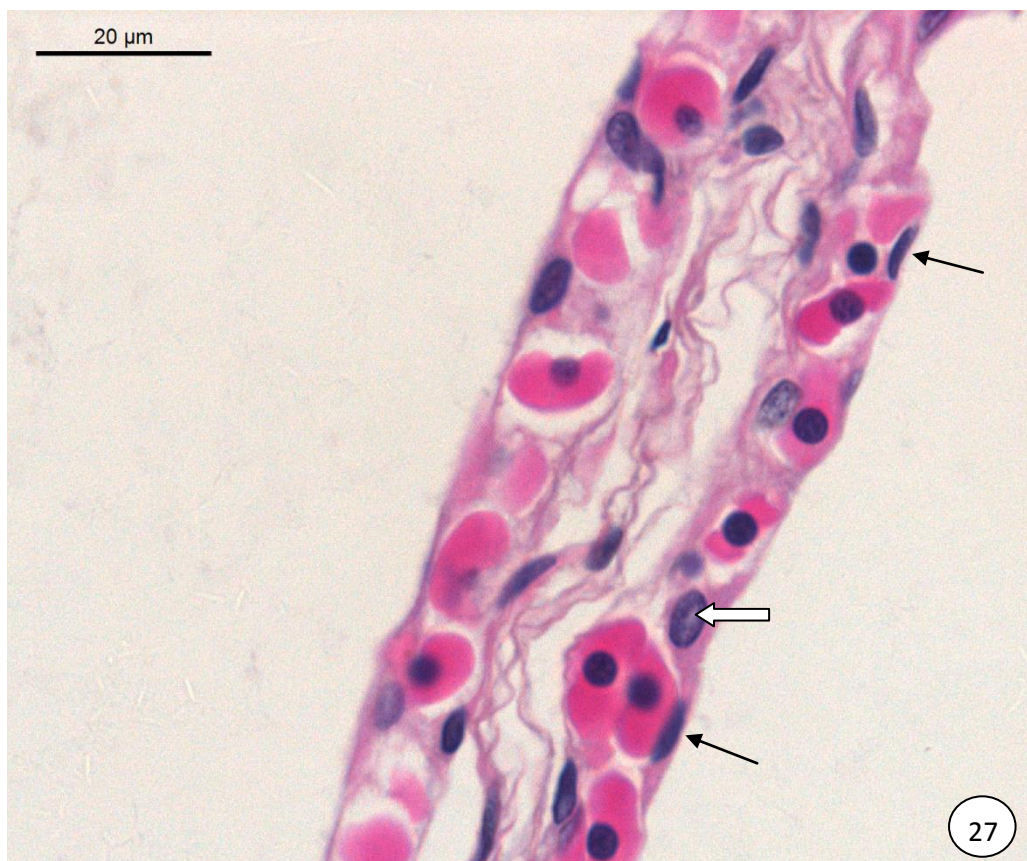


Fig. 27: Fotomicrografia de uma trabécula terciária. Notar os pneumócitos tipo I (→) e tipo II (⇔) revestindo a superfície da trabécula. O tecido conjuntivo no interior é extremamente escasso. Notar eritrócitos no interior de capilares. Coloração: HE. →

Provavelmente, nessa região ocorre a troca gasosa. Visto que foram observados revestindo esta trabécula dois tipos celulares: os pneumócitos tipo I, responsáveis pelas trocas gasosas, e os pneumócitos tipo II, células cubóides relacionadas a produção de surfactantes (Fig. 27).

6. DISCUSSÃO

Assim como Wyneken (2001) descreve em tartarugas marinhas a traqueia de *P. expansa* revelou-se a estrutura macroscópica um órgão longo que acompanha o comprimento do pescoço do animal, possuindo formato cilíndrico e se bifurcando em dois longos brônquios que penetram em cada hilo dos respectivos pulmões.

Histologicamente a traqueia tem sido estudada em várias espécies de répteis, tais como, em lagarto comum (*Lacerta agilis*), na tartaruga *Testudo horsfieldii* (SHADKHAJ, 2010). Em *P. expansa* esta é revestida por um epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes que repousam sobre a membrana basal, constituindo a mucosa traqueal. Shadkhaj (2010) descreveram o epitélio traqueal de *Testudo horsfieldii* consistindo de células basais, ciliadas e células mucossecretoras. Estes relatam a presença de células intermediárias que originam as células basais granulares e caliciformes. Assim como em outros vertebrados, o epitélio respiratório nesse quelônio participa na retenção de partículas inaladas e no aquecimento assim como na umidificação do ar. A retenção de partículas é possível pela presença do muco secretado pelas células caliciformes e dos cílios que orientam seus batimentos em direção à faringe, impedindo a entrada de partículas estranhas no pulmão (KIERSZENBAUM, 2008).

Em *P. expansa* não foram observadas glândulas intraepiteliais na traqueia. Entretanto, a presença destas glândulas na traqueia de répteis foi relatada no jacaré do papo amarelo (*Caiman latirostris*) (SANTOS e col., 2011).

Pelo método imuno-histoquímico não foram identificadas células enteroendócrinas secretoras de serotonina na traqueia de *P. expansa*. Estas células do sistema neuroendócrino difuso já foram descritas na traqueia do crocodiliano *C. latirostris*, (SANTOS e col., 2011) e nas tartarugas *Testudo graeca* e *Pseudemys scripta elegans* (PASTOR e col., 1987).

A estrutura da traqueia de *P. expansa* difere dos outros grupos de vertebrados por não possuir glândulas mucosas ou seromucosas secretoras de muco na camada submucosa, que nos demais vertebrados colaboram para a manutenção da mucosa respiratória umedecida (KIERSZENBAUM, 2008). Assim, nesse quelônio a secreção mucosa é elaborada apenas pelas células caliciformes do epitélio. Esse fato sugere que suscetibilidade desses animais às doenças no sistema respiratório pode estar relacionada a falta dessas glândulas, visto que o muco além de contribuir para a proteção de superfícies contra a desidratação, também participa na defesa química e de microrganismos como bactérias (KIERSZENBAUM, 2008).

Lafortune e col. (2005) relata que as doenças respiratórias tem sido identificadas em pelo menos 18% dos crocodilianos criados em cativeiros. Dentre os principais agentes bacterianos foram descritos *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma alligatoris*, *Pasteurella multocida*, *Providencia rettgeri*. Já entre os agentes infecciosos micóticos estão: *Aspergillus austrus*, *A. fumigatus*, *Beauveria bassiana*, *Candida albicans*, *Cephalosporidium spp.*, *Fusarium monoliforme*, *F. solani*, *Metharhizium spp.*, *Mucor spp.*, *Paecilomyces farinosus*, and *P. lilacinus*, estes estão associados com temperatura abaixo do ideal do local de criação.

Assim como em crocodilianos, os quelônios também são frequentemente acometidos por rinites, pneumonias e broncopneumonias infecciosas, que podem levar o animal ao óbito (MALTA e NASCIMENTO, 2005). A pneumonia é uma afecção comum em répteis de cativeiro e um grande número de agentes pode estar relacionado com essa patologia, sendo que na maior parte dos casos de pneumonia, como principal fator está relacionado com os problemas de manejo, higiene e nutrição . Dentre os principais agentes bacterianos relatados tem-se *Escherichia coli*, *klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pasteurella testudinis*, podendo também se encontrar *Bacterioides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Clostridium*, e algumas bactérias atípicas como mycoplasma e chlamydia (MADER, 1996). Entre os principais sinais clínicos de pneumonia em répteis incluem coriza nasal, gorgolejamento, borbulhamento, respiração com boca aberta e anorexia (BIRCHARD e SHERDING, 2003).

Nos répteis a adventícia da traqueia é composta por anéis cartilagosos que dão suporte a traqueia, assim como previne o colapso de seu lúmen (WYNEKEN, 2001), porém, diferenças morfológicas podem ser observadas entre as espécies. Em *Testudo horsfieldii*, Shadkhast e col. (2010) descreveram anéis cartilagosos completos sobrepostos, entretanto em *P. expansa*, esses anéis apresentam-se de forma descontínuas.

Os pulmões são órgãos que efetuam as trocas de oxigênio e gás carbônico entre o organismo e o ambiente. Nos vertebrados outros órgãos executam essa função tais como: as brânquias e as bexigas natatórias em peixes, e a pele nos anfíbios (MORANDINI, 1969). Nos répteis o pulmão é o principal órgão para a troca gasosa, sabendo-se que algumas espécies de tartarugas também utilizam a pele, a cloaca, e as bexigas vasculares acessórias que evaginam da cloaca para esse propósito (LIEM, 2013).

Wyneken (2001) descreve em seu estudo que os pulmões de quelônios estão dorsalmente ligados à carapaça e a coluna vertebral. Em algumas espécies, como *L. kempii* e

C. caretta, os pulmões estão mais fortemente ligados a coluna vertebral do que em outras espécies. Ventralmente, à esquerda o pulmão está ligado ao estômago através do ligamento gastropulmonar. O pulmão direito está ligado ao lobo direito do fígado pelo ligamento hepatopulmonar. Posteriormente, os pulmões estão anexados ao peritônio que recobre os rins e glândulas suprarrenais e são adjacentes às gônadas. A margem medial de cada pulmão está firmemente ligado através de ligações fibrosas para as dorsolaterais superfícies da coluna vertebral. Sendo assim, conforme Carvalho e Gonçalves (2011) relata os pulmões estão localizados na cavidade pleuroperitoneal e não existe qualquer diafragma que separe o tórax da cavidade abdominal. Este padrão pode ser observado através de análise macroscópica em pulmão de *P. expansa*.

Oliveira (2003) relata que nos quelônios o sistema respiratório apresenta algumas dificuldades funcionais, decorrentes da ausência de diafragma.

Powell e Hopkins (2004) relatam que a evolução do sistema respiratório no reino animal produziu uma incrível variedade de estruturas para satisfazer uma ampla gama de demandas de oxigênio, devido às diferentes formas de vida dos animais. Nos vertebrados incluem pulmões: unicameral, estruturas saculiformes em alguns anfíbios e répteis, bem como estruturas de ramificações complexas como os pulmões alveolares de mamíferos e os parabrônquios nos pulmões de aves. Os animais com maiores taxas metabólicas demandam de mais oxigênio e em virtude disto apresentam pulmões mais complexos.

Conforme Wyneken (2001) e Carvalho e Gonçalves (2011) relatam que a morfologia e função pulmonar variam entre os principais grupos de répteis: tartarugas, cobras, lagartos e crocodilos. Nestes grupos, três diferentes tipos de estruturas pulmonares podem ser identificados: (1) unicameral, (2) de transição (uma única câmara dividida por grandes septos), e (3) multicameral (pulmões com lobos desenvolvidos internamente geralmente não visíveis a partir da superfície externa do pulmão). Hsia e col. (2013) mencionam que a maioria das cobras possuem pulmão unicameral. Wyneken (2001) informa que lagartos apresentam todas as três categorias de estruturas pulmonares. As lagartixas têm pulmões de câmara única, enquanto que em indivíduos da família Helodermatidae (lagartos de contas) têm pulmões multicameral com brônquios ramificados. Iguanas e camaleões têm pulmões de transição ou paucicameral. Crocodilianos têm pulmões multi-câmaras complexos, com alta densidade do parênquima.

Vitt e Caldwell (2014) descreveram que lagartos, crocodilianos e quelônios possuem pulmão multicameral, sendo que Maina (2002) relata em seu estudo em quelônios, que estes apresentam um pulmão paucicameral. Este pulmão possui dois ou três compartimentos

periféricos que se abrem para um local central de ar, mas o brônquio intrapulmonar está ausente.

O pulmão de *P. expansa* possui o parênquima pulmonar semelhante a favos de mel, formado por um único brônquio intrapulmonar e por três formas distintas de trabéculas: primária, secundária e terciária. Este mesmo parênquima foi descrito por Pastor e colaboradores (1989) em *Testudo graeca*.

Em *P. expansa*, a estrutura do brônquio principal revela o epitélio respiratório sustentado pela lâmina própria de tecido conjuntivo e com alguns feixes de músculo liso; as peças de cartilagem se tornam irregulares conforme a interiorização no pulmão. Esses dados também foram descritos por Pastor e colaboradores (1988) para *Testudo graeca*, cujo brônquio é revestido por um epitélio pseudoestratificado com células basais, células mucosas e células ciliadas e os fragmentos de cartilagem hialina estão presentes na lâmina própria bronquiolar. Salomon e Purton (1984), ao analisar *Chelonia mydas*, relataram que a lâmina própria contém muitas células musculares lisas e fibras elásticas. A análise do sistema elástico ainda será objeto de estudo para *P. expansa*, visto que não foi utilizada coloração histoquímica para evidenciação de fibras elásticas.

No segmento pulmonar de mamíferos os brônquios se bifurcam em unidades menores chamadas de bronquíolos, estes segmentos originam os bronquíolos terminais e respiratórios, onde se iniciam as trocas gasosas. Em répteis, Pastor e colaboradores (1988) nomeiam essas estruturas derivadas dos brônquios de trabéculas, sendo estas classificadas em primárias, secundárias e terciárias, podendo ocorrer às trocas gasosas nas trabéculas secundárias e terciárias. Estas estruturas trabeculares são homólogas as estruturas bronquiolares de mamíferos. Entretanto este conceito de trabéculas não é universalmente aceito, visto que, outros autores descrevem a presença de bronquíolos respiratórios em répteis, tais como Solomon e Purton na tartaruga marinha *Chelonia mydas L.*

Em *P. expansa* as trabéculas primárias apresentou-se coberta por um epitélio pseudoestratificado composto por células ciliadas, mucossecretoras e basais, assim como observados em *T. graeca* (PASTOR, 1988). Nessas trabéculas devido a altura das células epiteliais e ausência de pneumócito não são realizados trocas gasosas.

A superfície luminal das trabéculas secundárias apresenta uma mudança epitelial progressiva, onde se observa a mudança abrupta do epitélio pseudoestratificado para o epitélio pavimentoso simples típico de troca gasosa. Essa mesma conformação histológica foi observada nas trabéculas secundárias de *T. graeca* (PASTOR, 1988).

Na trabécula terciária, a superfície encontra-se especializada para promover a difusão de gases entre os ambientes externos e internos, como ocorre nos alvéolos pulmonares dos pulmões de mamíferos, um epitélio formado por pneumócitos do tipo I e II repousam sobre uma fina camada de tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos, porém diferentemente do observado em mamíferos esta trabécula é sustentada por uma musculatura lisa conforme PASTOR e colaboradores (1988) observou nas trabéculas terciárias da tartaruga marinha *T. graeca*.

7. CONCLUSÃO

Através da realização desse estudo morfológico da traqueia e do pulmão da espécie *Podocnemis expansa* foi possível concluir que:

Histologicamente a camada mucosa da traqueia é revestida por um epitélio respiratório característico de um vertebrado, sendo do tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciforme. A adventícia da traqueia e os brônquios apresentam-se uma série de anéis cartilagosos descontínuos.

Foram observadas três ordens de trabéculas. As trabéculas primárias são revestidas por um epitélio pseudoestratificado composto por células ciliadas, mucossecretoras e basais.

As trabéculas secundárias apresentam uma progressiva diminuição das células ciliadas e escassas células mucossecretoras, sendo o epitélio de revestimento variando de cilíndrico a cúbico simples.

As trabéculas terciárias são revestidas por dois tipos celulares, o pneumócito tipo I, responsável pelas trocas gasosas, e os pneumócitos tipo II, relacionados com a produção de surfactantes. E possui uma rede capilar abaixo do epitélio trabecular. Feixes de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo propriamente dito estão presentes no centro das trabéculas.

As análises macro e microscópicas revelaram que o pulmão de *P. expansa* possui a estrutura necessária a permitir a distensão pulmonar, permitindo que o animal permaneça imerso na água por um longo período de tempo, além de ser um órgão importante no equilíbrio hidrodinâmico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMONACID, J. V. R.; CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A.; MAHECHA, J. V. R.; MAST, R. B.; VOGT, R.V.; RHODIN, A. G. J.; VELÁSQUEZ, J. O.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C. G. **Las Tortugas y Los Cocodrilianos de los Países Andinos Del Trópico**. Conservación Internacional Serie Guías Tropicales de Campo. Bogotá, D.C. – Colombia, 537 p., 2007.

ANDRADE, P.C.M. **Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas**. Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas, 2ª ed. ProVárzea/FAPEAM/SDS. Manaus/AM.447p., 2007.

BIRCHARD, S. J. ; SHERDING, R. G. **Manual Saunders, Clínica de Pequenos Animais**. 2ª ed. São Paulo: Rocca, 2003.

BONACH, K.; MALVASIO, A.; MATUSHIMA, E. R.; VERDADE, L. M. **Temperature-sex Dtermination in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae)**. Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre, 101(3): 151-155, 2011.

CARVALHO, O.; GONÇALVES, C. **Comparative Physiology of the Respiratory System in the Animal Kingdom**. The Open Biology Journal, v.4, 35-46, 2011.

CENAQUA. **Núcleo Experimental de Tecnologia de Criação de Quelônios na Amazônia em Cativeiro na UHE**. Balbina /AM: Ibama, p. 9. 1992.

FRAGA, R.; LIMA, A. P.; PRUDENTE, A. L. P.; MAGNUSSON, W.E. **Guia de Cobras da Região de Manaus - Amazônia Central - Guide to the Snakes of the Manaus Region - Central Amazonia**. Manaus : Editora Inpa, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2013. 303 p., 2013.

HICKMAN, C.P., JR; CLEVEND, P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 872 p., 2004.

HSIA, C.C.W.; SCHMITZ, A.; LAMBERTZ, M.; PERRY, S. F.; MAINA, J. N. **Evolution of Air Breathing: Oxygen Homeostasis and the Transitions from Water to Land and Sky**. *Changes*, v. 29, n.6, p. 997-1003, 2013.

IVERSON, J.B **A Revised Checklist With Distribution Maps Of The Turtles Of The World**. J.P. Iverson, Richmond, 363 p., 1992.

JUNIOR, G. S.; MALVASIO, A.; PORTELINHA, T. C. G. **Avaliação da Predação de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no Rio Javaés, Tocantins**. *Acta Amazônica*. v. 39 (1) 207 – 214, 2009.

KARDONG, K. V. **Vertebrados- Anatomia Comparada, Função e Evolução**. 5ª ed. Editora Roca, 928 p., 2011.

KIERNAN, J.A. **Histological and Histochemical Methods - Theory and Practice**. Frankfurt, 2nd ed., Pergamon Press, p.176-177, 1990.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular**. Uma introdução a patologia. Elsevier Editora Ltda. 2ª ed. 696 p., 2008.

LAFORTUNE, M.; GOEBEL, T.; JACOBSON, E.; HEARD, D.; BROWN, D.; ALLEMAN, R.; VLIET, K.; HARR, K.; HERNANDEZ, J.; **Respiratory Bronchoscopy of Subadult American Alligators (*Alligator mississippiensis*) and Tracheal Wash Evaluation**. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36(1): 12–20, 2005.

LEGLER, J. M.; GEORGES, A. Family Chelidae. In: GLASBY, C.J, ROSS, G.J.B.; BEESLEY, P.L. (Ed.), **Fauna of Australia**. Canberra: Australian Government Publishing Service, cap. 2A, 1993.

LIEM, K.F.; BEMIS, W. E.; WALKER JR, W. F.; GRANDE, L. **Anatomia Funcional dos Vertebrados: Uma Perspective Evolutiva**. 1ª ed. Cengage Learning Editora, 560 p., 2013.

LILLIE, R. D.; FULLMER, H. M.; **Histopathology Technique and Practical Histochemistry**. 4^a. ed: Mac Graw-Hill Book Company, p. 208-637., 1976.

LUZ, L.F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; FERNANDES, E. S.; PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N.; REIS, I. J. **Rendimento e Composição Química de Carcaça da Tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) em Sistema Comercial**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.1, p.1-9, 2003.

LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. **The Biology of Sea Turtles**. Series: Marine science series. v. II, CRC Press, 455 p., 2003.

MADER, D. R. **Reptile Anatomy**. In: Latin American Veterinary Conference Oct. 16-19, 2009 – Lima, Peru. Published in IVIS with the permission of the LAVC, 2009.

MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. California: W. B. Saunders Company, p. 396 – 406, 425 – 427, 1996.

MAINA, J.N. **Fundamental Structural Aspects and Features in the Bioengineering of the Gas Exchangers: Comparative Perspectives**. Advances in anatomy, 2002.

MALTA, T. S.; NASCIMENTO, M. R. B. M. 2005. **Estudo Hematobioquímico na *Podocnemis unifilis*: Perfil Bioquímico Sanguíneo**. Horizonte Científico, 2(5):1-13. 2005.

MARTINS, M.; MOLINA, F.B.; **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. - 1^a ed. Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, v. 2, 1420 p., 2008.

MARTINS, F.D.; CASTILHO, A.; CAMPOS, J.; HATANO, F. M.; ROLIM, S. G. **Fauna da Floresta Nacional de Carajás**. Estudos sobre vertebrados terrestres. São Paulo: Rona Editora, 230 p., 2012.

MORANDINI, C. **Zoologia 4**. 4^a ed. volume 4. São Paulo: Editora Nobel S.A. 1969.

NASCIMENTO, S. P. **Observações Sobre o Comportamento de Nidificação de Três Espécies de *Podocnemis Wagler* (Testudinata, Pelomedusidae) no Baixo Rio Branco, Roraima, Brasil.** Revista Brasileira de Zootecnia, 19 (1): 201 - 204, 2002.

NASCIMENTO, S. P.; CARVALHO, C. M.; FARIAS, R. E. S. **Biologia Geral e Experimental**, Os Quelônios de Roraima, Boa Vista, RR. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) v. 12, n. 1, 2012.

OLIVEIRA, P. M. A. **Animais Silvestres e Exóticos na Clínica Particular.** São Paulo: Roca, p. 197 – 350, 2003.

ORR, R.T. **Biologia Dos Vertebrados.** 5^a ed. São Paulo: Roca, 508 p., 1986.

PARÉ, J. A. **Reptile Basics: Clinical Anatomy 101.** In: Proceedings of the North American Veterinary Conference, January 7-11, 2006 – Orlando, Florida. Published in IVIS with the permission of the NAVC, 2006.

PASTOR, L. M.; BALLESTA, J.; CASTELLS, M. T.; TOMAS, R. P.; MARIN, J. A.; MADRID, J. F. **A Microscopic Study of the Lung of *Testudo graeca* (Chelonia).** Journal of Anatomy, 164, pp. 19-39, 1989.

PASTOR, L. M.; BALLESTA, J.; HERNANDEZ, F.; TOMAS, R. P.; ZUASTI, A; FERRER, C. **A Microscopic Study of the Tracheal Epithelium of *Testudo graeca* and *Pseudemys scripta elegans*.** Journal of Anatomy, 153, pp. 171-183, 1987.

PERRY, S. **Functional Morphology of the Lungs of the Nile Crocodile, *Crocodylus niloticus*: Non-respiratory Parameters.** Journal of Experimental Biology 134: 99-117, 1988.

POUGH, F. H.; C. M. JANIS & J. B. HEISER. **Testudines; Ectothermia: um acesso de baixo custo à vida. In: A Vida dos Vertebrados.** 3^a ed. São Paulo: Atheneu, 699p., 2003.

POWELL, F. L.; HOPKINS, S. R. **Comparative Physiology of Lung Complexity: Implications for Gas Exchange.** News Physiol Sci 19: 55-60, 2004.

SANTOS, C. M.; FIGUEIREDO, M. A.; TEIXEIRA, M. J.; NASCIMENTO, A. A.; SALES, A. **Light Microscopic and Immunohistochemical Study of the Trachea of the Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*)**. Veterinarni Medicina, 56, (1): 48–54, 2011.

SHADKHAJAST, M.; SHABAZKIA, H. R.; BIGHAM, A. S.; SHARIATI, S. E.; MAHMOUDI, T. **A Histo-anatomical Study of the Trachea of Central Asian Tortoise (*Testudo horsfieldii*) in Iran**. Veterinary Journal. v. 5 n. 2, Article 67, 2010.

SOLOMON, S. E.; PURTON, M. **The Respiratory Epithelium of the Lung in the Green Turtle (*Chelonia mydas L.*)**. Journal of Anatomy. 139, 2, pp.353-370, 1984.

SOUZA, L. A. G.; CASTELLÓN, E. G. **Desvendando as Fronteiras do Conhecimento na Região Amazônica do Alto Rio Negro**. Projeto Fronteira, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, 347p., 2012.

STORCH, V.; WELSCH, U. **Zoologisches Praktikum**, 22 Auflage, Spektrum, 482 p., 1996.

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R. C. & NYBAKKEN, J.W. **Zoologia Geral**. 6ª ed. São Paulo: Cia. Ed. Nacional, 837p. 1991.

TAYLOR, E.W.; LEITE, C. A. A.; MCKENZIE, D. J.; WANG, T. **Control of Respiration in Fish, Amphibians and Reptiles**, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 43, 2010.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**, Fourth Edition, Elsevier, 757 p., 2014.

VOGT, R. C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, Peru: Gráfica Biblos. 104p., 2008.

WYNEKEN, J. **Respiratory Anatomy – Form and Function in Reptiles**. Exotic Dvm, v. 3.2, 2001.

Anatomy of Animals - A review of universe. Disponível em:

<<http://universe-review.ca/R10-33-anatomy09.htm>;modificado> Acesso em 15/12/2014.

Compañeros de viaje: Tortuga gigante del Orinoco. Disponível em:
<combinacionanimal.blogspot.com.br/2010/06/tortuga-gigante-del-orinoco-podocnemis.html> Acesso em 15/12/2014.

Podocnemis expansa range - Testudines. Disponível em:
<<http://www.testudines.org/en/medias/media/7498>> Acesso em 18/07/2014.

Quartos Anos Colégio Puríssimo: Esqueleto de tartaruga: Disponível em:
<<http://4anopurissimo.blogspot.com.br/2013/10/esqueleto-de-tartaruga.html>> Acesso em 09/12/2014.

Reptiles - Sensory Systems - HonorsBiologyP6 - Wikispaces. Disponível em:
<<http://honorsbiology6.wikispaces.com/Reptiles++Sensory+Systems>> Acesso em 10/12/2014.

Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em:
<<http://www.sbherpetologia.org.br/>> Acesso em 19/07/2014.

Testudines Linnaeus 1758. Disponível em:
<http://www.testudines.org/mmedia/Articles/biology/anatomy/diagrams/cryptodira_vs_pleurodira_v_niclos_www_testudines_org_001_002_ful.jpg> Acesso em 16/12/2014.

Transport - Amy W-Kingdom and Processes - Google Sites
<<http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/f29.13.jpg>> Acesso em 17/12/2014.