

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**ONTOGENIA DOS OSSOS DO
ESQUELETO DA TARTARUGA-DA-
AMAZÔNIA *Podocnemis expansa*
Schweigger, 1812 (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE)**

Lucélia Gonçalves Vieira
Bióloga

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ONTOGENIA DOS OSSOS DO ESQUELETO DA
TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa*
Schweigger, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

Lucélia Gonçalves Vieira

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Fevereiro de 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V658o Vieira, Lucélia Gonçalves, 1978-
 Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae) / Lucélia Gonçalves Vieira. - 2008.
 152 f. : il.

 Orientador: André Luiz Quagliatto Santos.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

 Inclui bibliografia.

 1. Anatomia veterinária - Teses. 2. Anatomia comparada - Teses.
 I. Santos, André Luiz Quagliatto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 591.4

Lá no pezinho daquela serra
Bem juntinho da donzela
Nascendo chorando vivi
E vivendo cantando, sorrindo, como se fosse alegria,
Cheguei ao fim do dia
E, passando por Souzalândia cheguei a Ourilândia.
Descendo até Belém, andando de trem
Cheguei ao Muquém
Sentindo no meu ser depois do amanhecer
Queria me defender
E, chegando a faculdade com toda ansiedade
Fui me aprender
Ainda chorando, cantando, sorrindo e divertindo
Sigo para meu horizonte que ainda muito distante
Me aguarda lá
E com orgulho é que me disponho para o futuro
O passado já passou o presente já foi,
Neste continente é que eu vou andando
Nesta estrada, bem perto estou da minha chegada
E toda beleza que responde a natureza é que
recebo este curso com muita firmeza.

José Gonçalves Vieira

Dedico ao Senhor Deus, aos meus pais, José Gonçalves Vieira e Maria Geralda de Oliveira, e aos meus irmãos, Luciana, Fábio, Flávio e Mateus, pelo carinho, apoio e confiança.

Agradecimentos

Ao altíssimo, onipotente e bom Senhor, por todas as Suas criaturas.

À minha família, por todo amor, amizade, exemplo de vida, apoio incondicional em todos os momentos e principalmente pelos sacrifícios dispensados para a minha criação e educação.

Ao Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos que mais que um orientador exemplar, tornou-se um verdadeiro amigo. Obrigado pela credibilidade, parceria e convívio.

Ao professor Dr. Tales Alexandre Aversi Ferreira, com sua sabedoria e mão amiga.

Ao dileto professor Sergio Fonseca Zaiden, cuja boa vontade e empenho são admiráveis.

Aos bons e fiéis estagiários que fazem do Laboratório de pesquisa em animais silvestres uma lição de vida, principalmente àqueles que se tornaram amigos muito queridos, e me ensinaram mais do que eu poderia imaginar.

Aos professores Nilson Pena, Márcia Machado e Paulo Eugênio, pela abertura e solicitude.

Aos meus colegas de mestrado, pela caminhada que fizemos.

A Vivian Paes Leme pelo convívio nesse caminhar e por compartilhar as intensas jornadas de trabalhos, principalmente no que diz respeito aos conhecimentos de informática.

Ao IBAMA/RAN pela confiança e suporte.

À Beatrice Allain, que tornou possível a divulgação internacional deste trabalho.

A realização deste projeto foi possível graças ao fomento direto da Fundação de Amparo à Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) na forma de bolsa de mestrado.

Ainda gostaria de agradecer àqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

MUITÍSSIMO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

	Páginas
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	01
CAPÍTULO 2: Ontogenia dos ossos do crânio em tartaruga-da- Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	22
CAPÍTULO 3: Ontogenia dos ossículos da esclera em tartaruga-da- Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	44
CAPÍTULO 4: Ontogenia do esqueleto da coluna vertebral em tartaruga- da-Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	57
CAPÍTULO 5: Ontogenia dos ossos da carapaça em tartaruga-da- Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	73
CAPÍTULO 6: Ontogenia dos ossos do plastrão em tartaruga-da- Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	89
CAPÍTULO 7: Ontogenia dos ossos da cintura peitoral e dos membros torácicos em tartaruga-da-Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	104
CAPÍTULO 8 - Ontogenia dos ossos da cintura pelvina e dos membros pelvins em tartaruga-da-Amazônia <i>Podocnemis expansa</i> Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae).....	126
APÊNDICE.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac – acetábulo
AS – superfície articular do corpo
As – osso supra-angular
Ba – osso basioccipital
Bas – osso basisfenóide
C - costela
C1 - costela 1
C2 - costela 2
C3 - costela 3
C4 - costela 4
C5 - costela 5
C6 - costela 6
C7 - costela 7
C8 - costela 8
C9 - costela 9
C10 - costela 10
C11 - costela 11
C2 - osso central 2
C3 - osso central 3
CA - centro atlantal
Co – osso coronóide - Capítulo 2
Co – corpo da vértebra - Capítulo 4
Co – osso coracóide - Capítulo 7
Co1 – osso costal 1
Co2 – osso costal 2
Co3 – osso costal 3
Co4 – osso costal 4
Co5 – osso costal 5
Co6 – osso costal 6
Co7 – osso costal 7
Co8 – osso costal 8
CP – cintura peitoral
CT – osso central do tarso
DC I – osso distal do carpo I
DC II - osso distal do carpo II
DC III - osso distal do carpo III
DC IV - osso distal do carpo IV
DC V - osso distal do carpo V
De – osso dentário
DT I – osso distal do tarso I
DT II - osso distal do tarso II
DT III - osso distal do tarso III
DT IV - osso distal do tarso IV
End – osso endoplastrão
Epi – osso epiplastrão

Es – osso escápula
Es – osso esquelomosal
Ex – osso exoccipital
FD – falange distal
Fé – osso fêmur
Fi – osso fíbula
FM – falange média
Fon – fontanela
FP – falange proximal
Fr – osso frontal
FT – osso fibular do tarso
Hio – osso hioplastrão
Hip – osso hipoplastrão
IA – intercentro atlantal
IC – osso intermédio do carpo
IL – osso ílio
Is – osso ísquio
Ju – osso jugal
Ma – osso maxilar
Mc - osso metacarpo
Mes – osso mesoplastrão
NA – arco vertebral atlantal
Ne1– osso neural 1
Ne2– osso neural 2
Ne3– osso neural 3
Ne4– osso neural 4
Ne5– osso neural 5
Ne6– osso neural 6
Ne7– osso neural 7
Nu – osso nugal
Op – osso opistótico
OS – ossículo da esclera
P1 – osso periférico 1
P2 – osso periférico 2
P3 – osso periférico 3
P4 – osso periférico 4
P5 – osso periférico 5
P6 – osso periférico 6
P7 – osso periférico 7
P8 – osso periférico 8
P9 – osso periférico 9
P10 – osso periférico 10
P11 – osso periférico 11
P12 – osso periférico 12
Pa – osso parietal
PA – processo acromial
Pal – osso palatino
PC – osso pisiforme do carpo

PCa - processo articular caudal
PCr – processo articular cranial
Pi – osso pigal
Po – osso pós-orbital
Pr – osso proótico
Prf – osso pré-frontal
Prm – osso pré-maxilar
PT – processo transversal
Pt – osso pterigóide
Pu – osso pube
Qj – osso quadradojugal
Qu – osso quadrado
Ra – osso rádio
Sb – sobreposição
So – osso supra-occipital
SP – osso supra-pigal
Ti – osso tíbia
UC – osso ulnar do carpo
Ul – osso ulna
Um – osso úmero
VC – vértebras cervicais
VC – vértebras costais
VCa – vértebras caudais
Ve - vértebra
Vo – osso vômer
VS – vértebras sacrais
Xif – osso xifiplastrão
± - mais ou menos
> - maior que
= - igual
KOH - Hidróxido de potássio

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2

Figura 1: Desenho esquemático de crânio de *Podocnemis expansa*. (A) vista dorsal; (B) vista lateral; (C) vista ventral; (D) vista latero-caudal. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pós-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm pré-maxilar; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino, Vo, vômer; Op, opistótico; Pr, proótico; Ex, exoccipital..... 30

Figura 2: Desenho esquemático da mandíbula de *Podocnemis expansa*. (A), vista ventral da mandíbula; (B), vista dorsal da mandíbula. De, dentário; Co, coronóide; Sa supra-angular..... 30

Figura 3: Desenho esquemático da seqüência de formação óssea do crânio de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 17; (C) estágio 19; (D) estágio 20; (E) estágio 21; (F) estágio 24. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pos-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm, pré-maxila; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino; Vo, vômer; Op, opistótico; Pr, proótico; Ex, exoccipital..... 32

Figura 4: Desenho esquemático da seqüência de formação óssea do crânio de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 19; (C) estágio 20; (D) estágio 24. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pos-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Op, opistótico..... 34

Figura 5: Desenho esquemático da seqüência de formação óssea do crânio de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 19; (C) estágio 20; (D) estágio 24. Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm, pré-maxila; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino; Vo, vômer; Op, opistótico; Ex, exoccipital..... 34

Figura 6: Fotografias de crânio de *Podocnemis expansa*. (A) vista ventral, estágio 16; (B) vista ventral, início do estágio 17; (C) vista ventral, final do estágio 17; (D) vista dorsal, estágio 19; (E) vista ventral, estágio 19; (F) vista ventral, estágio 23; (G) vista dorsal, estágio 23; (H) vista dorsal, estágio 24. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pós-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm, pré-maxilar; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino; Vo, vômer; Op, opistótico; Pr, proótico; Ex, exoccipital; De dentário; Co, coronóide; Sa, supra-angular..... 35

Figura 7: Fotografias de mandíbulas de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 17; (C) estágio 19; (D) estágio 20. De, dentário; Co, coronóide; Sa, supra-angular..... 36

CAPÍTULO 3

Figura 1: Desenho esquemático dos ossículos da esclera em *Podocnemis expansa* adulta. OE, ossículos da esclera..... 49

Figura 2: Fotografias de olhos de *Podocnemis expansa*. Olho direito, vista corneal. (A) estágio 21, (B) estágio 22, (C) estágio 23, (D) estágio 24. Seta, ossículos da esclera, Sb, sobreposição. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red s e cartilagem com alcian blue. (A, C e D)x 16, (B) x 7..... 50

CAPÍTULO 4

Figura 1: Desenho esquemático das vértebras de *Podocnemis expansa*. Vista ventral. VC, vértebras cervicais; VCo, vértebras dorsais; VS, vértebras sacrais, VCa, vértebras caudais..... 61

Figura 2: Desenho esquemático de uma vértebra típica de *Podocnemis expansa*. Vista lateral. PCr, processo articular cranial; PCa, processo articular caudal; PT, Processo transversal; Co, Corpo; SA, superfície articular do corpo..... 63

Figura 3 - Desenho esquemático do atlas de *Podocnemis expansa*. (A) vista cranial; (B) vista caudal; (C) vista dorsal; (D) vista ventral. IA, intercentro atlantal; AV, arco vertebral atlantal; CA, centro atlantal..... 64

Figura 4: Fotografias de embriões e filhote de *P. expansa*, vista ventral. **(A)**, estágio 15: Modelo cartilaginoso da coluna vertebral. **(B)** início do estágio 17: Desenvolvimento das vértebras cervicais. **(C)** final do estágio 17: Desenvolvimento das vértebras cervicais e costais; **(D)** estágio 18. **(E)** estágio 19: Desenvolvimento das vértebras costais. **(F)** início estágio 20, **(G)** final do estágio 20: Desenvolvimento das vértebras sacrais e caudais. **(H)** 5º dia após eclosão. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A)x7. Barra: 10 mm..... 66

CAPÍTULO 5

Figura 1: Desenho esquemático das costelas de embrião de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. C, costela..... 78

Figura 2: Desenho esquemático da carapaça de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. Co, osso costal; Ne, osso neural; Nu, osso nuchal; SP, osso supra-pigal; Pi, osso pigal; P, osso periférico. 79

Figura 3: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista ventral. **(A)**, estágio 15. **(B)**, estágio 17. Seta, início de ossificação; cabeça de seta, cartilagem. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A)x7. Barra: 10mm..... 80

Figura 4: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista dorsal. **(A)** estágio 16. **(B)** estágio 17 - Desenvolvimento das costelas. **(C)** estágio 19. **(D)** estágio 20 - desenvolvimento dos ossos costais e ossos neurais. **(E)** estágio 21. **(F)** final do estágio 23. C, Costela; Co, osso costal; Ve, vértebra; Ne, osso neural; Nu, osso nuchal; Pi, pigal; SP, supra-pigal. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red e alcian blue. Aumento: (A, B e C)x7. Barra - 10 mm..... 81

Figura 5: Fotografias de embriões e filhotes de *P. expansa*, vista dorsal. **(A)** estágio 25. **(B)** estágio 26 - desenvolvimento dos ossos periféricos. **(C)** 5º dia após eclosão - desenvolvimento dos ossos periféricos, pigal e supra-pigal. **(D)** 18º dia após eclosão. **(E)** 43º dia após eclosão. **(F)** 46º dia após eclosão - desenvolvimento da carapaça. P, ossos periféricos; Nu, osso nuchal; SP, osso supra-pigal; Pi, osso pigal. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red. Barra - 10 mm..... 82

CAPÍTULO 6

Figura 1: Desenho esquemático dos elementos ósseos do plastrão de *Podocnemis expansa* adulta. Vista dorsal. Epi, epiplastrão; End, endoplastrão; Hio, hioplastrão; Mes, mesoplastrão; Hip, hipoplastrão; Xif, xifiplastrão..... 94

Figura 2: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista ventral. (A) estágio 15. (B) estágio 17. Ve, vértebra; C, costela, setas, início de ossificação, asterisco (*), cartilagem. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A)x7. Barra: 10mm..... 95

Figura 3: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista ventral. (A) estágio 16: Desenvolvimento do endoplastrão, hioplastrão, hipoplastrão, xifiplastrão e mesoplastrão. (B) estágio 17: Desenvolvimento do epiplastrão. (C) estágio 20: Desenvolvimento de todos os elementos ósseos do plastrão. Epi, epiplastrão; End, endoplastrão; Hio, hioplastrão; Hip, hipoplastrão; mes, Mesoplastrão e Xif, xifiplastrão. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S. Aumento: (A)x7; (B)x32. Barra: 10 mm..... 96

Figura 04: Fotografias de embriões e filhotes de *P. expansa*, vista ventral. (A) e (B) estágio 24; (C) 5º dia após eclosão, (D) 17º dia após eclosão, (E) 53º dia após eclosão, (F) 7º mês após eclosão: Fechamento do plastrão. Fca, fontanela caudal; Fcr, fontanela cranial. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red. Barra: 10 mm..... 97

CAPÍTULO 7

Figura 1: Desenho esquemático dos ossos da cintura peitoral de *Podocnemis expansa*. Es, escápula; PA, processo acromial; FG, fossa glenóide; Co, coracóide..... 110

Figura 2: Desenho esquemático dos ossos do membro torácico de *Podocnemis expansa*. Um, úmero; Ra, rádio; Ul, ulna; DCI, distal do carpo I; DCII, distal do carpo II; DCIII, distal do carpo III; DCIV, distal do carpo IV; DCV, distal do carpo V; C2, central 2; C3, central 3; IC, intermédio do carpo; UC, ulnar do carpo; PC, pisiforme; Mc, metacarpo; FP, falange proximal; FM, falange media, FD, falange distal; (I) dedo I; (II) dedo II; (III) dedo III; (IV) dedo IV; (V) dedo V..... 112

Figura 3: Fotografias de cinturas peitorais e membros torácicos de embriões de *Podocnemis expansa*. (A) início do estágio 19. (B) final do estágio 19. (C) estágio 20. (D) estágio 16. (E) estágio 17. (F) estágio 19. (G) e (H) estágio 17. Es, escápula; PA, processo acromial; Co, coracóide; Um, úmero; Ra, rádio; Ul, ulna; CP, cintura escapular; (*), cartilagem. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red s e alcian blue. (A, B e C) 10x, (D) 25 x, (E e F) 20x, (G e H) barra 10 mm. 114

Figura 4: Fotografias de mãos de embriões de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. (A) e (B): estágio 20, desenvolvimento dos metacarpos e das falanges distais. (C) e (D) estágios 20, 21, desenvolvimento das falanges médias. (E) e (F) estágios 22, 23, desenvolvimento das falanges proximais. FD, falanges distais; FM, falanges médias; FP, falanges proximais; Mc, metacarpos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red s. (A) 40 x, (B, C, D e F) 16 x, (E) 12,5 x..... 115

Figura 5: Fotografias de antebraços e mãos de embriões e filhotes de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. (A) estágio 23. (B) estágios 24. (C) início do estágio 25. (D) final do estágio 25. (E) 40 dias após eclosão. (F) 40 dias após eclosão. DCI, distal do carpo I; DCII, distal do carpo II; DCIII, distal do carpo III; DCIV, distal do carpo IV; DCV, distal do carpo V; C2, central 2; C3, central 3; IC, intermédio do carpo; UC, ulnar do carpo; Pi, pisiforme; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red s. Barra 10mm..... 116

CAPÍTULO 8

Figura 1: Desenho esquemático dos ossos cintura pelvina. (A) cintura pelvina; vista cranial (B), metade esquerda da cintura pelvina, vista lateral. IL, ílio; Is, ísquio, Pu, pube; Ac, acetábulo..... 130

Figura 2: Desenho dos ossos do membro pelvino esquerdo de *Podocnemis expansa*. Fe, fêmur; Fi, fíbula; Ti, tíbia; DT I, distal do tarso I; DT II, distal do tarso II, DT III, distal do tarso III, DT IV, distal do tarso IV; CT, central do tarso, IT, intermédio do tarso; FT, fibular do tarso; FD, falanges distais; FM, falanges médias; FP, falanges proximais; Mt, metatarsos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V..... 131

Figura 3: Fotografia de embriões de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 17; (C) estágio 19, (D) estágio 20, (E) estágio 21, (F), 6 meses após eclosão. Fe, fêmur, Ti, tíbia, Fi, fíbula, IL, ílio, Is, ísquio, Pu, púbis. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina res s (A e B) x25, (C) x12,5, (D) x7..... 133

Figura 4: Fotografias de membros pelvins de embriões de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 19, (B) início estágio 22, (C) estágio 23, (D) início do estágio 24, (E) final do estágio 24, (F) estágio 26. Fe, fêmur; Fi, fíbula; Ti, tíbia; DT I, distal do tarso I; DT II, distal do tarso II, DT III, distal do tarso III, DT IV, distal do tarso IV; DT V, distal do tarso V; CT, central do tarso, IT, intermédio do tarso; FT, fibular do tarso; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red s e cartilagem com alcian blue. (B)x10; (C e E)x 12,5; (F)x7; (A e D) barra 10mm..... 134

Figura 5: Fotografias de pés de embriões de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. (A) estágio 18, (B) estágio 19, (C) estágio 20: Desenvolvimento dos metatarsos e das falanges distais. (D) estágio 21, (E) final do estágio 22: Desenvolvimento das falanges médias. (F) estágio 23, (G) estágio 24, (H) estágio 25: Todos os centros de ossificação. FP, falanges proximais; FM, falanges médias; FD, falanges distais; Mt, metatarsos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red s e cartilagem com alcian blue. (A, B e C)x16 e (D, E, F, G e H)x 12,5..... 135

APÊNDICE

Figura 1: A, Vista panorâmica do acampamento do RAN/IBAMA, no Rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia, Goiás; B, C e D, Coleta dos ovos..... 144

Figura 2: A, Retirada do embrião do ovo; B, tela envolvendo a cova; C e D, filhotes de *P. expansa* recém eclodidos..... 144

Figura 3: A, B e C. reagentes químicos utilizados na pesquisa; D e E, embriões de *P. expansa* em processamento; F, microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus)..... 145

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Médias do comprimento (Comp.) e largura (Larg.) da carapaça e plastrão, altura, comprimento crânio-caudal (CR) e peso de embriões de <i>Podocnemis expansa</i> , dos estágios 18 ao 25.....	146
Quadro 2: Médias do comprimento (Comp.) e largura (Larg.) da carapaça e plastrão, altura, comprimento crânio-caudal (CR) e peso de filhotes de <i>Podocnemis expansa</i> , recém-eclodidos.....	147
Quadro 3: Seqüência de ossificação dos ossos do crânio de <i>Podocnemis expansa</i> , dos estágios 16 ao 26.....	147
Quadro 4: Seqüência de ossificação dos ossos da carapaça e plastrão de <i>Podocnemis expansa</i> , dos estágios 16 ao 26 e filhote.....	149
Quadro 5: Seqüência de ossificação dos ossos da coluna vertebral de <i>Podocnemis expansa</i> , dos estágios 16 ao 26.....	149
Quadro 6: Seqüência de ossificação dos ossos da cintura pelvina e membros pelvins de <i>Podocnemis expansa</i> , dos estágios 16 ao 26. FD, falanges distais; FM, falanges médias; FP, falanges proximais; Mt, metatarsos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V.....	150
Quadro 7: Seqüência de ossificação dos ossos da cintura peitoral e membros torácicos de <i>Podocnemis expansa</i> , dos estágios 16 ao 26 e filhotes. FD, falanges distais; FM, falanges médias; FP, falanges proximais; Mc, metacarpos, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V.....	151

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Aspectos gerais dos Testudines

Dentre os animais conhecidos como répteis existem aproximadamente 6.400 espécies. Numa revisão taxonômica baseada na filogenia, os répteis foram divididos em quatro ordens: Testudines (tartarugas, cágados e jabutis), Lepidosauria (lagartos, serpentes, anfisbênia e tuatara), Crocodylia (crocodilos, jacarés e gaviais) e Aves, cada um dos grupos com características conspícuas (RIEPPPEL; REISZ, 1999; POUGH et al., 2003).

Os integrantes da ordem Testudines teriam desenvolvido um modo de vida bem sucedido no período Triássico, há aproximadamente 240 milhões de anos e, desde então, em contraste com muitos outros animais, teriam se modificado muito pouco. O casco, a chave do seu sucesso, também teria limitado a diversidade do grupo (ALIBARDI; THOMPSON, 1999; SOUZA, 2006).

Mader et al. (2006) e Ribas e Monteiro Filho (2002), informaram que a ordem testudines é encontrada em toda a superfície terrestre, com exceção do Continente Antártico, sendo que ocupam nichos específicos, relacionando-se com o meio de acordo com os desafios que encontram. Estes animais vêm sofrendo impacto com a pressão humana e a degradação ambiental. Calcula-se que, das 290 espécies de testudines conhecidas, 166 estão ameaçadas de extinção

Atualmente encontram-se duas sub-ordens entre os Testudines, cryptodira e pleurodira. Na primeira, onde está inserida a maioria das espécies, os animais retraem a cabeça por meio de uma flexão vertical das vértebras do pescoço, enquanto que os Pleurodiros flexionam o pescoço lateralmente (SOUZA, 2006).

Segundo Gilbert et al. (2001), o casco é a característica mais distintiva de um Testudine, está intimamente associado a alguns padrões comportamentais (MOLINA 1992). A porção dorsal convexa é a carapaça e a parte ventral mais achatada é o plastrão (ALIBARDI; THOMPSON, 1999; MYERS et al., 2006). Os ossos da carapaça são recobertos por escudos córneos de origem epidérmica que não coincidem, em número e posição com os ossos subjacentes (GILBERT et al., 2001). Em muitos Testudines, a carapaça e o plastrão são estruturas rígidas, mas em

outros têm evoluído, independentemente, a habilidade para fechar o corpo com o casco, através da articulação de partes do plastrão (POUGH et al., 2003). De acordo com as informações de Medem (1976) e Bujes e Verrastro (2007), o formato, tamanho, coloração, número e disposição dos escudos que compõem o casco são características importantes na identificação genérica e específica do grupo

Áreas flexíveis, denominadas charneiras, estão presentes no casco de diversos Testudines. Os exemplos mais familiares são os jabutis-caixa (*Terrapene* e *Cuora*), nos quais uma charneira entre os ossos hioplastrão e hipoplastrão permite que as extremidades cranial e caudal do plastrão se elevem para fechar as aberturas cranial e caudal do casco. As tartarugas-do-lodo (*Kinosternon*) possuem duas charneiras no plastrão e em *Pelusios* (Pleurodira) ocorre uma charneira entre o mesoplastrão e o hipoplastrão.

A ocorrência filogenética irregular de cascos cinéticos e diferenças entre espécies aparentadas indica que a mobilidade do casco evoluiu muitas vezes nos Testudines (POUGH et al., 2003; BUJES; VERRASTRO, 2007). A assimetria dos escudos epidérmicos pareados é muito comum entre os testudines, e modificações da estrutura óssea do casco são vistas em algumas famílias. As tartarugas-de-casco-mole não apresentam ossificações periféricas e escudos epidérmicos. As extremidades distais das costelas alargadas estão imersas em tecido conjuntivo flexível e, a carapaça e o plastrão são recobertos por pele.

A tartaruga fluvial da Nova Guiné (*Carettochelys*) também é recoberta por pele em vez de escudos, mas, nessa espécie, os ossos periféricos estão presentes e a borda do casco é rígida. A tartaruga-de-couro (*Dermochelys*) possui a carapaça formada por milhares de pequenos ossos poligonais imersos em cartilagem, e os ossos do plastrão estão reduzidos a uma faixa delgada em torno da borda do plastrão. No jabuti-panqueca (*Malachochersus*), as ossificações dos ossos neurais e costais são muito reduzidas, mas as placas epidérmicas são bem desenvolvidas.

Pough et al. (2003) e Hildebrand e Goslow (2006) relataram que os testudines estão entre os vertebrados mais especializados morfologicamente. A estrutura dos membros é altamente variável, refletindo o ambiente e os modos de locomoção das diferentes espécies. Aquelas marinhas apresentam os membros torácicos proporcionalmente grandes em relação ao tamanho do casco e em forma de remo.

Já as espécies de água doce apresentam, em sua maioria, os membros pelvinos e torácicos espalmados, com dedos distintos possuindo quatro ou cinco garras, enquanto que as espécies terrestres apresentam membros em forma de coluna com dedos indistintos.

O tamanho desses animais varia muito entre as espécies. Sendo que os menores exemplares de testudines dulcícolas possuem cerca de 10 cm de comprimento, enquanto os maiores animais terrestres podem ultrapassar o comprimento de 120 cm. O maior exemplar de uma espécie vivente trata-se de uma tartaruga marinha, medindo quase 200 cm e pesando de 500 a 600 Kg (SALERA JUNIOR, 2005).

Vários são os padrões de crescimento dos Testudines. Muitas espécies podem dobrar de massa e tamanho no primeiro ano de vida. Em geral, têm sua taxa de crescimento diminuída com o alcance da maturidade sexual e os fatores que determinam tais padrões podem ser: mudança de uma dieta carnívora, quando filhote, para herbívora, quando adulto; dimorfismo sexual; temperatura da água; quantidade de alimento ingerido e fatores genéticos (GIBBONS, 1969; CLARK; GIBBONS, 1969; IVERSON, 1977).

Os Testudines são considerados entre os animais mais longevos. Isso tem sido repetidamente provado em algumas espécies, que podem viver mais de 50 anos de idade. De fato, entre aqueles criados em cativeiro, muitos espécimes tem alcançado a idade de 100 anos (GIBBONS, 1987; CONGDON; SELS, 1991; SHINE; IVERSON, 1995).

A ectotermia é uma característica desse grupo, sendo que esses animais regulam a temperatura corpórea através da troca de energia com o ambiente. Os animais terrestres durante as diferentes horas do dia ocupam ambientes variados, ora se expondo ao sol, ora deslocando-se para áreas sombreadas. Muitas espécies aquáticas saem da água para termorregular em pedras e troncos às margens dos corpos d'água em que vivem, ou exploram os micro-habitats aquáticos, sem necessidade, portanto, de se exporem ao sol ou permanecerem em superfícies expostas. As temperaturas corporais de tartarugas que se aquecem ao sol são mais elevadas do que as temperaturas da água e do ar e podem acelerar a digestão, o crescimento e o desenvolvimento dos ovos. Além disso, o aquecimento aéreo pode

auxiliar as tartarugas e cágados a diminuir o número de algas e sanguessugas aderidas ao casco (LACHER JUNIOR et al. 1986; POUGH et al., 2003).

Com relação aos hábitos alimentares, algumas espécies podem ser carnívoras, outras herbívoras, ou ainda possuir uma dieta mista, espécies denominadas onívoras (LUZ et al., 2003). São edentados, sendo que na maioria das espécies existe apenas um rígido bico córneo. Apresentam uma grande diversidade de estratégias alimentares, que variam entre as diferentes famílias e espécies (MALVASIO, 2001; MALVASIO et al., 2002).

Considerando os aspectos reprodutivos, pode-se salientar que são animais ovíparos (SANTOS, 1994), depositando seus ovos em diferentes ambientes terrestres, que podem ser praias fluviais ou costeiras, solo barroso e areno-argiloso próximos aos cursos d'água ou em meio à vegetação (ERNST; BARBOUR, 1989). Quanto à forma, os ovos podem ser esféricos ou alongados (PRITCHARD, 1979). Considerando a estrutura da casca, podem ser agrupados em duas categorias: casca rígida com pequeno potencial de trocas hídricas e gasosas com o meio, e casca flexível, com uma camada calcária porosa, sendo relativamente dependente do ambiente hídrico (EWERT, 1979; PACKARD et al., 1982).

Nos Testudines atuais a determinação sexual tanto pode ser genotípica quanto dependente de fatores ambientais. Estas duas modalidades de determinação sexual podem ocorrer dentro de uma mesma família, bem como dentro de um mesmo gênero (SPOTILA; STANDORA, 1986; MALLMANN, 1994). Os principais fatores ambientais que influenciam a determinação sexual são: temperatura, umidade e trocas gasosas (FERREIRA JUNIOR, 2003).

1.2 Aspectos gerais da biologia reprodutiva dos testudines

Muitas espécies apresentam dimorfismo sexual, sendo expressa principalmente na diferença de porte entre machos e fêmeas, onde geralmente o macho é maior que a fêmea (PRITCHARD, 1979; MOLINA, 1992). Outros caracteres dimorfos freqüentemente observados em muitas espécies são o casco mais baixo e a cauda mais comprida nos machos, além da presença de uma concavidade no plastrão (MOLINA, 1995; FERREIRA JUNIOR, 2003). Em várias espécies, os

machos apresentam as garras dos membros torácicos mais compridos do que as fêmeas (ERNST; BARBOUR, 1989).

O início da maturidade sexual, na maioria dos testudines, é correlacionado principalmente com o tamanho, devido à dificuldade de se determinar a idade (CAGLE, 1950; GIBBONS, 1968; ERNST, 1971). Congdon e Sels (1991) sugerem que a maturidade sexual talvez dependa de interações entre idade, tamanho e massa.

De acordo com as características ambientais e climáticas, os testudines concentram suas atividades reprodutivas em períodos sazonais curtos ou as apresentam distribuídas ao longo do ano. Dessa forma, podem reproduzir uma única vez ou várias vezes ao ano, com longos ou curtos intervalos de acasalamento (PRITCHARD, 1979).

O acasalamento é freqüentemente precedido por comportamento nupcial interessante, que tende a ser preciso e quase ritualizado. Existem diversos sinais táteis que incluem mordidas, golpes e contatos corporais diretos. Esses comportamentos são usados primariamente entre machos e também entre machos e fêmeas (POUGH et al., 2003; MOLINA, 1995).

Segundo Molina (1995), observa-se um padrão de acasalamento entre os testudines, com quatro fases básicas, que podem ser denominadas por: (1) procura pela fêmea, (2) perseguição ou acompanhamento à fêmea, (3) pré-cópula e (4) cópula. Este padrão ocorre nas diversas famílias de testudines, incluindo espécies aquáticas e terrestres. Nem sempre todas as fases ocorrem, e algumas espécies exibem corte mais elaborada, com etapas adicionais. O comportamento de nidificação é estereotipado, ocorrendo sempre em cinco etapas básicas: (1) deambulação, (2) abertura da cova, (3) postura dos ovos, (4) fechamento da cova e (5) abandono do ninho.

A grande maioria das espécies de testudines nidifica isoladamente (PRITCHARD; TREBBAU, 1984), enquanto que as espécies marinhas e *Podocnemis expansa* o fazem coletivamente (ALHO et al., 1979; PRITCHARD, 1979; NASCIMENTO, 2002), retornando a cada estação reprodutiva para desovar na mesma área (MOLINA, 1995; SOARES, 2000).

Todos os Testudines são ovíparos (SANTOS 1994; POUGH et al., 2003). Seus ovos são relativamente grandes, com uma casca membranosa e calcária, podendo apresentar casca mole e flexível ou particularmente dura e áspera (DUK, 1990). Em geral, os ovos com casca mole desenvolvem-se mais rapidamente que os ovos de casca rígida (POUGH et al., 2003).

As fêmeas depositam os ovos em número variável dependendo da espécie, podendo oscilar em média, entre 4 ou 5 até mais de 100. O número, forma e dimensão dos ovos variam de acordo com as espécies e tamanho das fêmeas (SALERA JUNIOR, 2005). O desenvolvimento embrionário também varia em função da espécie, podendo ser de 28 até 420 dias (POUGH et al., 2003). O longo período de desenvolvimento embrionário torna seus ninhos vulneráveis aos predadores.

Durante o processo de eclosão os filhotes utilizam o ovorrupitor (uma pequena estrutura esbranquiçada e pontiaguda situada abaixo das narinas) para realizar pequenos cortes na casca do ovo, que depois são ampliados pela movimentação da cabeça e dos membros torácicos. Esse processo dura, geralmente, de 1 a 2 dias (MOLINA, 1995).

Há espécies em que a determinação sexual depende de fatores ambientais, especialmente da temperatura a que a cova foi exposta. Esse dado enfatiza a importância das informações relativas à biologia básica desses animais para que a conservação e o manejo sejam bem sucedidos (VOGT, 1994; MALVASIO et al., 2002; POUGH et al., 2003). O cuidado parental é inexistente na quase totalidade das espécies, sendo apenas recentemente descrito para uma espécie de testudine aquático, *Kinosternon flavescens* (MOLINA, 1992).

1.3 Testudines do Brasil

O Brasil possui 36 espécies de Testudines distribuídas nos seus diversos ecossistemas terrestres e aquáticos, 29 espécies são de água doce, dois são terrestres e cinco são marinhos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA – SBH, 2007).

Segundo Molina (1996), existem 15 espécies de Testudines na Amazônia brasileira distribuídas em cinco famílias, sendo três da sub-ordem cryptodira

(Emydidae, Kinosternidae e Testudinidae) e as demais da sub-ordem pleurodira (Chelidae e Podocnemididae).

As espécies aquáticas e terrestres mencionadas por Molina, (1995) de ocorrência na bacia do Araguaia são as seguintes: *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae), *Chelus fimbriatus*, *Phrynops geoffroanus* (Chelidae), *Kinosternon scorpioides* (Kinosternidae), *Geochelone carbonaria* e *Geochelone denticulata* (Testudinidae).

As demais espécies citadas para a Amazônia, *Podocnemis sextuberculata* (Podocnemididae) *Rhinoclemmys punctularia* (Emydidae), *Platemys platycephala*, *Phrynops gibbus* e *Phrynops vanderhaegei* (Chelidae) necessitam ser confirmadas na bacia do Araguaia, já que existem alguns relatos não totalmente esclarecedores de sua ocorrência (SMITH, 1979).

1.4 *Podocnemis expansa*

Podocnemis expansa é conhecida popularmente como tartaruga-da-amazônia, tartaruga verdadeira, aráu ou jurará-açu. É um réptil da ordem Testudines que tem a sua distribuição geográfica no norte e centro-oeste do Brasil, Guianas, Venezuela e Colômbia. Habita as baías de grandes rios como os da bacia Amazônica, chegando a alcançar a região central do território brasileiro, bacia dos rios Araguaia e Tocantins, nos estados de Goiás e Mato Grosso (BATAUS, 1998; VALENZUELA, 2001).

Possui hábito diurno e vive em grupo. Na natureza alimenta-se de vegetais e peixes, e em cativeiro de vegetais, peixes, carne moída e ração. Sua época reprodutiva situa-se entre os meses de setembro e março. A *P. expansa* enterra em média, de 60 a 100 ovos em covas de aproximadamente 60 cm de profundidade, espalhando areia para cobri-los e camuflar o local. A eclosão ocorre dentro de 45 a 60 dias. Esse animal é utilizado como fonte de alimento, de óleo, matéria-prima para cosméticos, sua carapaça como bacia, e sua pele para fazer tamborins (SALERA JUNIOR, 2005).

A carapaça, achatada dorso-ventralmente, apresenta-se de coloração marrom ou verde oliva, mãos e pés espalmados com membrana interdigital muito

desenvolvida. Os membros são curtos e potentes, sendo o torácico com cinco unhas e o pelvino com quatro. A cabeça é achatada e pequena, nela localizam-se os olhos, as narinas, na parte superior do focinho, e a boca. A tartaruga-da-amazônia é o maior Testudine de água doce da América do Sul, podendo chegar a medir 75 a 107 cm de comprimento, sendo em média $91 \pm 22,627$ cm () por 50 a 75 cm de largura, com média de $62,5 \pm 17,677$ cm pesando cerca de 60 kg (SMITH, 1979; ALHO *et al.*, 1979).

Para Luz *et al.* (2003) e Fachín-Terán *et al.* (2003), o manejo dessa espécie de Testudine já trouxe benefícios para a conservação e desenvolvimento de regiões utilizadoras de recursos naturais. No Brasil, percebe-se que ainda há pouco desenvolvimento referente a esse tipo de atividade, principalmente pela falta de pesquisas que possam oferecer subsídios científicos para tecnologias adequadas e eficientes de manejo.

Este cenário está mudando, na medida em que já se consome a carne desse réptil em restaurantes de grandes cidades, onde é vendido como iguaria. Cabe destacar que sua carne é saudável ao consumo humano por apresentar baixos teores de gordura e colesterol, desejáveis a uma vida saudável. E sua gordura é aproveitada como matéria prima na indústria de cosméticos. Assim, criatórios comerciais deste cágado espalham-se pelas bacias Araguaia – Tocantins e Amazônica, áreas em que a legislação permite sua criação, por ser a área de ocorrência da espécie (LUZ *et al.*, 2003; GASPAR; RANGEL FILHO, 2001).

1.5 Esqueleto dos testudines

Assim como em outros vertebrados, o esqueleto dos Testudines é um arcabouço de ossos e cartilagens articulados, com a função de oferecer aos músculos alavancas para os movimentos do corpo, além de suportar os tecidos envoltivos, proteger órgãos e armazenar depósitos de sais que o organismo retira quando necessário (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006; MACKIE *et al.*, 2008).

Segundo Rieppel (1993a) e Sheil (2003), o esqueleto dos Testudines se divide anatomicamente em: esqueleto cranial, composto pelo osso do crânio; esqueleto axial, composto pelos ossos da coluna vertebral, carapaça e plastrão e o

esqueleto apendicular, formado pelos ossos das cinturas peitoral e pelvina e pelos ossos dos membros torácicos e pelvins.

O esqueleto dos vertebrados é composto de cartilagem e osso e apresentam variação na morfologia e arquitetura tecidual. Entretanto, a despeito desta diversidade, eles apresentam algumas características embrionárias comuns. Todos os tecidos esqueléticos provêm de células com morfologia mesenquimal, mas as origens do mesênquima é o produto de células de três linhagens embrionárias distintas. Células da crista neural formam o esqueleto craniofacial, o mesoderma paraxial deriva o esqueleto axial, e as células do mesoderma lateral formam os membros (OLSEN et al., 2000).

No início do desenvolvimento do esqueleto, células mesenquimais começam a condensar em locais que eventualmente serão ocupados por elementos do esqueleto. Estas condensações mesenquimais formam os primeiros moldes do esqueleto. Pouco tempo depois, células dentro destas condensações diferenciam em condroblasto, formando os modelos cartilagosos do esqueleto. Em tais modelos, uma seqüência de modificações regulares assinala o aparecimento de centros de ossificação. No local onde está para se formar cartilagem, as células mesenquimais isoladas retraem seus prolongamentos, arredondam-se e se agrupam em massas densas chamadas de centro de condificação (OLSEN et al., 2000; MACKIE, et al., 2008). À medida que este processo progride, os condroblastos ficam aprisionados na sua própria matriz e são chamados condrócitos. Estes sintetizam e renovam as macromoléculas da matriz cartilaginosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; PROCHEL, 2006).

A formação do osso durante o desenvolvimento embrionário pode ocorrer de duas maneiras: ossificação endocondral e ossificação intramembranosa. O osso formado por qualquer destes dois processos é idêntico histologicamente (GARTINER; HIATT, 1999; WAGNER; KARSENTY, 2001).

A maioria dos ossos longos e curtos do corpo se desenvolve por ossificação endocondral. Este tipo de ossificação consiste essencialmente em dois processos: 1) a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa, sua mineralização e a morte dos condrócitos. 2) invasão dos capilares vindos do tecido conjuntivo adjacente. Essas células diferenciam-se em

osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada. Os tabiques de matriz calcificada da cartilagem servem de ponto de apoio à ossificação (WAGNER; KARSENTY, 2001). Este processo se inicia precocemente no embrião, continuando após o nascimento, cada vez com mais cartilagem sendo substituída por osso.

Por outro lado, os ossos superficiais do crânio, ossos costais e ossos do plastrão, envolvem a mineralização direta da membrana de tecido conjuntivo, ricamente vascularizado. O local da membrana conjuntiva, onde a ossificação começa, chama-se centro de ossificação primária. O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimatosas que se transformam em grupos de osteoblastos. Estes sintetizam o osteóide, que logo se mineraliza. Como vários desses grupos surgem quase simultaneamente no centro de ossificação, há confluência das traves ósseas, dando ao osso um aspecto esponjoso. Os vários centros de ossificação crescem radialmente, acabando por substituir a membrana conjuntiva preexistente (OLSEN et al., 2000, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Um evento comum a muitas células mesenquimais precursoras de elementos esqueléticos é sua migração ou deslocamento relativo de seu local de origem para a área em que o osso vai se formar e a diferenciação das células mesenquimais em cartilagem ou osso seguem o mesmo curso, independente da área do corpo em que o processo possa ocorrer e em períodos temporais específicos (NAH et al., 2000).

1.6 Técnica de diafanização e coloração de ossos e cartilagens

Segundo Davis e Gore (1936), a necessidade da análise do esqueleto de embriões e pequenos vertebrados levou ao desenvolvimento de algumas técnicas, tendo sido Schultze em 1897 quem formulou, pela primeira vez, uma técnica de diafanização de embriões humanos utilizando hidróxido de potássio e glicerina. A diafanização é uma técnica que confere transparência aos tecidos, resultando na visualização do esqueleto com sua cobertura muscular.

Ao longo do século XX vinte esta técnica foi modificada por diferentes pesquisadores e uma importante conquista foi realizada por Lundvall em 1905 ao introduzir o uso da alizarina para colorir os ossos.

Apesar do emprego de diferentes corantes, a utilização da alizarina tornou-se universal devido a afinidade que os sais de cálcio têm por este corante sintético, e assim os ossos são tingidos. Moriguchi et al. (2003) elucidaram o mecanismo de adsorção na coloração do osso com alizarina, por microespectroscopia, e comprovaram sua eficácia pela detecção de depósitos de cálcio na reação de coloração.

De acordo com Mcleod (2005), esse corante é um valioso meio de observação do processo de osteogênese. Para Souza (2002), o estudo de larvas e embriões por meio desta técnica mostra-se muito adequada, possibilitando os estudos ontogênicos como a determinação do período de tempo e dos locais de ossificação de cada osso individualmente.

As técnicas usuais de coloração diferencial de osso e cartilagem de pequenos vertebrados, com alizarina red S e alcian blue, respectivamente, seguidos de diafanização em solução de KOH e glicerina, são muito utilizadas. Souza (2002) indica essas técnicas para observar ossificação diferencial (membranosa e endocondral), identificar a presença de centros de ossificação e determinação etária, devido a coloração vermelha do osso pelo corante alizarina e da coloração de azul da cartilagem, baseado na afinidade deste último pelos polissacarídeos sulfatados da matriz cartilaginosa (MAHECHA; OLIVEIRA, 1994).

Existem numerosos trabalhos que descrevem a seqüência de formação óssea com esses métodos de coloração, como nas espécies *Chelydra serpentina* (SHEIL e GRENNBAUM, 2005), *Apalone spinifera* (SHEIL, 2003), *Trachemys scripta* (GILBERT et al., 2001), *Alligator mississippiensis* (RIEPPEL, 1993b), *Chamaeleo hoehnelii* (RIEPPEL, 1993c), *Gehyra oceânica* (RIEPPEL, 1994), *Discoglossus sardus* (PUGENER; MAGLIA, 1997), *Leptodactylus chaquensis* (PEROTTI, 2001). Esses poderão fornecer dados comparativos úteis para esclarecer a colocação filogenética dos testudines, entre outros répteis e amniotas.

Diversos segmentos societários se ocupam dos trabalhos com este grupo de répteis em atividades de conservação, preservação, produção e pesquisa científica, utilizando-os como modelos experimentais ou bioindicadores (MADER, 2006). Nesse sentido, Bell et al. (2005) estudaram o desenvolvimento da *C. serpentina* em ambiente contaminado com derivados de petróleo para determinar a extensão e

severidade de deformidades nos embriões. Aliada a estas funções consideradas mais nobres vislumbra-se, em diversos países, a manutenção de Testudines límnicos como animais de estimação (MADER et al., 2006).

Por vezes observa-se um problema de grande relevância: O sistema esquelético, por ser um dos responsáveis pela locomoção, é vítima freqüente de lesões que podem causar deficiências. Podem-se encontrar cascos de animais desprovidos de integridade física por trauma, gerando fissuras, fraturas ou mesmo a perda de determinados segmentos. Os tratamentos convencionais para estes problemas clínicos dependem de um conhecimento amplo da biologia dessas espécies.

A preocupação com estudos sobre o sistema esquelético tem ultrapassado as questões meramente acadêmicas, entremeando-se pelas mais variadas áreas do conhecimento. Apesar do fascínio exercido por tais estruturas, ainda não se pode afirmar serem estas totalmente conhecidas.

REFERÊNCIAS

ALHO, C. J. R.; CARVALHO, A. G.; PÁDUA, L. F. M. 1979. Ecologia da tartaruga da Amazônia e avaliação de seu manejo na Reserva Biológica de Trombetas. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 38, p. 29-47, 1979.

ALIBARDI, L.; THOMPSON, M. Epidermal differentiation during carapace and plastron formation in the embryonic turtle *Emydura macquarii*. **Journal of Anatomy**, London, v. 194, p. 531-545, 1999.

BATAUS, Y. S. L. **Estimativa de parâmetros populacionais de Podocnemis expansa (Schweigger, 1812) no rio Crixás-açu (GO) a partir de dados biométricos**. 1998. 58f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, p. 457-465, 2006.

BUJES, C. S.; VERRASTRO, L. Supernumerary epidermal shields and carapace variation in Orbigny's slider turtles, *Trachemys dorbigni* (Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 24, p. 666-672, 2007.

CAGLE F. R. The life history of the slider turtle, *Pseudemys scripta troostii* (Holbrook). **Ecological Monographs**, Lawrence, v. 20, n.1, p. 31-54, 1950.

CLARK, D. B.; GIBBONS, J. W. Dietary shift in the *Pseudemys scripta* (Schoepff) from youth to maturity. **Copeia**, Lawrence, v. 4, p. 704-706, 1969.

CONGDON, J. D.; SELS R. C. V. L. Growth and body size in Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*): relationships to reproduction. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 69, p. 239-245, 1991.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DUK, P. P. V. Hard-shelled eggs may need special care during incubation. **Turtles and Tortoises**, v. 5, p. 16-17, 1990.

ERNST, C. H. Sexual cycles and maturity of the turtle, *Chrysemys picta*. **The Biological Bulletin**, Massachusetts, v. 140, p. 191-200, 1971.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**. Washington: Smithsonian Institution Press. 1989. 313p.

EWERT, M. A. The embryo and its egg: development and natural history. In: HARLESS, M.; MORLOCK, H. **Turtles Perspectives and Research**. New York: John Wiley and Sons, 1979. p. 333-413.

FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C.; THORBJARNARSON, J. B. Estrutura populacional, razão sexual e abundância de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) na reserva de desenvolvimento sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Phyllomedusa**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 43-63, 2003.

FERREIRA JUNIOR, P. D. **Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá), na bacia do rio Araguaia**. 2003. 296f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. Departamento de Geologia, Ouro Preto, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GASPAR, A.; RANGEL FILHO, F. B. Utilização de carne de tartarugas da Amazônia (*Podocnemis expansa*), criadas em cativeiro, para consumo humano. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n. 89, p.73-78, 2001.

GIBBONS, J. W. **Reproductive potencial, activity, and cycles in the painted turtle, *Chrysemys picta***. Brooklyn: Ecology, 1968. p. 399-409.

GIBBONS, J. W. Ecology and population dynamics of the chicken turtle, *Deirochelys reticularia*. **Copeia**, Lawrence, v. 4, p. 669-676, 1969.

GIBBONS, J. W. Why do turtles live so long? **Bioscience**, Washington, v. 37, n. 4, p.262-269, 1987.

GILBERT, S. F., G. A. LOREDO, A. BRUKMAN, A. C. BURKE. Morphogenesis of the turtle shell: the development of novel structure in tetrapod evolution. **Evolution & Development**, Malden, v. 3, p.47–58, 2001.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. E. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 358-366.

IVERSON, J. B. Reproduction in freshwater and terrestrial turtles of north Florida. **Herpetologica**, Austin, v. 33, n. 2, p. 205-212, 1977.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 104-128.

LACHER JUNIOR., T. E.; ALHO, C. J. R.; PEREIRA, I. G. T. The relation between cloacal temperature and ambient temperature in five species of brazilian turtles. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 563-566, 1986.

LUNDVALL, H. Weiteres uber demonstration embryonaler skelette. **Anatomischer Anzeiger**, Jena, v. 27, p. 520-525, 1905.

LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; FERNANDES, E. S. PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N.; I. J. Rendimento e composição química de carcaça da tartaruga-da- Amazônia (*Podocnemis expansa*) em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n. 1, p.1-9, 2003.

MACKIE, E. J.; AHMED, Y. A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K. S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, Pergamon, v. 40, p. 46-62, 2008.

MADER, D. R.; BENNETT, R. A.; FUNK, R. S.; FITZGERALD, K. T.; VERA, R. HERNANDEZ-DIVERS, S. J. Surgery In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006.

MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. Técnica modificada de diafanização e coloração diferencial de cartilagem e osso em pequenos vertebrados. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 204-207, 1994.

MALLMANN, M.T.O. **Influência da temperatura de incubação na determinação sexual em *Geochelone carbonaria* (Spix,1824) (Reptilia, Testudines, Testudinidae)**. 1994. 52f. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

MALVASIO, A. **Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER,1812), *Podocnemis unifilis* (TROSCHER,1848) e *P. sextuberculata* (CORNALIA, 1849) (Testudines, Pelomedusidae)**. 2001. 199f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MALVASIO, A.; SOUZA, A. M.; FERREIRA JUNIOR, P. D.; REIS, E. S.; SAMPAIO, F. A. A. Temperatura de incubação dos ovos e granulometria dos sedimentos das covas relacionadas a determinação sexual em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Instituto Pau Brasil de História Natural**, São Paulo, v. 05, p. 11-25, 2002a.

MCLEOD, M. J. Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. **Teratology**. New York, v. 22, P. 299-301, 2005.

MEDEM, F. Recomendaciones respecto a contar el escamado y tomar las dimensiones de nidos, huevos y ejemplares de los crocodylia e eestudines. **Lozania**, Bogota, v. 20, p. 1-17, 1976.

MOLINA, F. B. O comportamento reprodutivo de quelônios. **Biotemas**, Florianopolis, v.5, p. 61-70, 1992.

MOLINA, F.B. **Observações sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835) em cativeiro (Reptilia, estuidines, Emydidae).** 1995. 307f. Tese (Doutoramento em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MOLINA, F.B. Mating behavior of captive Geoffroy's side-necked turtles, *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). **Herpetological Natural History**, Stanford, v. 4, p. 155-160, 1996.

MORIGUCHI T, YANO K, NAKAGAWA S, KAJI F. Elucidation of adsorption mechanism of bonestaining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 260, p. 19–25, 2003.

MYERS, E. M.; JANZEN, F. J.; ADAMS, D. C.; TUCKER, J. K. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution; International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v. 60, n. 3, p. 563–572, 2006.

NAH, H. D.; PACIFICI, M. ; GERSTENFELD, L. C.; ADAMS, S. L.; KIRSCH, T. Transient Chondrogenic Phase in the Intramembranous Pathway During Normal Skeletal Development. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 15, n. 3, p. 522-533, 2000.

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 Zoologia**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 201-204, 2002.

OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. Bone development. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p.191–220, 2000.

PACKARD, M. J.; PACKARD, G. C.; BOARDMAN, T. J. Structure of eggshells and water relations of reptilian eggs. **Herpetologica**, Austin, v. 38, n.1, p. 136-155, 1982.

PEROTTI, M. G. Development of *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). **Herpetologica**, Austin, v. 57, n. 3, p. 318-335, 2001.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B, **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003.

PRITCHARD, P. C. H. **Encyclopedia of turtles**. New Jersey: Neptune, 1979.

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

PROCHEL, J. Early skeletal development in *Talpa europaea*, the common European mole. **Zoological Science**, Tokyo, v. 23, p.427–434, 2006.

PUGENER, L. A.; MAGLIA, A. M. Osteology and skeletal development of *Discoglossus sardus* (Anura, Discoglossidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 233, n. 3, p. 267-286, 1997.

RIBAS, E. R.; FILHO, E. L. A. M, Distribuição e habitat das tartarugas de água-doce (testudines, chelidae) do estado do Paraná, Brasil. **Biociências**. Maceio, v.10, n. 2, p. 15-32, 2002.

RIEPEL, O.; REISZ, R. R. The Origin and Early Evolution of Turtles. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo alto, v. 30, p. 1-22, 1999.

RIEPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993a.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. V. patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* Daudin (Reptilia, Crocodylia). **Journal of Zoology**, London, v. 109, p. 301-3251, 1993b.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. 2. *Chamaeleo hoehnelii* (Squamata, Chamaeleoninae), with comments on the homology of carpal and tarsal bones. **Herpetologica**, Austin, v. 49, n. 1, p. 66-78, 1993c.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles - patterns of ossification in the limb skeleton of *Gehyra oceanica* (Lesson) and *Lepidodactylus lugubris* (Dumeril and Bibron). **Annales des Sciences Naturelles-zoologie et Biologie Animale**, Paris, v. 15, n. 2, p. 83-91, 1994.

SALERA JUNIOR, G. **Avaliação da biologia reprodutiva, predação natural e importância social em quelônios com ocorrência na bacia do Araguaia**. 2005. 191f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Fundação Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SANTOS, E. **Anfíbios e répteis do Brasil (vida e costumes)**. 4. ed. Ver. E aum. Villa Rica: Editora, 1994.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista brasileira de répteis**. 2005. disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso em: 10 dez. 2007.

SCHULTZE, O. Über herstellung und conservirung durchsichtiger embryoens suen stadium der skeletbildung. **Anatomischer Anzeiger**, Deerfield Beach, v. 12, 1897.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235-267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p. 42-78, 2003.

SHINE, R.; IVERSON, J. B. Patterns of survival, growth and maturation in turtles. **Oikos**, Buenos Aires, v. 72, p. 343-348, 1995.

SMITH, N.J.H. Quelônios aquáticos da Amazônia: um recurso ameaçado. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 9, n. 1, p. 87-97, 1979.

SPOTILA, J. R.; STANDORA, E. A. Sex determination in the desert tortoise: a conservative management strategy is needed. **Herpetologica**, Austin, v. 42, n. 1, p. 67-72, 1986.

SOARES, M. F. G. S. **Distribuição, mortalidade e caça de *Podocnemis expansa* (Testudines: Pelomedusidae) no rio Guaporé Manaus**. 2000. 54f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 2000.

SOUZA, R.A. M. **Comparação de diferentes protocolos terapêuticos na cicatrização de carapaça de tigres-d'água (*trachemys* sp.)**. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOUZA, A. M. R. Diafanização. In: Auricchio, P.; Salomão, M. G. **Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos**. 2. ed. Arujá: editora, 2002. cap. 7, p. 219-226.

VALENZUELA, N. Maternal effects on life-history traits in the Amazonian giant river turtle *Podocnemis expansa*. **Journal of Herpetology**, Athens, v. 35, n. 3, p. 368-378, 2001.

VOGT, R. C. Temperature controlled sex determination as a tool for turtle conservation. **Chelonian Conservation and Biology**, Lunenburgv, v. 1, p. 159-162, 1994.

WAGNER, E. F.; KARSENTY, G. Genetic control of skeletal development. **Genetics Development**, New York, v. 11, p. 527–532, 2001.

CAPÍTULO 2 – ONTOGENIA DOS OSSOS DO CRÂNIO EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO - O cágado *Podocnemis expansa* está distribuído pela bacia amazônica e ocorre em quase todos os seus afluentes. O esqueleto dos vertebrados é composto de cartilagem e osso e representa o produto de células de três linhagens embrionárias distintas. O crânio é formado por células da crista neural. O conhecimento do critério biológico para a seqüência de formação óssea é de suma importância para o entendimento da ontogenia. Assim, o propósito do presente estudo foi estabelecer etapas normais da formação da seqüência de ossificação dos elementos ósseos do crânio em *P. expansa*, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal. Coletaram-se embriões a partir do 18º dia de incubação natural. Efetuou-se morfometria e os embriões foram submetidos à técnica de diafanização e coloração dos ossos. Neurocrânio: no estágio 19 o basisfenóide e o basioccipital apresentam centro de ossificação; no estágio 20 o supra-occipital e o opistótico, no estágio 21 o exoccipital e somente no estágio 24 o proótico. Dermatocrânio: o esquamosal, o pterigóide e a maxila são os primeiros elementos a iniciar o processo de ossificação, isso ocorre no estágio 16. Mas a maioria desses elementos ósseos apresenta centros de ossificação no estágio 17, são eles: frontal, jugal, pós-orbital, parietal, pré-maxila, pré-frontal, seguido do palatino e quadradojugal no estágio 19 e por último o vômer no estágio 25. O osso quadrado do esplancnocrânio, no estágio 23. Ossificação da mandíbula e aparelho hióide: tanto o dentário, coronóide e o supra-angular apresentam centros de ossificação no estágio 16 e o corpo branquial I no estágio 17. A seqüência e a sincronização da ossificação em *P. expansa* exibem similaridades, bem como diferenças, quando comparada com outras espécies de Testudines. Fica evidente que mais estudos quantitativos são necessários para documentar a variabilidade natural de formação dos ossos.

Palavras-chave: Répteis; Podocnemididae; Alizarina; Ossificação

**BONE ONTOGENY OF THE CRANIUM OF THE GIANT AMAZON RIVER TURTLE
Podocnemis expansa SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)**

ABSTRACT - The freshwater turtle *Podocnemis expansa* is found all over the Amazon basin and appears in almost all of its tributaries. The vertebrate skeleton is composed of cartilage and bone and represents the cell product of three different embryonic lineages. The cranium is formed by cells of the neural crest. Knowledge of the biological criterion for the sequence of bone formation is of highest importance for the understanding of ontogeny. Thus, the purpose of the present study was to establish normal stages of the formation and ossification sequence of the bony elements of the cranium in *P. expansa*, in the different stages of pre and post natal development. Embryos and nestlings were collected as from the 18th day of natural incubation. Morphometrics occurred and the embryos were submitted to the diaphanous (clearing) technique and coloring of the bones. Neurocranium: in stage 19 the basisphenoid and basioccipital present the ossification center; in stage 20 the supraoccipital and opisthotic, in stage 21 the exoccipital and only in stage 24 the prootic. Dermatocranium: the squamosal, pterygoid and maxilla are the first elements to begin the ossification process, which occurs in stage 16. But most of these bone elements present ossification centers in stage 17, they are: frontal, jugal, postorbital, parietal, premaxilla, prefrontal, followed by the palatine and quadratojugal in stage 19 and last of all the vomer in stage 25. The esplanocranium quadrate, in stage 23. Ossification of the mandible and hyoid apparatus: as much the dentary, coronoid and the surangular present ossification centers in stage 16 and the branchial body I in stage 17. The sequence and synchronization of the ossification in *P. expansa* show similarities, as well as differences, when compared with other chelonian species. It is evident that more quantitative studies are necessary to document the natural variability of formation of the bones.

Key words: Reptile; Podocnemididae; Alizarin; Ossification

INTRODUÇÃO

O esqueleto dos vertebrados é composto de cartilagem e osso e representa o produto de células de três linhagens embrionárias distintas. O crânio é formado por células da crista neural (OLSEN et al., 2000, CLARK et al., 2001).

As células dessa linhagem migram para onde os elementos do esqueleto se desenvolverão, formando-se condensações características de células mesenquimais, e diferenciam-se em osteoblastos ou condrócitos. Em certas regiões do crânio, a diferenciação em osteoblastos produz diretamente ossos membranosos, enquanto que em outros a diferenciação em condrócitos produz modelos de cartilagem dos futuros ossos. Estes modelos de cartilagem subsequente são substituídos por osso pelo processo de ossificação endocondral (OLSEN et al., 2000).

Para os elementos ósseos do crânio, vários genes foram identificados como reguladores de diferenciação e migração de células da crista neural (BRONNER-FRASER, 1994). Isso contribui com uma variedade de tecidos, incluindo cartilagem e osso. Este processo é caracterizado por mudanças temporais em padrões determinados por uma expressão gênica (NAH et al., 2000).

Segundo Hildebrand e Goslow (2006), o esqueleto do crânio é de grande importância para a filogenia e sistemática em todos os níveis, mas é particularmente notável para estudo dos táxons, das subclasses de répteis e da transição répteis a mamíferos. Durante a evolução, ocorreu uma variação considerável na região temporal dos répteis. Os répteis de tronco primitivo, representados pelos cotilossauros dos períodos Carbonífero e Permiano, não possuíam nenhuma abertura temporal especial no crânio. Entre os répteis vivos, a condição sólida do crânio sem aberturas – anapsida é exclusivo das tartarugas.

Alguns pesquisadores já estudaram, em Testudines, a sequência de ossificação dos elementos ósseos do crânio, como nas espécies *Chelydra serpentina* (RIEPEL, 1993), *Apalone spinifera* (SHEIL, 2003) e *Macrochelys temminckii* (SHEIL, 2005). Porém, esse estudo não foi realizado em *P. expansa*.

Essa espécie, popularmente conhecida como tartaruga-da-amazônia, é um Testudine da fauna brasileira e um dos maiores de água doce da América do Sul (SOUZA, 2004).

O conhecimento do critério biológico para a seqüência de formação óssea em local e tempo previsível é de suma importância, nas atividades de conservação, na preservação, como bioindicadores, na produção e também em pesquisas científicas (BELL et al., 2006, GRAY et al., 1996, MADER et al., 2006 e SOUZA, 2006). A presente pesquisa tem como objetivo descrever a seqüência de formação dos elementos ósseos, que compõem o crânio, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

62 embriões e 43 filhotes recém-nascidos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos no período de desova ocorrido em 2005 e 2006, na área de reprodução protegida pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios - RAN, nas praias do Rio Araguaia, em Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13° 20' 38,7" S e 50° 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN.

Amostras de ovos foram coletadas aleatoriamente, de ninhos escolhidos ao acaso, até a eclosão. Os filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos, com temperatura em torno de 27 °C. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni et al. (1990).

Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se morfometria (Quadro 1 e 2) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta) precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, comprimento crânio-caudal, altura e peso corporal, segundo Malvásio et al. (2002) e Dani et al. (1990).

Após esse processo, as amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red S e da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e

Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem o crânio (Figuras 6 e 7), foi analisada em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus) e câmera fotográfica digital (fe100, Olympus 6.0). Ainda, cinco desenhos representativos foram confeccionados, utilizando-se para tal seis esqueletos de *P. expansa* adultos do acervo do LAPAS. (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5).

RESULTADOS

Osteologia do crânio de *Podocnemis expansa* adulto.

Neurocrânio

Basisfenóide (Bas): articula-se rostralmente com a margem caudal do osso pterigóide e caudalmente com a margem rostral do basioccipital (Figura 1C).

Supra-occipital (So): é um osso impar, mediano, que forma a superfície caudodorsal da calvária do crânio. Ele sustenta a crista supra-occipital mediana que se projeta caudalmente além do processo paraoccipital dos ossos esquamosal e opistótico. A margem lateral do supra-occipital projeta-se ventrolateralmente e forma a superfície caudomedial da fossa temporal. Lateralmente, o supra-occipital articula-se com o proótico e com o opistótico e dorsalmente com a margem medial do parietal. O supra-occipital forma a margem dorsal do forame magno (Figura 1D).

Basioccipital (Ba): aparece como um único elemento mediano. Sustenta um proeminente processo ventromedial que forma o terceiro côndilo occipital ventral; a margem dorsal do basioccipital separa o exoccipital medialmente e forma a margem ventral do forame magno. Rostralmente articula-se com a margem caudal do basisfenóide. A superfície dorsal do basioccipital articula-se com a margem ventrolateral do exoccipital. A superfície dorsal do basioccipital forma o assoalho caudal da cavidade craniana (Figura 1C).

Opistótico (Op): A margem rostral de cada opistótico é irregular e articula-se com a margem caudal do proótico. A margem medial de cada um se articula com a margem lateral do supra-occipital. Lateralmente, cada opistótico se articula amplamente com a margem medial do quadrado e do esquamosal (Figura 1D).

Exoccipital (Ex): São ossos pares que formam a margem ventrolateral do forame magno; contribui na formação dorsolateral do côndilo occipital. Cada exoccipital articula-se com a margem caudolateral do supra-occipital e lateralmente com a margem caudomedial do opistótico. Articula-se também ventralmente e medialmente com o basioccipital (Figura 1D).

Proótico (Pr): Cada proótico é levemente côncavo dorsalmente e forma o assoalho rostral da fossa temporal. Medialmente, cada proótico articula-se com a margem lateral do parietal e com a margem rostrolateral do supra-occipital. Caudalmente articula-se com a margem rostral do opistótico e lateralmente com a margem dorsomedial do quadrado (Figura 1D).

Dermatocrânio

Frontal (Fr): Medialmente os frontais articulam-se entre si ao longo de todo o seu comprimento, articulam-se rostralmente com os pré-frontais, caudalmente com os parietais e caudolateralmente com os pós-orbitais. A margem rostrolateral de cada osso frontal é levemente côncava e forma a margem dorsomedial da órbita (Figuras 1 A e B).

Maxila (Ma): Possui uma superfície de trituração que se estende por todo comprimento da região ventral de cada elemento. Possui numerosos forames de tamanhos reduzidos que estão localizados na superfície facial e na superfície de trituração. Cada maxila articula-se com a margem caudolateral da pré-maxila. O processo pré-frontal de cada maxila é triangular e forma a margem rostroventral da órbita, articulando-se com a margem lateral do pré-frontal. Caudalmente, cada maxila articula-se amplamente com a margem rostral do osso jugal, caudoventralmente articula-se com a margem rostral do palatino (Figuras 1 A e B).

Jugal (Ju): Caudalmente, o jugal articula-se com a margem rostral do quadradojugal. A margem rostral de cada jugal articula-se com a margem

caudodorsal da maxila e forma a margem caudoventral da órbita. No interior da fossa orbital, o jugal é levemente côncavo e articula-se com a superfície mediocaudal da maxila. A margem dorsal do jugal articula-se com o pós-orbital e parietal. Um curto processo caudomedial do jugal articula-se com a superfície rostrodorsal do palatino e do pterigóide (Figuras 1 A e B).

Pós-orbital (Po): É um pequeno osso par. Cada pós-orbital articula-se lateralmente com a margem dorsal do jugal, medialmente com a margem caudolateral do frontal, e caudalmente com a margem rostrolateral do parietal. O pós-orbital articula-se com o pterigóide e com o palatino por uma expansão ventrocaudal. Forma a margem laterodorsal da órbita e a parede caudodorsal da fossa orbital (Figuras 1 A e B).

Parietal (Pa): É um elemento ósseo largo e par, que forma grande parte do teto do crânio. Articulam-se entre si medialmente ao longo de todo o seu comprimento. Caudalmente, o parietal articula-se com o supra-occipital. Rostromedialmente com o frontal, rostrolateralmente com o pós-orbital e o jugal. Ventrolateralmente, o parietal se articula com o proótico e lateralmente com a margem medial do quadradojugal (Figuras 1 A e B).

Esquamosal (Es): Na vista dorsal, o esquamosal forma articulação com a margem lateral do opistótico. Na vista lateral, a margem rostral de cada esquamosal articula-se com o quadradojugal e com a margem caudomedial do osso quadrado (Figuras 1 A e B).

Palatino (Pal): É um osso par. Suas metades rostrais articulam-se entre si medialmente. As metades caudais são separadas pelo vômer, medialmente. Cada palatino se articula com a margem caudoventral da maxila, com a margem rostral do pterigóide caudalmente e com o jugal lateralmente (Figuras 1 C). Na fossa orbital, um processo dorsal do palatino articula-se com o pós-orbital.

Pterigóide (Pt): É um osso amplo, com processos transversais. Rostralmente articula-se com a margem caudal do palatino e caudalmente com o basisfenóide. Rostrolateralmente, cada pterigóide sustenta um ramo rostral que se projeta dorsalmente e se articula com o jugal e com uma pequena parte da margem caudal do pós-orbital (Figuras 1C).

Pré-maxila (Prm): São dois ossos pequenos que se fundem medialmente. Articulam-se lateralmente com a maxila e formam a margem rostral do focinho. A

pré-maxila fundida sustenta uma parte da superfície de trituração de cada maxila (Figuras 1C).

Pré-frontal (Prf): Articulam-se medialmente entre si, ao longo de todo o seu comprimento, formam o teto da cavidade nasal. As margens caudal, rostral e lateral são irregulares. O pré-frontal articula-se caudalmente com o frontal e lateralmente com a maxila. Lateralmente forma a margem rostródorsal da órbita (Figuras 1A e B).

Quadradojugal (Qj): Na vista dorsal, o quadradojugal forma a parede dorsolateral da fossa temporal. Na vista lateral, a margem caudal do quadradojugal articula-se com a margem rostral do esquamosal, rostralmente articula-se com a margem caudal do jugal e ventralmente com o quadrado (Figuras 1A e B).

Vômer (Vo): está localizado medialmente e separa caudalmente o palatino. Caudalmente se articula com pterigóide (Figura 1C).

Esplanocrânio

Quadrado (Qu): Ventralmente cada osso quadrado sustenta um côndilo mandibular, o qual se articula com a mandíbula. Na vista lateral, o osso quadrado forma grande parte da parede da cavidade timpânica. A porção rostromedial do quadrado segue em direção ao proótico, unindo-se ao mesmo. A margem caudal se articula com a margem rostral do esquamosal e caudomedialmente com o opistótico. Medialmente, cada quadrado se articula amplamente com o ramo caudal do pterigóide. Na vista lateral a margem dorsal do osso quadrado articula-se com a margem lateral do quadradojugal (Figuras 1A e B).

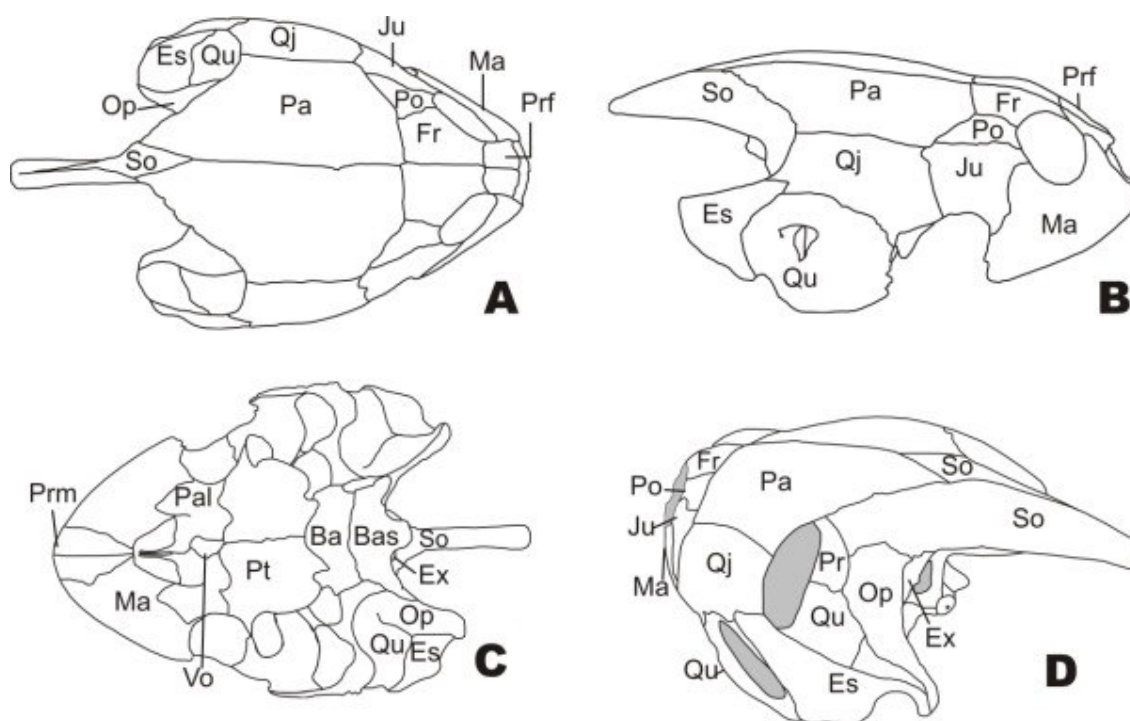


Figura 01: Desenho esquemático de crânio de *Podocnemis expansa*. (A) vista dorsal; (B) vista lateral; (C) vista ventral; (D) vista latero-caudal. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pós-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm pré-maxilar; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino, Vo, vômer; Pp, opistótico; Pr, proótico; Ex, exoccipital.

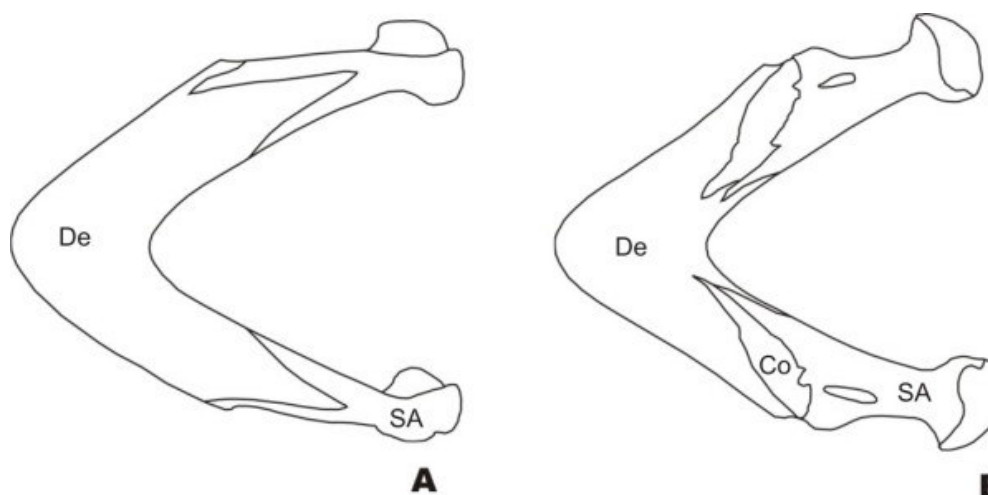


Figura 02: Desenho esquemático da mandíbula de *Podocnemis expansa*. (A), vista ventral da mandíbula; (B), vista dorsal da mandíbula. De, dentário; Co, coronóide; Sa supra-angular.

Mandíbula

A vista dorsal da mandíbula, em Testudines, normalmente possui formato de “V”. As duas metades da mandíbula são fundidas, não indicando nenhum limite entre elas e compreende (1) coronóide; (2) dentário, e (3) supra-angular.

Coronóide (Co): Constitui um elemento ósseo, situado dorsalmente, entre o dentário rostralmente e o supra-angular caudalmente. Medialmente, sua margem ventral contribui para a formação do sulco de Meckelii (Figuras 2A e B).

Dentário (De): Forma a maior parte das superfícies rostral, lateral e ventral da mandíbula. A margem caudolateral do dentário é irregular e lateralmente investe em direção as margens ventrais do coronóide e do supra-angular. A margem labial se estende por toda região lateral do dentário e é perfurada por inúmeros forames de tamanhos reduzidos. A margem dorsal da superfície lingual do dentário é proeminente e o sulco de Meckelii se estende por todo o comprimento da sua face medial (Figuras 2A e B).

Supra-angular (As): É um elemento ósseo estreito, que forma parte do terço caudal da mandíbula. O supra-angular forma a parede medial da área articular mandibular. Na vista lateral, a margem rostródorsal do supra-angular se articula com a margem caudolateral do coronóide e a margem rostrolateral investe para o dentário (Figuras 2A e B).

Aparelho hióide:

O corpo hióide, o processo lingual, o corno braquial I e o corno braquial II, formam o aparelho hióide de *P. expansa*. O corno braquial I é curvo dorsomedialmente e é mais longo do que o corno braquial II, este é o único elemento do aparelho hióide que se ossifica.

Seqüência de ossificação dos elementos ósseos do crânio de *P. expansa*

Neurocrânio

O basisfenóide e o basioccipital iniciam o processo de ossificação no estágio 19, em seqüência o supra-occipital e o opistótico no estágio 20, seguido pelo exoccipital no estágio 21 (Figuras 4C, 5C e 6E). O proótico é o último elemento do

neurocrânio a apresentar centro de ossificação e isso ocorre somente no estágio 24 (Figura 3F).

No estágio 22 o basioccipital e o basisfenóide possuem formato oval. O basisfenóide segue em direção a margem caudal do pterigóide e somente no estágio 23 ele se aproxima deste e segue em direção a margem cranial do basioccipital. Ainda nesse mesmo estágio o supra-occipital se aproxima dorsalmente da margem caudal dos parietais (Figuras 5 e 6).

O supra-occipital se aproxima do exoccipital, opistótico e do proótico no estágio 25. O opistótico se aproxima do exoccipital e do esquamosal e segue em direção ao proótico, também nesse estágio (Figuras 4D e 5D).

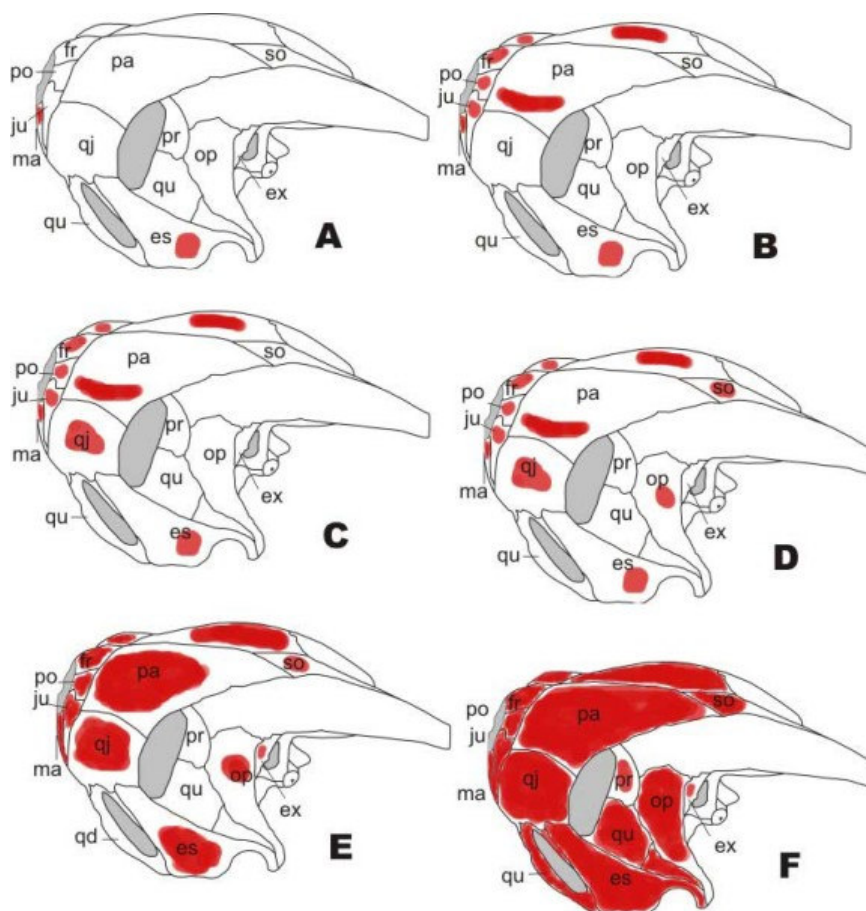


Figura 3: Desenho esquemático da seqüência de formação óssea do crânio de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 17; (C) estágio 19; (D) estágio 20; (E) estágio 21; (F) estágio 24. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pos-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm, pré-maxila; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino; Vo, vômer; Op, opistótico; Pr, proótico; Ex, exoccipital.

Dermatocrânio:

O esquamosal, o pterigóide e a maxila são os primeiros elementos do dermatocrânio a iniciar a ossificação, e isso ocorre no estágio 16 (Figuras 3A, 5A e 6A). Mas a maioria desses elementos ósseos apresenta centros de ossificação no estágio 17, são eles: frontal, jugal, pós-orbital, parietal, pré-maxila, pré-frontal (Figuras 3, 4 e 6), seguido do palatino e quadradojugal no estágio 19 e por último o vômer no estágio 25 (Figuras 5 e 6).

No estágio 22 o frontal segue em direção a margem rostral do parietal, aproxima-se do seu homônimo contralateral medialmente e da margem caudal do pré-frontal. A maxila ocupa a maior parte da margem ventral da órbita. O pterigóide já se aproxima do palatino rostralmente e, caudalmente, segue em direção do basisfenóide. O palatino segue em direção rostromedial, ficando próximo da maxila.

O frontal se aproxima do parietal contribuindo com a formação da fontanela no estágio 23. A maxila se aproxima da margem rostrolateral do palatino, e na vista lateral também se aproxima do pré-frontal. O jugal se aproxima da margem caudal da maxila, da margem lateral do pós-orbital e da margem rostral do parietal e ainda segue em direção do quadradojugal. O pós-orbital, por sua vez, se aproxima da margem caudolateral do frontal e da margem rostral do parietal. As duas partes dos parietais seguem em direção medial para posterior fusão, lateralmente se aproxima do quadradojugal e caudalmente do supra-occipital. Ainda no estágio 23 o esquamosal segue em direção do quadradojugal e o pterigóide se aproxima da margem caudal do basisfenóide (Figura 6).

No estágio 25 o frontal se aproxima do pré-frontal, o jugal se aproxima do pós-orbital, maxila, quadradojugal e do parietal. O esquamosal se aproxima do quadradojugal, quadrado e do opistótico. As porções direita e esquerda do pterigóide, da pré-maxila e do palatino se aproximam medialmente para posterior fusão. E, finalmente, o vômer apresenta centro de ossificação.

Esplacnocrânio:

No estágio 23, o osso quadrado já apresenta centro de ossificação e segue em direção do opistótico, esquamosal e quadradojugal. No estágio 24, o quadrado se aproxima do opistótico (Figuras 3F, 5D e 6H).

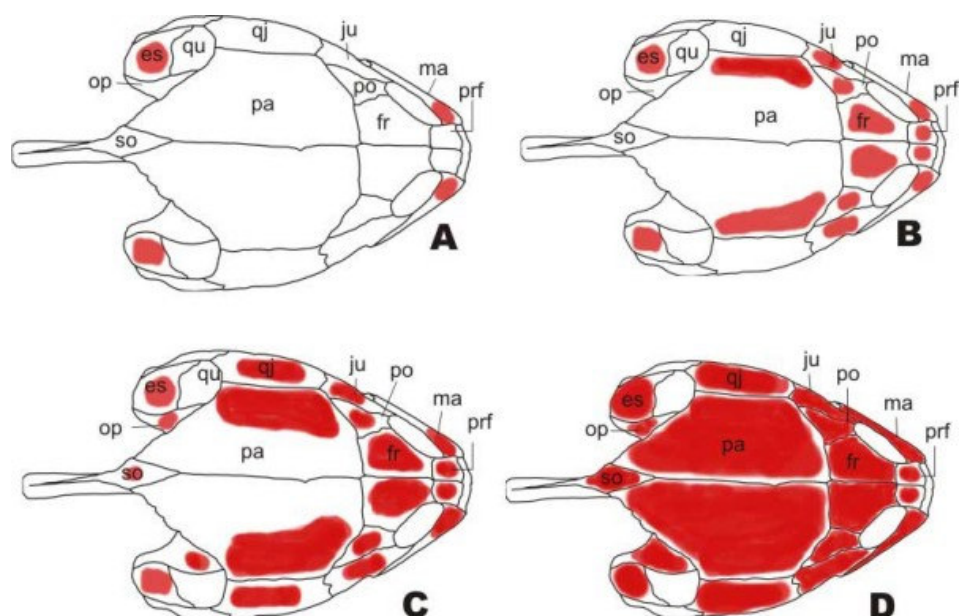


Figura 4: Desenho esquemático da sequência de formação óssea do crânio de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 19; (C) estágio 20; (D) estágio 24. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pos-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Op, opistótico.

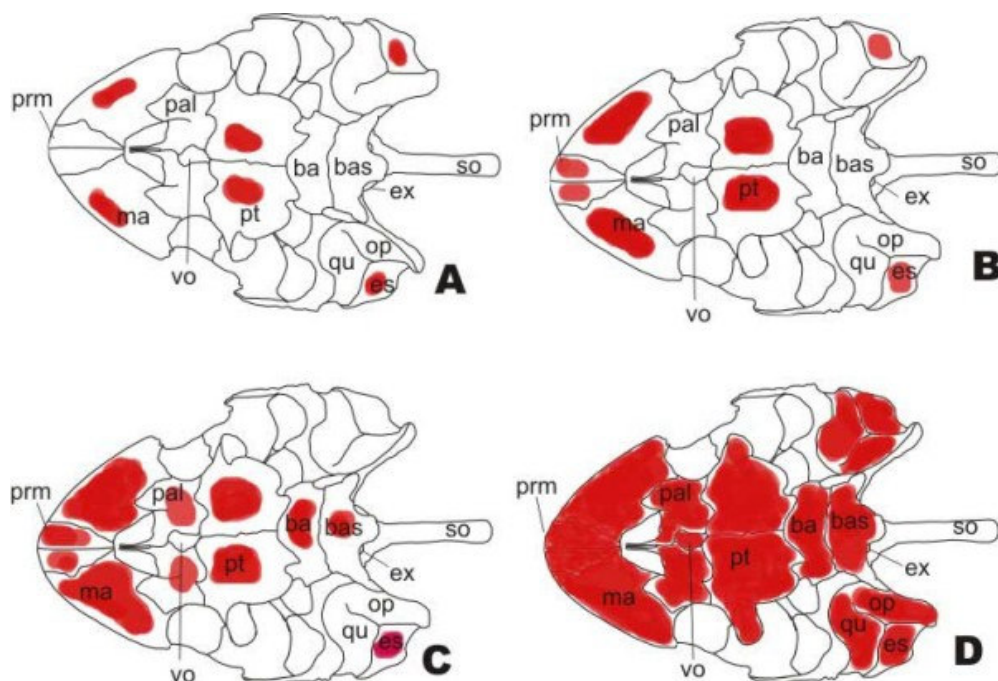


Figura 5: Desenho esquemático da sequência de formação óssea do crânio de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 19; (C) estágio 20; (D) estágio 24. Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm, pré-maxila; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino; Vo, vômer; Op, opistótico; Ex, exoccipital.

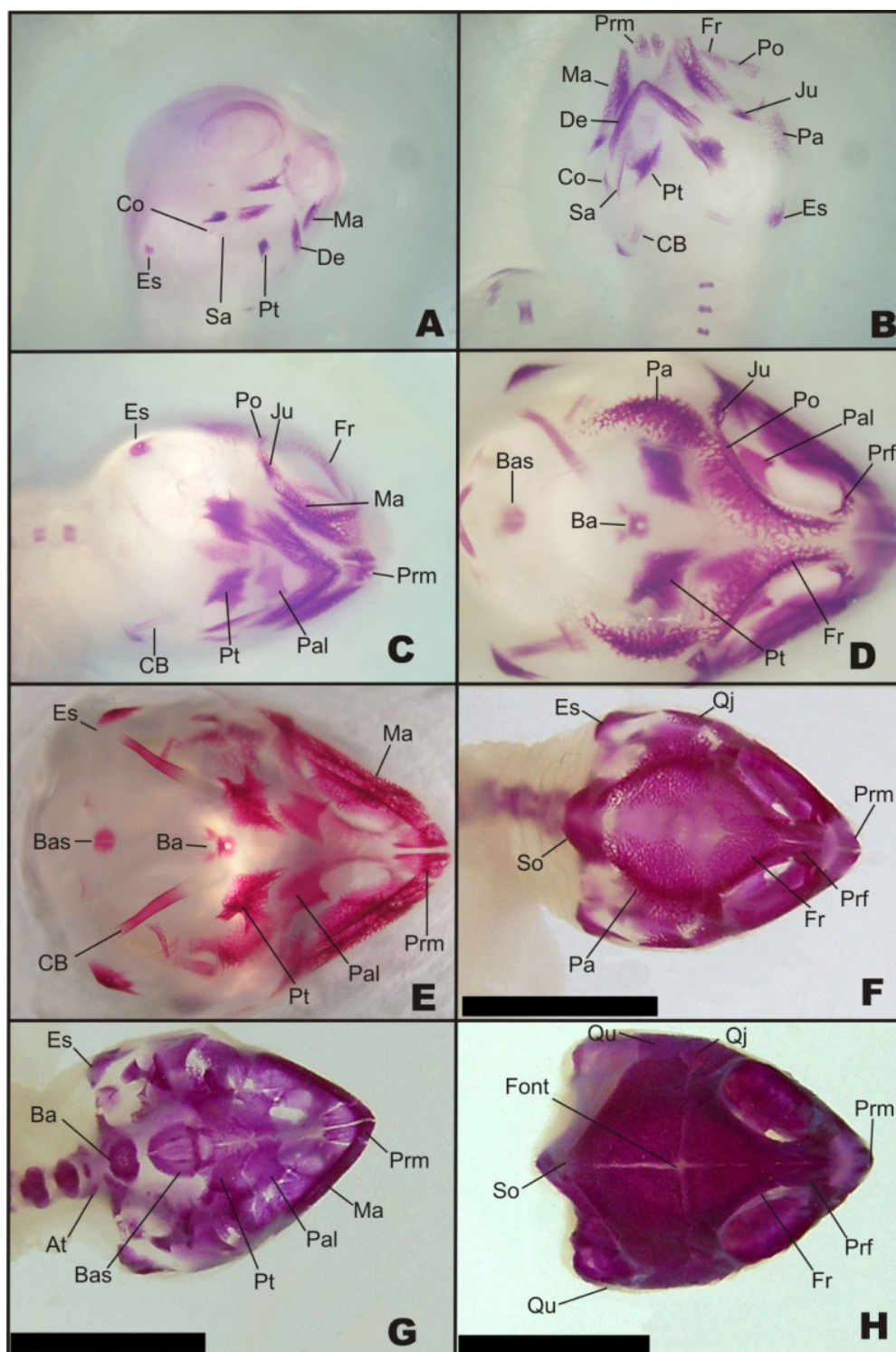


Figura 06: Fotografias de crânio de *Podocnemis expansa*. (A) vista ventral, estágio 16; (B) vista ventral, início do estágio 17; (C) vista ventral, final do estágio 17; (D) vista dorsal, estágio 19; (E) vista ventral, estágio 19; (F) vista ventral, estágio 23; (G) vista dorsal, estágio 23; (H) vista dorsal, estágio 24. Pa, parietal; Fr, frontal; Prf, pré-frontal; Po, pós-orbital; Ju, jugal; Ma, maxilar; Qj, quadradojugal; So, supra-occipital; Qu, quadrado; Es, esquamosal; Prm, pré-maxilar; Ba, basioccipital; Bas, basisfenóide; Pt, pterigóide; Pal, palatino, Vo, vômer; Op, opistótico; Pr, proótico; Ex, exoccipital, Sa, supra-angular.

Mandíbula e aparelho hióide

Tanto o dentário, coronóide e o supra-angular apresentam centros de ossificação no estágio 16, com maior retenção de corante no dentário, indicando que esse elemento é o primeiro a apresentar centros de ossificação (Figuras 6A, B e 7A). O dentário se aproxima do seu homônimo medialmente no estágio 19, começa a apresentar numerosos forames de tamanhos reduzidos e o supra-angular segue em direção a margem caudal do coronóide. No estágio 20, o dentário se aproxima da margem rostral do coronóide e o seu terço caudal investe na margem rostral do supra-angular (Figuras 7B, C e D).

O corpo braquial I do aparelho hióide começa a ossificar-se no final do estágio 17. No estágio 19 ele segue em direção da parte caudal do corpo hióide(Figuras 6B, D e E).

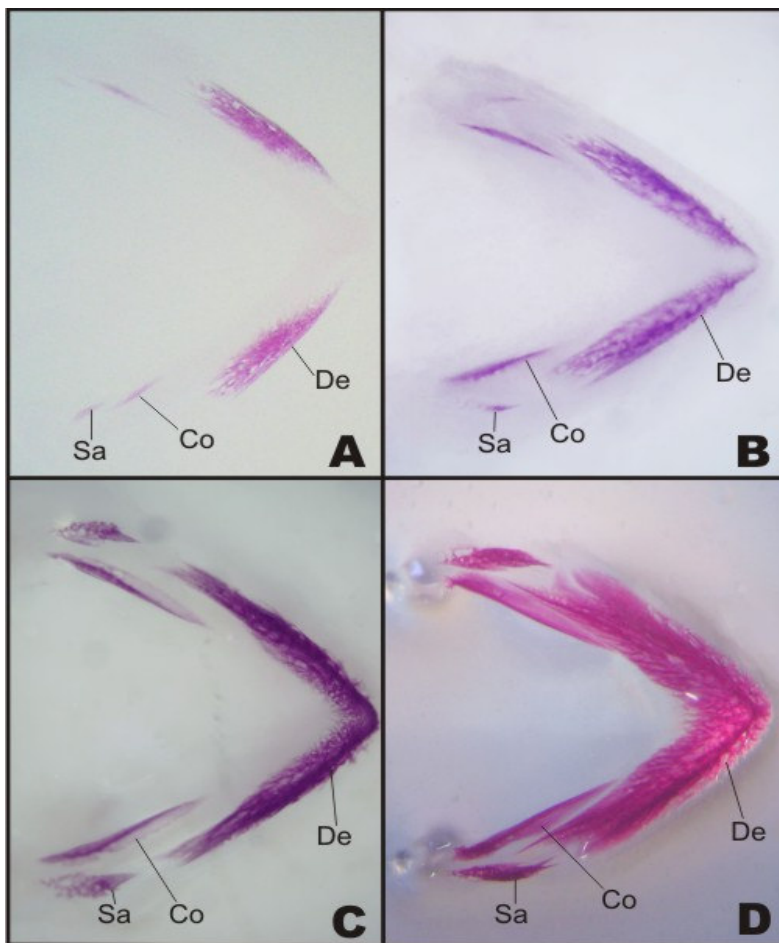


Figura 7: Fotografias de mandíbulas de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 17; (C) estágio 19; (D) estágio 20. De, dentário; Co, coronóide; Sa, supra-angular.

DISCUSSÃO

Neurocrânio

Em *Apalone spinifera*, os elementos do neurocrânio se ossificam entre os estágios 19 e 23 (Sheil, 2003), em *Macrochelys temminckii* entre os estágios 21 e 24 (SHEIL, 2005), em *Chelydra serpentina* Rieppel (1993) e Sheil e Greenbaum (2005) entre os estágios 21 e 23, o que demonstra ser este período de maior duração em *Podocnemis expansa*, já que o mesmo acontece entre os estágios 19 e 24.

Tanto em *C. serpentina*, *A. spinifera*, *M. temminckii*, quanto em *P. expansa*, a seqüência de formação dos elementos ósseos do neurocrânio diferem significativamente.

Em *Podocnemis expansa* o basisfenóide e o basioccipital são os primeiros elementos do neurocrânio a se ossificar. Em seguida, o supra-occipital e o opistótico, depois o exoccipital e por último o proótico. Para *C. serpentina*, Rieppel (1993) informou que a seqüência de ossificação desses elementos ocorre na seguinte ordem: basisfenóide que é seguido pelo exoccipital, basioccipital, supra-occipital e proótico e por último o opistótico. Ainda para *C. serpentina*, segundo Sheil e Greenbaum (2005), a ossificação do exoccipital levemente precede a ossificação do basisfenóide e o supra-occipital ossifica-se antes do proótico, o qual precede a ossificação do basioccipital.

Na espécie *M. temminckii* (SHEIL, 2005), o basisfenóide, exoccipital e proótico são os primeiros a apresentar centros de ossificação, seguido do basioccipital, depois o supra-occipital e por último o opistótico. Para Sheil (2003), em *A. spinifera*, o exoccipital e o basioccipital são os primeiros a apresentar centros de ossificação, seguido do basisfenóide e proótico, depois o opistótico e por último o supra-occipital.

Dermatocrânio

Sheil e Greenbaum (2005) sugeriram que os ossos do dermatocrânio fossem agrupados em: elementos do palato (pterigóide, vômer e palatino), arcada maxilar (pré-maxila, maxila, jugal, quadradojugal e esquamossal) e teto do crânio (pré-frontal, pós-orbital, frontal e parietal).

Em *C. serpentina* (RIEPPPEL, 1993), o pterigóide, vômer e palatino se ossificam entre os estágios 18 e 20. A ordem precisa de ossificação é: pterigóide>palatino=vômer. Esta seqüência sugere uma tendência de ossificação caudorostralmente para esses elementos palatais. Para *C. serpentina*, foi observada a mesma ordem de ossificação nestes elementos, mas com tempo diferente, de maneira que estes elementos se ossificam mais cedo (SHEIL e GREENBAUM, 2005). Já para Sheil (2003), em *A. spinifera*, foi observado basicamente a mesma ordem de ossificação nestes elementos, com o pterigóide e o palatino apresentando centros de ossificação no mesmo estágio, como segue: pterigóide=palatino>vômer. Para Sheil (2005), em *M. teminckii*, o pterigóide, o palatino e o vômer apresentam centros de ossificação no estágio 18, com o pterigóide mais adiantado, devido a maior retenção de corante alizarina.

Para *P. expansa*, nesses ossos palatais, ocorre evento semelhante ao da *A. spinifera*. Entretanto, difere na cronologia.

Em *C. serpentina*, Rieppel (1993) observou que os elementos da arcada maxilar se ossificam entre os estágios 18 e 22. Segundo Sheil e Greenbaum (2005), nessa mesma espécie, isso ocorreu entre estágios 19 e 21. Em *M. teminckii* entre os estágios 17 e 20 (SHEIL, 2005) e, para *A. spinifera*, entre os estágios 17 e 22 (SHEIL, 2003). Em *P. expansa*, com período de duração intermediário, a ossificação da arcada maxilar se deu entre os estágios 16 e 19.

A seqüência de ossificação, segundo Rieppel (1993) é: esquamosal>maxila=pré-maxila>jugal>quadradojugal. Este padrão sugere uma tendência de ossificação rostrocaudalmente para esses elementos. Para *M. teminckii* (SHEIL, 2005) a seqüência é: maxila> pré-maxila=jugal=esquamosal> quadradojugal. Para *A. spinifera* (SHEIL, 2003) a seqüência é: maxila=esquamosal> jugal>quadradojugal>pré-maxila. Para *P. expansa* a seqüência é: esquamosal= maxila=pré-maxila=jugal>quadradojugal. Embora estes elementos se ossifiquem mais rapidamente em *P. expansa*, a seqüência de ossificação observada está mais próxima da informada por Rieppel (1993). Assim, fica evidente que estudos mais quantitativos são necessários para documentar a variabilidade natural de formação dos ossos.

Em ambos os estudos com *C. serpentina*, elementos ósseos que formam o teto do crânio estão bem ossificados no final do estágio 21. A seqüência de ossificação, segundo Rieppel (1993) é: pós-orbital>parietal>pré-frontal=frontal e para Sheil e Greenbaum (2005): pré-frontal>frontal=pós-orbital>parietal. Os padrões de ossificação dos elementos do crânio de *C. serpentina*, propostos por Rieppel (1993) e Sheil e Greenbaum (2005), não são idênticos em todos os pontos observados, apesar de ser a mesma espécie.

Para *P. expansa* e *A. spinifera* (SHEIL, 2003), no estágio 19, todos esses elementos já apresentam retenção do corante e a seqüência ocorre assim: frontal=pós-orbital=parietal>pré-frontal e parietal>pré-frontal>frontal=pós-orbital, respectivamente. Para *M. teminckii* (SHEIL, 2005) todos esses elementos apresentam centro de ossificação no estágio 20 e a seqüência também difere das anteriores: pós-orbital>frontal=pré-frontal>parietal.

As diferenças são bem evidentes nos estudos até agora realizados. Destacam-se, neste sentido, as diferenças na cronologia e seqüência de ossificação entre alguns dos ossos que compõem o esqueleto do crânio de *P. expansa* e as espécies comparadas.

Esplancnocrânio, mandíbula e aparelho hióide

Em ambos os estudos com *C. serpentina* os elementos ósseos da mandíbula começam a se ossificar no final do estágio 21, mas em relação a outras unidades estruturais, parece haver uma grande variação na seqüência de ossificação destes elementos entre os estudos realizados. Rieppel (1993) identificou a seguinte seqüência de ossificação destes elementos: dentário>coronóide=supra-angular. Ossificação destes elementos foi seguida com a do quadrado no estágio subsequente.

Essencialmente, não há grandes diferenças entre ambos os estudos com *C. serpentina* Rieppel (1993) e Sheil e Greenbaum (2005), na seqüência e sincronização relativa de ossificação da mandíbula, e estes dados coincidem com os informados para *M. temimckii* (SHEIL, 2005), bem como para *P. expansa* e apresentam uma tendência geral de ossificação rostrocaudalmente. O mesmo não

ocorre com *A. spinifera*, (SHEIL, 2003), a cronologia e a seqüência de ossificação da mandíbula diferem: dentário>supra-angular>coronóide.

A seqüência do desenvolvimento ósseo durante a ontogenia varia grandemente entre essas espécies. Segundo Sahoo et al. (1998), a osteogênese, e talvez até certo ponto o padrão, é influenciado por condições ambientais. O tamanho e idade são, ambos, os parâmetros importantes para o padrão de formação do osso. Os quelônios da mesma idade podem estar em estágios de desenvolvimento diferente, e há variação significativa mesmo entre animais do mesmo tamanho (GILBERT et al., 2001).

Em *C. serpentina* (SHEIL; GREENBAUM, 2005), tanto o corno braquial I como o II do aparelho hióide se ossificam, seguindo a seqüência: corpo braquial I no estágio 20 e depois o corno braquial II no estágio 22. Processo diferente ocorre em *P. expansa* onde o corpo braquial II permanece em forma de cartilagem e apenas o corno braquial I se ossifica e isso ocorre no estágio 17. Em *C. serpentina* a ossificação inicia-se distalmente e prossegue proximalmente, já em *P. expansa* o centro de ossificação surge no centro do osso.

CONCLUSÕES

Os ossos do dermatocrânio e os ossos da mandíbula são os primeiros a iniciar o processo de ossificação: esquelom, pterigóide, maxila, dentário, coronóide, supra-angular e corpo branquial I no estágio 16. Frontal, jugal, pós-orbital, parietal, pré-maxila e pré-frontal no estágio 17. Palatino e quadradojugal no estágio 19.

Em seguida, os ossos do neurocrânio: basisfenóide e basioccipital no estágio 19, supra-occipital no estágio 20, exoccipital no estágio 21 e proótico no estágio 24.

Por último, o osso quadrado do esplancocrânio, no estágio 23.

REFERÊNCIAS

BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, p. 457-465, 2006.

BRONNER-FRASER M. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, p. 699-706, 1994.

CLARK, K.; BENDER, G.; MURRAY, B. P.; PANFILIO, K.; COOK, S.; DAVIS, R.; MURNEN, K.; TUAN, R. S.; GILBERT, S. F. Evidence for the Neural Crest Origin of Turtle Plastron Bones. **Gêneseis**, Paris, v. 31, p. 111-117, 2001.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*, pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

GILBERT, S. F., G. A. LOREDO, A. BRUKMAN, A. C. BURKE. Morphogenesis of the turtle shell: the development of novel structure in tetrapod evolution. **Evolution & Development**, Malden, v. 3, p.47–58, 2001.

GRAY, C.; BOYDE, A.; JONES, S. J. Topographically Induced Bone Formation In Vitro: Implications for Bone Implants and Bone Grafts. **Bone**, New York, v. 18, p. 115-123, 1996.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. E. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 358-366.

MADER, D. R.; BENNETT, R. A.; FUNK, R. S.; FITZGERALD, K. T.; VERA, R. HERNANDEZ-DIVERS, S. J. Surgery In: MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. 2. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006.

MALVÁSIO, A.; SOUZA, A.M.; GOMES, N.; SAMPAIO, F.A. A.; MOLINA, F. B. Morfometria e morfologia do canal alimentar pós-faríngeo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812.), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Anapsida, Testudines). **Instituto Pau Brasil**, São Paulo, v. 5, p. 39-51, 2002.

NAH, H. D.; PACIFICI, M. ; GERSTENFELD, L. C.; ADAMS, S. L.; KIRSCH, T. Transient Chondrogenic Phase in the Intramembranous Pathway During Normal Skeletal Development. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 15, n. 3, p. 522-533, 2000.

OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. Bone development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.16. p.191-220, 2000.

RIEPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993.

SAHOO, G.; SAHOO, R. K.; MOHANTY-HEJMADI, P. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v. 121, p. 91–97, 1998.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p. 42-78, 2003.

SHEIL, C. A. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). **Journal of Morphology**, New York, v. 263, p. 71-106, 2005.

SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**. Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.

SOUZA, R.A. M. **Comparação de diferentes protocolos terapêuticos na cicatrização de carapaça de tigres-d'água (*trachemys* sp.)**. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CAPÍTULO 3 – ONTOGENIA DOS OSSÍCULOS DA ESCLERA EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO: Os ossículos da esclera são pequenas placas ósseas localizadas no globo ocular de muitos vertebrados e diferem em sua morfologia, desenvolvimento e posição dentro de diferentes grupos de vertebrados. Com objetivo de investigar o desenvolvimento, o número, a forma e a disposição dos ossículos da esclera, em *Podocnemis expansa* coletou-se 15 embriões, a partir do 18º dia de incubação natural e 16 espécimes adultos, pertencentes ao acervo do LAPAS, dos quais foram removidos os globos oculares. Os embriões e os globos oculares foram submetidos à técnica de diafanização e coloração dos ossos. Apurou-se que os ossículos da esclera, nessa espécie de Testudines, possuem forma quadrangular, variam de 10 a 13 com $11,25 \pm 0,93$ e $11,43 \pm 0,81$, no olho direito e no olho esquerdo, respectivamente, e ocupam posição fixa, próximos à borda anterior da esclera. Os ossículos se desenvolvem de forma intramembranosa e começam a apresentar centros de ossificação no estágio 21, com dez centros de ossificação no olho direito e oito no olho esquerdo. No estágio 23, todos os ossículos do anel esclerótico aumentam em comprimento e se aproximam dos ossículos adjacentes, formando um anel. No estágio 26 os ossículos da esclera já se apresentam na disposição definitiva.

Palavras-chave: Ossificação, Embrião, Olho, Alizarina, Répteis.

**SCLERAL OSSICLES ONTOGENYIS OF THE AMAZON RIVER TURTLE
Podocnemis expansa SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)**

ABSTRACT: The scleral ossicles are small bony plates located in the eyeball of many vertebrates and differ in their morphology, development and position within different groups of vertebrates. With the objective of investigating the development, number form and disposition of the scleral ossicles, in *Podocnemis expansa* 15 embryos were collected, as from the 18th day of natural incubation and 16 adult specimens, belonging to the LAPAS, from which the eyeballs were removed. The embryos and the eyeballs were submitted to the diafanization (Clearing) technique and coloration of the bones. On found out that the scleral ossicles, in Testudines species, have a square form, vary from 10 to 13 with $11,25 \pm 0,93$ and $11,43 \pm 0,81$, in the right eye and in the left eye, respectively, and they occupy a set position close to the front border of the sclera. The ossicles develop in an intramembranous form and begin to present ossification centers in stage 21, with ten ossification centers in the right eye and eight in the left eye. In stage 23, all ossicles of the sclerotic ring increase in length and approach the adjacent ossicles, forming a ring. In stage 26 the scleral ossicles have already presented themselves in the definitive disposition.

Key words: Ossification, Embryos, Eye, Alizarin, Reptile.

INTRODUÇÃO

A esclera é a bainha mais externa do olho, é uma estrutura resistente que preserva a forma do globo ocular, impedindo que a pressão, tanto interna como externa, modifique sua forma. Outro tipo de proteção é propiciada pela presença de um anel esclerótico, uma série de placas ósseas, de posição fixa (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006; MAHECHA; OLIVEIRA, 1998).

As placas ósseas ou ossículos da esclera são comuns entre muitos vertebrados, incluindo Aves, Testudines e alguns Squamata, mas é ausente em Ofídios, Crocodilianos, Anfíbios e Mamíferos (ANDREWS, 1996; FRANZ-ODENDAAL, 2005).

Segundo Hall (1981) e Pinto e Hall (1991), as papilas da esclera induzem a formação dos ossículos da esclera. Para Hall e Miyake (1992), em répteis e aves ocorre ossificação intramembranosa. Estudo experimental realizado em embriões de galinha propõe que os ossículos da esclera surgem como condensações de células mesenquimais de origem da crista neural (HALL, 1978; JOHNSTON, 1973). Há sempre uma correspondência exata entre o número de ossículos e papilas, com estas precedendo o desenvolvimento dos ossículos da esclera (FYFE et al., 1988; FRANZ-ODENDAAL, 2005; HALL; MIYAKE, 1992).

A remoção de uma ou mais papila da esclera em embriões de galinha, em uma determinada fase do desenvolvimento, impede a indução do ossículo abaixo dessa papila removida, enquanto outros ossículos do anel, sem ruptura da papila, desenvolvem-se normalmente (COULOMBRE et al., 1962).

A presença da papila foi confirmada por vários autores em diferentes espécies de Testudines, como *Chelydra serpentina* (YNTEMA, 1968; FRANZ-ODENDAAL, 2005), *Carettochelys insculpta* (BEGGS et al., 2000), *Apalone spinifera* (GREENBAUM; CARR, 2002); *Pelodiscus sinensis* (TOKITA e KURATANI, 2001); *Chrysemys picta* (MAHMOUD et al., 1973); *Dermochelys coriacea* (RENOUS et al., 1989); *Trachemys scripta* (GREENBAUM, 2002b).

Segundo Modesto e Anderson (2004), as aves e répteis estão organizados em um mesmo grupo, e os ossículos da esclera são morfologicamente semelhantes entre eles (WALLS, 1942). Considerando as semelhanças no desenvolvimento da

papila entre aves e répteis, é provável que os ossículos da esclera de todos os Testudines sejam induzidos pelas papilas da esclera (FRANZ-ODENDAAL, 2005).

O conhecimento do desenvolvimento desses pequenos ossos apresenta-se relevante para a clínica de répteis, uma vez que já houve relato de caso de fratura nos ossículos da esclera em gavião *Buteo jamaicensis* (LINDLEY et al., 1988). Segundo o autor os ossículos da esclera servem como local de origem dos músculos ciliares estriados e fornecem proteção para o conteúdo intra-ocular.

Andrews (1996) e Franz-Odendaal (2005) analisaram algumas séries de ossículos da esclera em quatro espécies de Cryptodira: *Chelydra serpentina*, *Sternotherus odoratus*, *Trachemys scripta elegans* e *Chrysemys picta*. Porém, esse estudo ainda não foi realizado em *P. expansa*.

Podocnemis expansa é um Testudines fluvial, da família Podocnemididae, encontrado no rio Amazonas e em quase todos os seus afluentes. É uma espécie de grande porte e os maiores exemplares chegam a alcançar mais 90 cm de comprimento. A carne e os ovos são bastante apreciados, constituindo a base de diversos pratos da culinária amazônica. Esta espécie é também conhecida pelos nomes de araú, jurará-açu e tartaruga-da-Amazônia (GASPAR et al., 2005; LUZ et al., 2003).

Este trabalho tem como objetivo investigar o desenvolvimento, o número, a forma e a disposição dos ossículos da esclera durante o período pré-natal e em espécimes adultos de *Podocnemis expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

15 embriões de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos nos períodos de desova ocorridos em 2005 e 2006, na área de reprodução protegida pelo IBAMA/RAN (Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios), nas praias do Rio Araguaia – Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13° 20' 38,7" S e 50° 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN e 16 espécimes adultos pertencentes ao acervo do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) tiveram seus globos oculares removidos.

Amostras de ovos foram coletadas aleatoriamente, de um ninho escolhido ao acaso, até a eclosão. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni et al. (1990). Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se biometria (Quadro 1) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta), precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, altura, comprimento crânio-caudal e peso corporal, seguindo-se a orientação de Malvásio et al. (2002) e Dani et al. (1990).

Embriões e globos oculares foram submetidos às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red S e também cinco embriões foram processados pela técnica de coloração da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem os ossículos da esclera (Figura 1), foram analisadas em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP 10, Olympus) e câmera fotográfica digital (fe100, Olympus 6.0). Ainda, um desenho representativo dos ossos da esclera foi confeccionado (Figura 1), utilizando-se para tal exemplares já fixados em formol 10% de *P. expansa* adultos do acervo do LAPAS (Figura 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos espécimes adultos de *Podocnemis expansa*, foram encontrados $11,25 \pm 0,93$ e $11,43 \pm 0,81$ ossículos da esclera, no olho direito e no olho esquerdo, respectivamente, variando de 10 a 13 ossículos. Possuem forma quadrangular e ocupam posição fixa próximos à borda anterior da esclera.

Foi observado que os centros de ossificação dos ossículos da esclera, em *Podocnemis expansa*, não têm início ao mesmo tempo, são caracterizados por padrões temporais específicos. O número de ossículos em cada olho também não é uniforme dentro desta espécie. Houve variação entre indivíduos e entre os antímeros esquerdo e direito do mesmo animal.

No início do estágio 21 foram observados dez centros de ossificação na esclera do olho direito e oito centros de ossificação no olho esquerdo. Como pode ser observado na Figura 2A, os centros de ossificação encontram-se no mesmo nível de desenvolvimento. No estágio 22 (Figura 2B) foram observados 11 ossículos na esclera do olho direito e 12 ossículos no olho esquerdo. Neste estágio os ossículos ainda estão bem separados uns dos outros, mas com formato quadrangular bem nítido.

No estágio 23, todos os ossículos do anel esclerótico, aproximam-se dos ossículos adjacentes (Figura 2C). No estágio 24, os ossículos estão unidos uns aos outros e formam um anel com discretas sobreposições entre as placas ósseas. No estágio 26, os ossículos da esclera já se apresentam na disposição definitiva (figura 2D).

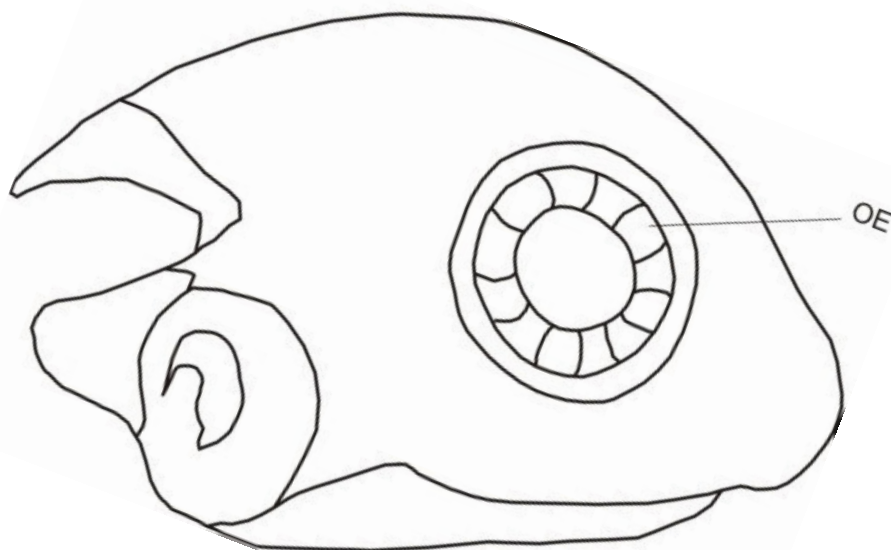


Figura 01: Desenho esquemático dos ossículos da esclera de *Podocnemis expansa* adulta. OE, ossículos da esclera.

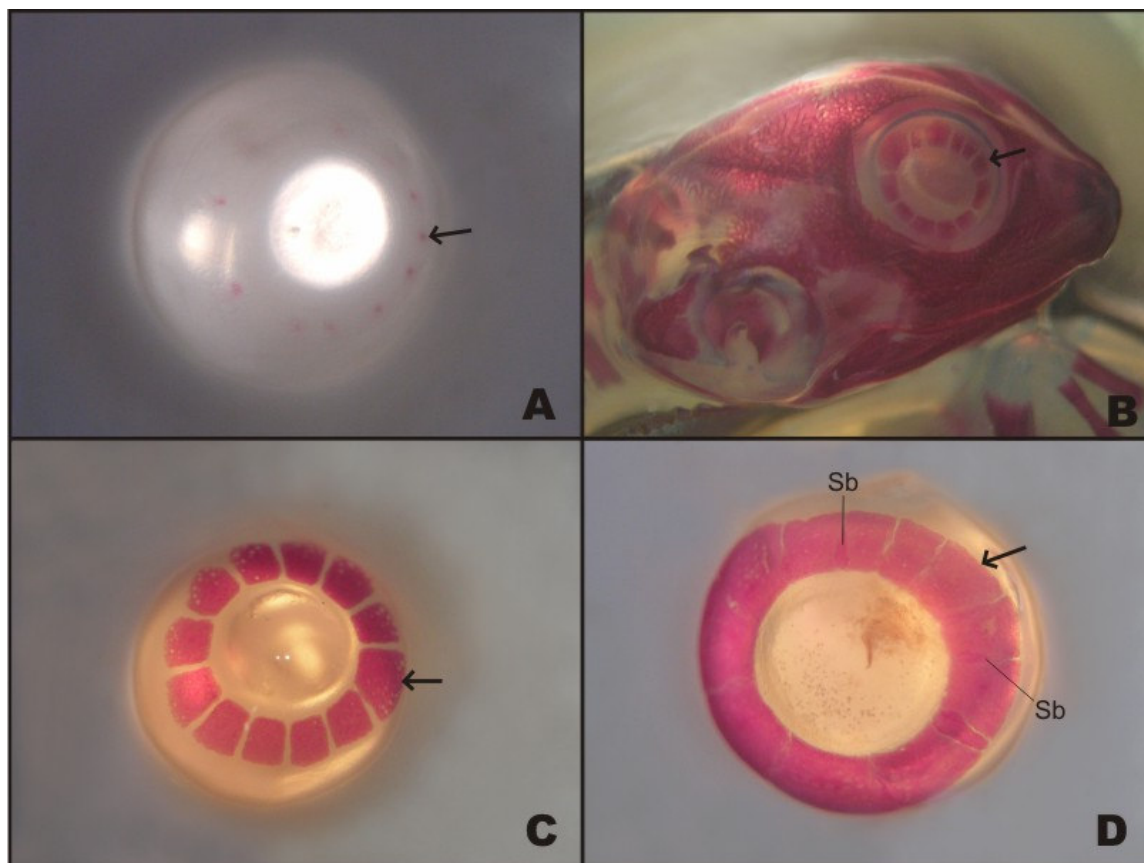


Figura 2: Fotografias de olhos de *Podocnemis expansa*. Olho direito, vista corneal. **A**, estágio 21, **B**, estágio 22, **C**, estágio 23, **D**, estágio 24. Seta, ossículos da esclera, Sb, sobreposição. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red S (A, C e D) e cartilagem com alcian blue (B). (A, C e D)x 16, (B) x 7.

Segundo Franz-Odenaal (2008) e Warheit et al. (1989), os ossículos da esclera são elementos ósseos localizados no anel esclerótico do olho de muitos vertebrados, inclusive de *P. expansa* e diferem em sua morfologia, desenvolvimento, número e posição.

Franz-Odenaal (2005), em estudos com *C. Serpentina*, concluiu que o processo de ossificação dos ossículos da esclera é intramembranosa, assim como ocorre em *P. expansa*. No entanto, observações de Andrews (1996) contradizem essas informações, afirmando ser endocondral a forma de ossificação daqueles ossículos na mesma *C. Serpentina*, o que foi relatado por Franz-odendaaal e Hall (2006) para os peixes teleósteos.

Segundo Andrews (1996), *C. Serpentina* e *C. Picta* começam a ossificar no estágio 21, assim como acontece em *P. expansa*. Os ossículos da esclera em *C. Serpentina* (FRANZ-ODENDAAL, 2005) iniciam o processo de ossificação no final do estágio 19, e no estágio 22 todas as placas apresentam centros de ossificação. Após a eclosão, os ossículos da esclera formam um anel contínuo com as placas apresentando discretas sobreposições nas suas bordas. Deraniyagala (1939) apud Franz-odendaal (2005) observou um padrão de ossificação semelhante em *Dermochelys coriacea* e este padrão é novamente visto nos embriões de galinha (COULOMBRE; COULOMBRE, 1973), bem como em *P. expansa*.

Segundo Warheit et al. (1989), o anel esclerótico composto de placas ósseas com sobreposições permite o crescimento do anel durante a ontogenia. Hildebrand e Goslow (2006) sugerem que o anel, com um arranjo de sobreposições das bordas das placas ósseas, confere maior resistência contra deformações do globo ocular e permite melhor desenvolvimento das placas óss eas.

Além do padrão de ossificação, o número de ossículos presente na esclera, também varia entre os taxóns (LEMMRICH, 1931 apud WARHEIT et al., 1989; FRANZ-ODENDAAL, 2005). Warheit et al. (1989) propõe que as diferenças no número de ossículos entre os táxons podem ser atribuídas ao crescimento peculiar de cada táxons.

Primitivamente, nos peixes, o anel consistia em quatro placas, reduzindo-se a dois elementos. Atualmente na maioria dos teleósteos, há apenas dois ossículos, situado anteriormente e posteriormente dentro do olho (NAKAMURA e YAMAGUCHI, 1991). Nos crossopterígios ancestrais dos vertebrados terrestres e nos fósseis mais antigos de anfíbios, o número de placas aumentou grandemente e uma grande quantidade ainda está presente em répteis e aves (FRANZ-ODENDAAL, 2005; SANES, 1992, HILDEBRAND; GOSLOW, 2006). Em *Gallus gallus*, existe 13 a 14 ossículos da esclera em cada olho (PALMOSKI; GOETINCK, 2005). *Alectura lathamii*, *Numida meleagris* e *Aburria aburri* 14 ossículos da esclera, *Crotophaga ani* e *Tauraco hartlaubi*, 12 e 13 ossículos da esclera, respectivamente (WARHEIT et al., 1989).

Para Underwood (1970) em Testudines, o número de ossículos da esclera varia de 6 a 13. Em *C.serpentina* existe 10 ossículos (FRANZ-ODENDAAL, 2005),

em *P. expansa* existe em média de $11,25 \pm 0,93$ e $11,43 \pm 0,81$ ossículos, nos olhos direito e esquerdo respectivamente.

CONCLUSÕES

A espécie *P. expansa* possui um anel esclerótico com $11,25 \pm 0,93$ e $11,43 \pm 0,81$, ossículos no olho direito e no olho esquerdo, respectivamente, variando de 10 a 13 ossículos

Os ossículos apresentam forma quadrangular, desenvolvem-se de forma intramembranosa, começam a apresentar centros de ossificação no estágio 21 e, no estágio 26, apresentam-se na disposição definitiva.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, K. D. An endochondral rather than a dermal origin for scleral osicles in cryptodiran turtles. **Journal of Herpetology**, Athens, v. 30, n. 2, p. 651-662, 1996.

BEGGS, K.; YOUNG, J.; GEORGES, A.; WEST, P. Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelydidae), from northern Australia. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, v. 78, p. 373–392, 2000.

COULOMBRE, A. J.; COULOMBRE, J. L.; MEHTA, H. The skeleton of the eye. I. Conjunctival papillae and scleral ossicles. **Developmental Biology**, New York, v. 5, p.382–401, 1962.

COULOMBRE, A. J.; COULOMBRE, J. L. The skeleton of the eye: II overlap of the scleral ossicles of the domestic fowl. **Developmental Biology**, New York, v. 33, p. 257-267, 1973.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*,

pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DERANIYAGALA, P.E.P. **The Tetrapod Reptiles of Ceylon**. Colombo Museum: Ceylon, 1939.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

FYFE, D. M.; FERGUSON, M. W. J.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Immunocytochemical localisation of tenascin during the development of scleral papillae and scleral ossicles in the embryonic chick. **Journal of Anatomy**. London, v. 159, p. 117-127, 1988.

FRANZ-ODENDAAL, T. A. Intramembranous ossification of scleral ossicles in *Chelydra serpentina*. **Zoology**, Jena, v.109, n. 1, p.75-81, 2005.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K. Skeletal elements within teleost eyes and a discussion of their homology. **Journal of Morphology**, New York, v. 267, p. 1326-1337, 2006.

FRANZ-ODENDAAL, T. A. Scleral Ossicles of Teleostei: Evolutionary and Developmental Trends. **Anatomical Record**, New York, v. 22, n.2, p.161-168, 2008.

GASPAR, A.; SILVA, T. J. P.; SÃO CLEMENTE, S. C. Insensibilização e Rendimento de Carcaça de Tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*). **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v.8, n.1, p. 57-61, 2005.

GREENBAUM, E.; CARR, J. L. Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 254, p. 272–291, 2002.

GREENBAUM, E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 80, p. 1350–1370, 2002.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. **Anatomy and Embryology**, New York, v. 186, p. 107–124, 1992.

HALL, B. K. Specificity in the differentiation and morphogenesis of neural crest-derived scleral ossicles and of epithelial scleral papillae in the eye of the embryonic chick. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v.66, p. 175–190, 1981.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. E. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 358-366.

JOHNSON, L. G. Development of chick embryo conjunctival papillae and scleral after hydrocortisone treatment. **Developmental biology**. London, v. 30, p. 223-227, 1973.

LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; FERNANDES, E. S. PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N.; I. J. Rendimento e composição química de carcaça da tartaruga-da- Amazônia (*Podocnemis expansa*) em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n. 1, p.1-9, 2003.

LINDLEY, D. M.; HATHCOCK, J. T.; MILLER, W. W.; DIPINTO, N. Fractured scleral ossicles in a red tail hawk. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. Raleigh, v. 29, p. 209-212, 1988.

MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. An Additional Bone in the Sclera of the Eyes of Owls and the Common Potoo (*Nictibius griseus*) and Its Role in the Contraction of the Nictitating Membrane. **Acta Anatômica**, Suíça, v.163, p. 201-211, 1998.

MAHMOUD, I. Y.; KLICKA, J.; HESS, G. L. Normal embryonic stages of the western painted turtle (*Chrysemys picta belli*). **Journal of Morphology**, New York, v. 141, p. 269–279, 1973.

MALVASIO, A.; SOUZA, A. M.; REIS, E. S.; FARIAS, E.C. Morfologia dos órgãos reprodutores de recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Instituto Pau Brasil**, São Paulo, n. 27-37, 2002.

MODESTO, S.P., Anderson, J.S. The phylogenetic definition of Reptilia. **Systems Biology**, Stevenage, v. 53, 815–821, 2004.

NAKAMURA, K.; YAMAGUCHI, H. Distribution of scleral ossicles in teleost fishes. **Memoirs of Faculty of Fisheries of Kagoshima University**, Tokyo, v. 40, p.1–20, 1991.

PALMOSKI, M. J.; GOETINCK, P. F. An analysis of the development of conjunctival papillae and scleral ossicles in the eye of the scaleless mutant. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 174, p. 157 – 164, 2005.

PINTO, C. B.; HALL, B. K. Toward an understanding of the epithelial requirement for osteogenesis in scleral mesenchyme of the embryonic chick. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 259, p.92–108, 1991.

RENOUS, S.; RIMBLOT-BALY, F. ; FRETEY, J. ; PIEAU, C. Caractéristique du développement embryonnaire de la Tortue Luth, *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). **Annual Science Nature of Zoology**, Paris, v. 13, p.197–229, 1989.

SANES, J. R. On the republication of the Hamburger-Hamilton stage series. **Developmental Dynamics**, New York, v. 195, n.4, p. 229-30, 1992.

TOKITA, M.; KURATANI, S. Normal embryonic stages of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). **Zoological Science**, Tokyo, v. 18, p. 705–715, 2001.

UNDERWOOD, G. The eye. In: GANS, C. **Biology of the Reptilia**, London: Academic Press, p. 1-98, 1970.

WALLS, G.L.. The Vertebrate Eye and its Adaptive Radiation. **Bulletin**, Michigan, v.19, 1942.

WARHEIT, K. I.; GOOD, D.A.; QUEIROZ, K. Variation in numbers of scleral ossicles and their phylogenetic transformations within the pelecyaniformes. **The Auk**. Washington, v. 160, p. 383-388, 1989.

YNTEMA, C.L. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. **Journal of Morphology**, New York, v. 125, p. 219–252, 1968.

CAPÍTULO 4 – ONTOGENIA DOS OSSOS DA COLUNA VERTEBRAL EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO - Com objetivo de se investigar a sequência de formação dos elementos ósseos que formam a coluna vertebral, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal em *Podocnemis expansa*, coletaram-se embriões e filhotes, a partir do 18º dia de incubação natural. Efetuou-se morfometria e os embriões e filhotes foram submetidos à técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens. A coluna vertebral de *P. expansa* compreende oito vértebras cervicais, dez vértebras costais, duas vértebras sacrais e vinte vértebras caudais. No estágio 15 as vértebras ainda são constituídas por cartilagem. No estágio 17 a cartilagem começa a ser substituída por osso, e ocorre no sentido crânio-caudal. No estágio 19 todas as vértebras costais apresentam centros de ossificação, além das duas vértebras sacrais. A partir do estágio 20 as vértebras caudais começam a apresentar centros de ossificação.

Palavras-chave: Vértebras, Répteis, *Podocnemis expansa*, Alizarina, Ossificação.

**BONE ONTOGENY OF THE SPINE OF THE GIANT AMAZON RIVER TURTLE
Podocnemis expansa SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)**

ABSTRACT: With the objective of investigating the formation sequence of the bony elements which form the spine, in the different stages of pre and post natal development in *Podocnemis expansa*, embryos and nestlings were collected, as from the 18th day of natural incubation. Morphometrics occurred and the embryos and nestlings were submitted to the diafanization and coloration technique of the bones and cartilages. The *P. expansa* spine comprises eight cervical vertebrae, ten back vertebrae, two sacral vertebrae and twenty tail vertebrae. In stage 15 the vertebrae are still constituted by cartilage. In stage 17 the cartilage begins to be substituted by bone, and this takes place in the cranium-tail direction. In stage 19 all the back vertebrae present ossification centers, as well as the two sacral vertebrae. As from stage 20 the tail vertebrae begin to present ossification centers

Key words: vertebrae, Reptile, *Podocnemis expansa*, Alizarin, Ossification

INTRODUÇÃO

A principal formação do esqueleto axial é a coluna vertebral, o suporte longitudinal do corpo dos vertebrados, que substitui a notocorda. A maior flexibilidade dada pela notocorda é sacrificada em favor da maior e necessária resistência fornecida pelos elementos ósseos, que é especialmente grande nos vertebrados terrestres, nos quais o dorso deve sustentar o peso do corpo. Como função adicional, os elementos vertebrais estendem-se acima da região da notocorda para envolver e proteger a medula espinhal. (ROMER; PARSONS, 1985; LAURIN, 1998).

A anatomia dos testudines difere significativamente de outros répteis, e estes em geral são muito diferentes dos mamíferos (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006). A diferença mais visível nos testudines é a presença de um casco. Esta estrutura consiste de carapaça na região dorsal e do plastrão na região ventral, que são ligados por pontes ósseas (POUGH et al., 2003; ALIBARDI; THOMPSON, 1999a; GILBERT, et al., 2001). Os ossos que formam o casco são cobertos por escudos de queratina o que lhe confere maior resistência (ALIBARDI; THOMPSON, 1999b; CLARK, et al., 2001; ALIBARDI, 2002).

Os Testudines exibem um extenso espectro de adaptações morfológicas e o esqueleto axial, reflete em sua diversidade morfológica, a grande extensão das suas especializações. As vértebras, parte do esqueleto axial, são estruturas complexas com grande variedade na sua arquitetura (ROMER; PARSONS, 1985; HILDEBRAND; GOSLOW, 2006).

Podocnemis expansa Schiweigger 1812, é uma espécie de Testudines que pertence a família podocnemididae (VANZOLINI, 2003), é conhecida popularmente como tartaruga-da-Amazônia, tem sua distribuição no rio Amazonas e em quase todos os seus afluentes (MUNDIM et al, 1999). É considerada uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente (LUZ et al., 2003). Segundo Alho et al. (1979) e Molina (1992), é o maior quelônio de água doce da América do sul.

Para compreender como se manifestam os diversos processos patológicos nos Testudines é importante conhecer as principais características anatômicas e fisiológicas que os diferenciam dos demais animais selvagens. Sendo assim, este

trabalho tem por objetivos descrever a sequência de formação dos ossos que compõem a coluna vertebral, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

62 embriões e 43 filhotes recém-nascidos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos nos períodos de desova ocorridos em 2005 e 2006, na área de reprodução protegida pelo IBAMA/RAN (Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios), nas praias do Rio Araguaia – Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13º 20' 38,7" S e 50º 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN.

Amostras de ovos e filhotes foram coletadas aleatoriamente, de um ninho escolhido ao acaso, até a eclosão. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni et al. (1990). Após a eclosão, os filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos com temperatura em torno de 27 °C e alimentados com ração para peixes.

Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se morfometria (Quadro 1 e 2) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta), precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, altura, comprimento crânio-caudal e peso corporal, seguindo-se a orientação de Malvásio et al. (2002) e Dani et al. (1990).

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red S e da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem a coluna vertebral (Figura 4), foi analisada em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP 10, Olympus) e câmera fotográfica digital (fe100, Olympus 6.0). Ainda, três desenhos representativos, foram confeccionados, utilizando-se para tal seis esqueletos de *P. expansa* adultos do acervo do LAPAS (Figuras 1, 2 e 3).

RESULTADOS

Osteologia da coluna vertebral

A coluna vertebral de *P. expansa* é distintamente regionalizada e compreende oito vértebras cervicais, dez vértebras dorsais, duas vértebras sacrais e pelo menos vinte vértebras caudais (Figura 1).

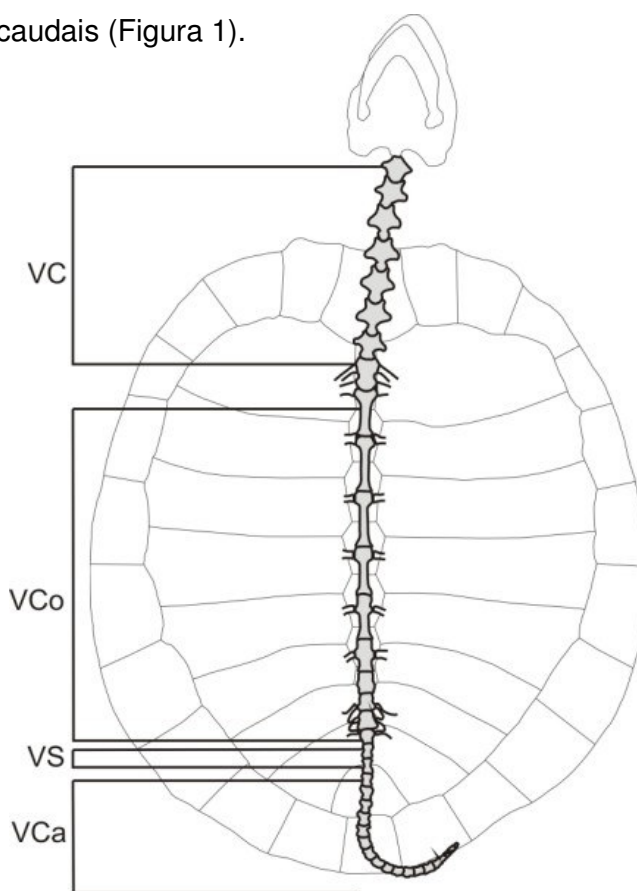


Figura 1: Desenho esquemático das vértebras de *Podocnemis expansa*. Vista ventral. VC, vértebras cervicais; VCo, vértebras dorsais; VS, vértebras sacrais, VCa, vértebras caudais.

Vértebras cervicais:

O atlas é a primeira vértebra cervical e é composto por quatro elementos: um pequeno osso localizado cranioventralmente, o intercentro atlantal; um par de arcos vertebrais atlantais, localizados laterodorsalmente e um centro atlantal localizado caudoventralmente (Figura 3).

Os arcos vertebrais atlantais são fundidos dorsalmente e unem-se cranialmente com o intercentro atlantal e ventrocaudalmente com o centro atlantal (Figura 3).

A superfície ventral do intercentro atlantal apresenta uma leve quilha, a porção caudal é mais arredondada e possui uma superfície de articulação cranial e outra caudal. A superfície da articulação cranial é levemente côncava e articula-se com a porção ventral do côndilo occipital do crânio. A superfície da articulação caudal é levemente convexa e articula-se com a margem craniodorsal do centro atlantal (Figura 3).

Cada arco neural vertebral compreende uma distinta região articular cranial e outra caudal. Ventralmente se articula com a margem dorsolateral do intercentro atlantal. Cranialmente possui uma superfície irregular que se articula com a superfície lateral do côndilo occipital do crânio. Caudalmente articular-se com o centro atlantal. Dorsalmente, os arcos se fundem na linha mediana. Na vista lateral, a margem cranial de cada região é levemente convexa, e a margem caudal apresenta-se côncava e forma a margem cranial do forame intervertebral. O arco vertebral atlantal sustenta um processo articular caudal (pós-zigapófise), que se projeta caudalmente além do nível da margem caudal do centro atlantal. Os processos articulares craniais (pré-zigapófise) estão orientados dorsal e medialmente, enquanto que os processo articulares caudais voltam-se ventral e lateralmente (Figuras 2 e 3).

Cranialmente, o centro atlantal se articula com o côndilo occipital, com o intercentro atlantal, e com a margem posterior da superfície articular do arco vertebral atlantal e caudalmente articula-se com o eixo, a segunda vértebra cervical.

O eixo é maior que o atlas e compreende três regiões distintas: um par de arcos vertebrais onde se situam os processos articulares craniais e caudais, e o corpo localizado ventralmente. Seu corpo vertebral-se articula cranialmente com o

atlas e caudalmente com a terceira vértebra cervical. Os processos articulares craniais se dirigem cranialmente e se articulam com os processos articulares caudais do atlas. Os processos articulares caudais do áxis se dirigem caudalmente e se articulam com os processos articulares craniais da terceira vértebra.

As demais vértebras cervicais são semelhantes ao áxis. No entanto, diferenças entre estas vértebras são aparentes nos seguintes aspectos, que variam através de uma série: os processos articulares craniais e caudais; forma e tamanho do espaço entre os processos articulares craniais e caudais; tamanho, forma e orientação dos processos articulares craniais e caudais; largura da superfície cranial articular do corpo; e tamanho e forma da superfície articular caudal de cada corpo.

Caudalmente ao áxis o comprimento do corpo vertebral tende a aumentar e depois o comprimento do corpo permanece mais ou menos constante. A terceira vértebra cervical apresenta o arco vertebral mais desenvolvido do que o do áxis, e apresenta a sua borda dorsal suavemente convexa. Em vista lateral pode-se observar que o arco neural torna-se gradativamente mais alto e espesso da sexta a oitava vértebra cervical; o processo espinhoso é de aspecto triangular, inclinado caudalmente. Na região articular caudal, encontra-se o processo articular caudal (Pca), levemente achatada em sua porção caudal. Na face caudo-ventral deste processo encontra-se a faceta articular horizontal, para a faceta do processo articular cranial da vértebra cranial. O processo articular cranial (Pcr) constitui-se em uma projeção localizada lateralmente, logo acima do processo transverso, e cuja superfície articular é horizontal e voltada dorsalmente (Figura 2).

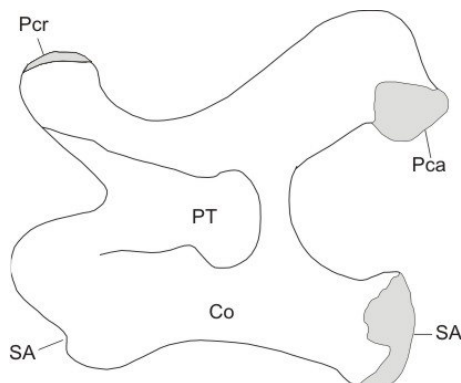


Figura 2: Desenho esquemático de uma vértebra típica de *Podocnemis expansa*. Vista lateral. PCr, processo articular cranial; PCa, processo articular caudal; PT, Processo transverso; Co, Corpo; SA, superfície articular do corpo.

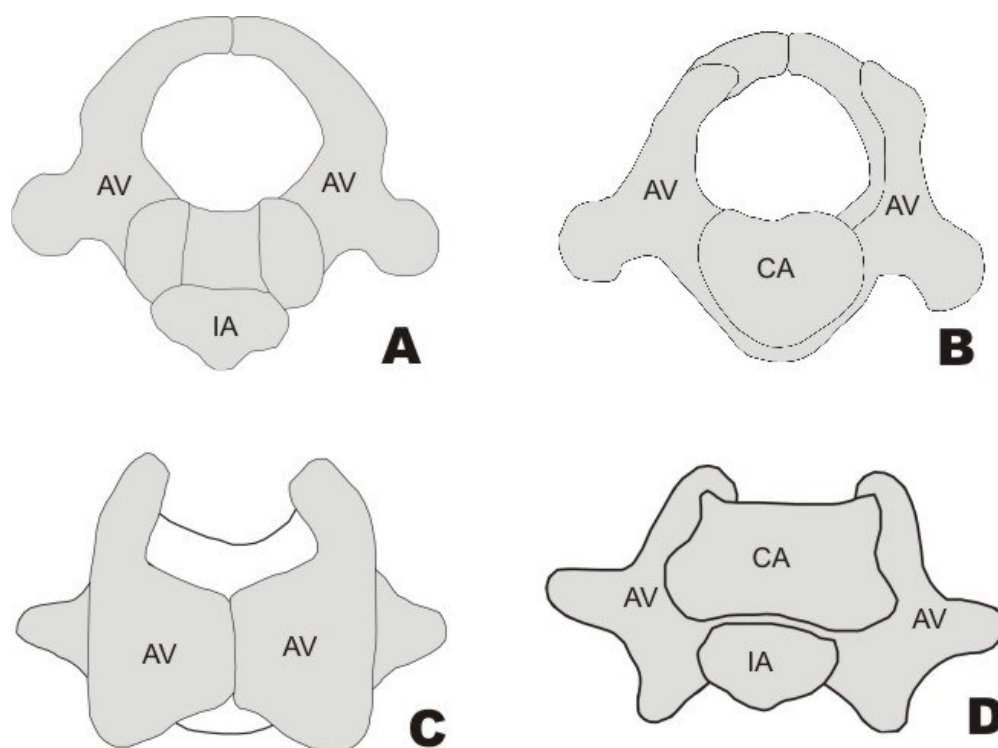


Figura 3: Desenho esquemático do atlas de *Podocnemis expansa*. (A) vista cranial; (B) vista caudal; (C) vista dorsal; (D) vista ventral. IA, intercentro atlantal; AV, arco vertebral atlantal; CA, centro atlantal.

Vértebras costais

Os corpos das vértebras costais são largos dorsoventralmente, porém delgados lateralmente. A primeira vértebra costal possui processo articular cranial que se estende craniodorsalmente. Nas vértebras costais de 2 a 10, os arcos vertebrais dirigem-se dorsalmente para os ossos neurais e os dois últimos costais da carapaça, onde se mantém fundidos.

Vértebras sacrais

A região sacral da coluna vertebral de *P. expansa* é formada por duas vértebras, das quais a primeira apresenta-se fundida à última vértebra costal e a segunda mantém-se articulada com a primeira sacral cranialmente e com a primeira

vértebra caudal, caudalmente. Assim como nas vértebras costais, o arco vertebral da primeira vértebra sacral também se dirige dorsalmente para os ossos costais da carapaça, onde se mantém fundidos.

Vértebras caudais

Os processos transversais são mais proeminentes cranialmente e diminui em tamanho caudalmente. Os arcos vertebrais são mais proeminentes nas vértebras mais craniais e diminui de forma gradativa distalmente. Os corpos das vértebras caudais são cilíndricos e diminuem de comprimento em direção caudal.

Seqüência de ossificação da coluna vertebral

Na figura 4A, pode se observar a coloração apenas com alcian blue do modelo de cartilagem da coluna vertebral, em um embrião no estágio 15. Só mais tarde esta cartilagem será substituída por osso.

No início do estágio 17 todas as vértebras cervicais apresentam centros de ossificação. As vértebras mais craniais mostram-se mais adiantadas, indicando que o sentido é crânio-caudal. Ainda, nesse mesmo estágio, as quatro primeiras vértebras costais iniciam o processo de ossificação, com as craniais mais avançadas (Figura 4B). A quinta vértebra costal mostra centro de ossificação no final do estágio 17, a sexta vértebra costal no estágio 18 e no final do estágio 19 todas as vértebras costal apresentam centros de ossificação, além das duas vértebras sacrais (Figuras 4C, D e E).

A partir do início do estágio 20 as vértebras caudais e os arcos vertebrais cervicais começam a apresentar centros de ossificação. No estágio 21, mais cinco vértebras caudais já iniciaram o processo de ossificação. As vértebras caudais têm o seu número variável, a seqüência de ossificação continua até o estágio 25, nesse segmento da coluna vertebral. O sentido de ossificação de todos os segmentos da coluna, tanto do corpo quanto dos arcos vertebrais, é sempre o mesmo, crânio-caudal (Figura 4F, G e H).

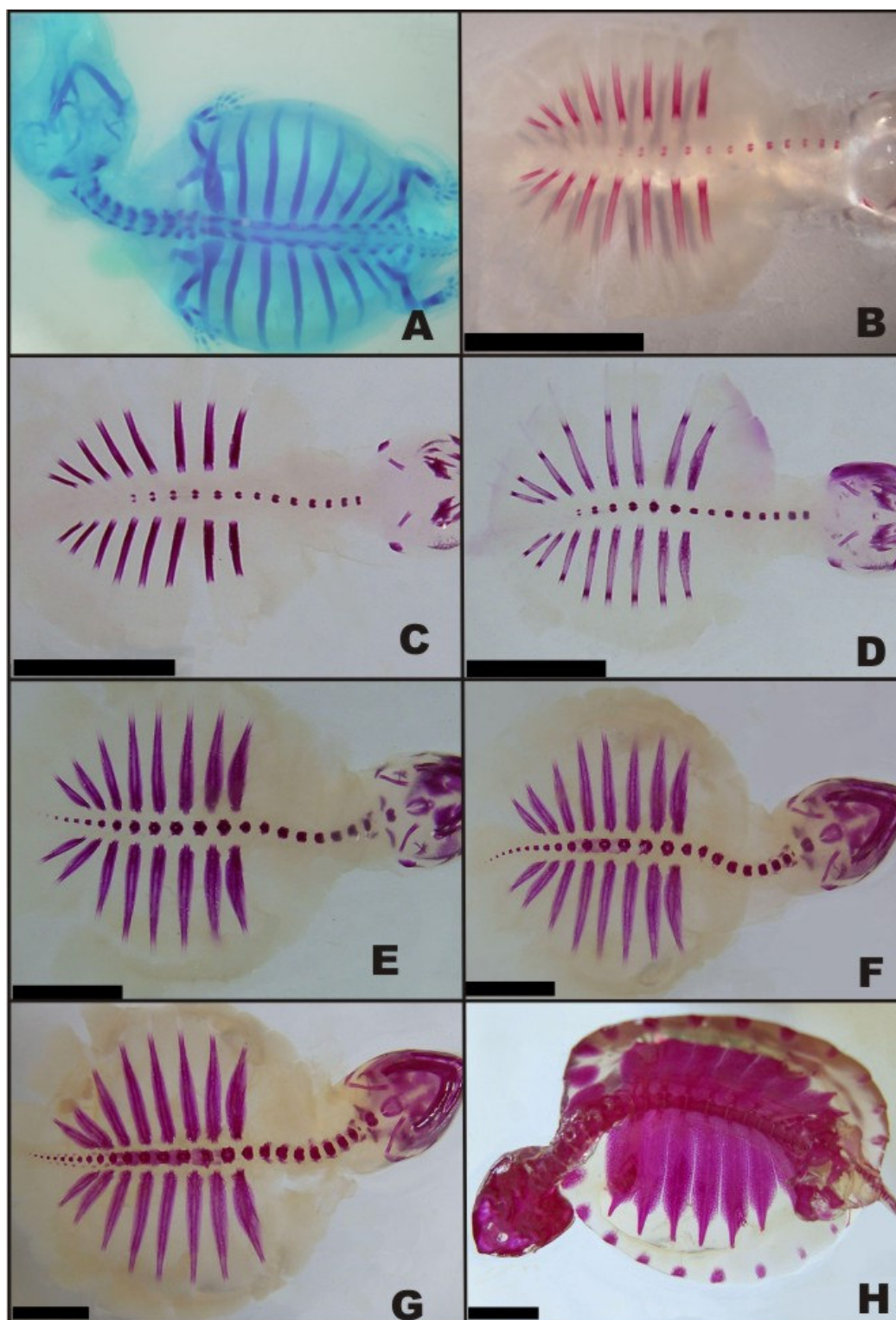


Figura 4: Fotografias de embriões e filhote de *P. expansa*, vista ventral. (A) estágio 15: Modelo cartilaginoso da coluna vertebral. (B) início do estágio 17: Desenvolvimento das vértebras cervicais. (C) final do estágio 17: Desenvolvimento das vértebras cervicais e costais; (D) estágio 18. (E) estágio 19: Desenvolvimento das vértebras costais. (F) início estágio 20, (G) final do estágio 20: Desenvolvimento das vértebras sacrais e caudais. (H) 5º dia após eclosão. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A)x7. Barra: 10 mm.

DISCUSSÃO

Observa-se em *P. expansa* o mesmo padrão descrito por Sheil (2003) para uma vértebra típica de *A. spinifera*. O padrão vertebral em *P. expansa* também coincide com algumas descrições feitas por Rieppel (1993), Romer e Parsons (1985) e Sheil e Grennbaum (2005).

Romer e Parsons (1985) afirmam que a coluna vertebral dos répteis apresenta diferenciações regionais que levam a distinção das vértebras em regiões pré-sacral, sacral e caudal. Segundo Krause (1978), a região pré-sacral ainda pode ser subdividida em cervical, dorsal (torácica e pós-torácica) e lombar. A coluna vertebral de *P. expansa* é formada por vértebras cervicais, costais, sacrais e caudais, coincidindo em parte com a descrição de Romer e Parsons (1985).

Variação anatômica no número de vértebras é comum entre os vertebrados. Entretanto, entre os Testudines, variações significativas só foram observadas nas vértebras caudais, cujas fórmulas vertebrais são expressas por: 8:10:2:20, 8:10:2:13, 8:10:2:15 e 8:10:2:20, para *P. expansa*, *A. spinifera* (SHEIL, 2003), *C. serpentina* (SHEIL; GREENBAUM, 2005), e *M. temminckii* (SHEIL, 2005). Isso demonstra que se deve tomar cuidado com as abordagens tipológicas.

Em vertebrados terrestres o movimento independente da cabeça é importante e modificações nas vértebras mais craniais e em sua articulação com o crânio facilitam isto (Romer e Parsons, 1985). Em *P. expansa* as duas primeiras vértebras aparecem grandemente modificadas e consideravelmente diferentes das subseqüentes, formando o complexo atlas-axis, o qual, segundo Romer e Parson (1985), permite considerável liberdade de movimentos à cabeça. O mesmo ocorre em *C. serpentina* (SHEIL; GREENBAUM, 2005), *A. spinifera* (SHEIL, 2003) e *Liolaemus arambarensis* (SILVA; VERRASTRO, 2007). As demais vértebras da região cervical apresentam morfologia semelhante em todos os Testudines estudados.

Para Sheil e Greenbaum (2005) e para Rieppel (1993), nos estudos em *C. serpentina*, as seqüências de ossificação dos elementos vertebrais cervicais se assemelham. Entre as vértebras cervicais, a tendência geral de ossificação do corpo vertebral é caudo-cranial. Os arcos vertebrais cervicais podem se ossificar quase

simultaneamente e parece acontecer num sentido oposto ao do corpo vertebral, crânio-caudal. Portanto, os gradientes de ossificação dos arcos vertebrais cervicais e do corpo vertebral opõem-se, em *C. serpentina*. Padrão de ossificação diferente foi observado em *P. expansa* e *M. temminckii* (SHEIL, 2005), onde o sentido de ossificação do corpo e do arco vertebral é o mesmo, crânio-caudal.

Em *C. serpentina*, na região costal, o corpo vertebral progride das extremidades para o centro, ao passo que os arcos vertebrais ossificam num gradiente cranio-caudal (SHEIL; GREENBAUM, 2005). Em *M. temminckii*, no estágio 20, inicia-se o processo de ossificação no corpo de todas as vértebras costais. O grau de ossificação é maior entre as vértebras mais craniais e diminuem caudalmente, portanto o sentido é crânio-caudal (SHEIL, 2005). O mesmo sentido de ossificação ocorre em *P. expansa* e *A. spinifera*. No entanto, difere na cronologia, pois em *P. expansa* o processo se inicia mais cedo (SHEIL, 2003).

As vértebras sacrais começam a se ossificar no estágio 19 em *P. expansa* e *A. spinifera* (SHEIL, 2003), no estágio 20 em *M. temminckii* (SHEIL, 2005) e no estágio 21 em *C. serpentina* (SHEIL; GREENBAUM, 2005).

Em *M. temminckii*, no estágio 21, os corpos das vértebras caudais já estão com ossificação aparente (SHEIL, 2005), porém, o grau relativo de ossificação é maior cranialmente e diminui caudalmente. Nesse mesmo estágio, em *A. spinifera*, as vértebras caudais mais craniais também apresentam centros de ossificação (SHEIL, 2003). Em *C. serpentina*, no estágio 23, ocorrem centros de ossificação em todas as vértebras caudais, com sentido, crânio-caudal. Em *P. expansa*, o início da ossificação das vértebras caudais acontece no estágio 20 e no mesmo sentido dos outros Testudines estudados.

Os padrões de ossificação no esqueleto dos répteis são pouco conhecidos (RIEPEL, 1993). Numa tentativa de compreender esse padrão de desenvolvimento ósseo, foram realizados por Rieppel (1992) alguns estudos preliminares em três importantes clados de répteis, Chelydra, Alligator e Lacerta como representantes dos Testudines, Crocodilianos e Squamatas, respectivamente. Estas investigações demonstraram variabilidade nos padrões e sequência de ossificação entre os táxons. Mais estudos são necessários para uma análise filogenética comparativa criteriosa.

As informações apresentadas nesta oportunidade, acerca da descrição de parte do esqueleto axial de *P. expansa* e a seqüência de formação óssea durante a sua ontogenia, são de grande importância, tanto na análise das adaptações deste Testudines aos ambientes aquáticos e terrestres, já que esta espécie é de hábitat semi-aquático, quanto na análise das relações filogenéticas com outros integrantes deste mesmo táxon.

CONCLUSÕES

Em *Podocnemis expansa*, a coluna vertebral é formada por oito vértebras cervicais, 10 vértebras costais, duas vértebras sacrais, e pelo menos 20 vértebras caudais.

A seqüência de ossificação ocorre na seguinte ordem: vértebras cervicais>vértebras costais>vértebras sacrais>vértebras caudais.

O sentido de ossificação de todos os segmentos da coluna vertebral é sempre o mesmo, crânio-caudal.

REFERÊNCIAS

ALHO, C.J.R.; CARVALHO, A.G.; PÁDUA, L.F.M. Ecologia da tartaruga da Amazônia e avaliação de seu manejo na reserva biológica do rio trombetas. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 9, n. 38, p. 29-47. 1979.

ALIBARDI, L.; THOMPSON, M. B. Morphogenesis of shell and scutes in the turtle *Emydura macquarii*. **Australian Journal of Zoology**, Melbourne, v. 47, p. 245-260, 1999a.

ALIBARDI, L.; THOMPSON, M. B. Epidermal differentiation during carapace and plastron formation in the embryonic turtle *Emydura macquarii*. **Journal of Anatomy**, London, v. 194, p. 531-545, 1999b.

ALIBARDI L. Immunocytochemical observations on the cornification of soft and hard epidermis in the turtle *Chrysemys picta*. **Zoology**. Jena, v. 105, p. 31-44, 2002.

CLARK, K. G.; BENDER, B. P.; MURRAY, K. PANFILIO, S.; COOK, R. DAVIS, K.; MURNEN, R. S.; TUAN, AND S. F. GILBERT. Evidence for the neural crest origin of turtle plastron bones. **Gêneseis**, Paris, v. 31, p.111–117, 2001.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*, pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

GILBERT, S. F., G. A. LOREDO, A. BRUKMAN,; A. C. BURKE. Morphogenesis of the turtle shell: the development of novel structure in tetrapod evolution. **Evolution & Development**, Malden, v. 3, p.47–58, 2001.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. E. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 358-366.

KRAUSE, L. Osteologia pós-craniana de *Tupinambis teguxin* (L., 1758) sensu Boulenger, Parte I: Esqueleto axial (vértebras e costela) (Lacertília, Scincomorpha, Telidae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 46, n. 2, p. 481-499, 1978.

LAURIN, M. The importance of global parsimony and historical bias in understanding tetrapod evolution. Part II. Vertebral centrum, costal ventilation, and paedomorphosis. **Annales des Sciences Naturelles**, Paris, v. 2, p. 99-114, 1998.

LUZ, V. 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**, Viçosa, v. 32, n.1, p.1-9, 2003.

MALVÁSIO, A.; SOUZA, A.M.; GOMES, N.; SAMPAIO, F.A. A.; MOLINA, F. B. Morfometria e morfologia do canal alimentar pós-faríngeo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812.), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Anapsida, Testudines). **Instituto Pau Brasil**, São Paulo, v. 5, p. 39-51, 2002.

MOLINA, F. B. O comportamento reprodutivo de quelônios. **Biotemas**, Florianópolis, v.5, p. 61-70, 1992.

MUNDIM, A. V.; QUEIROZ, R. P.; SANTOS, A. L. Q.; BELLETI, M. E.; LUZ, V. L. F. Bioquímica sanguínea da tartaruga da amazônia (*Podocnemis expansa*) em seu habitat natural. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 15, n. 2, p. 35-43, 1999.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B, **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003.

RIEPPEL, O. Studies on skeletal formation in reptiles. III. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta vivipara* Jacquin (Reptilia, Squamata). **Zoology**, Jena, v. 68, p.1-25, 1992.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993.

ROMER, A. S.; T. PARSONS. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p. 42-78, 2003.

SHEIL, C. A. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). **Journal of Morphology**, New York, v. 263, p. 71-106, 2005.

SILVA, C. M.; VERRASTRO, L. Descrição do esqueleto axial de *Liolaemus arambarenses* Verrastro, Veronese Bujes e Dias Filho (Iguania, Liolaemidae): regiões pré-sacral e sacral. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 1-11, 2007.

VANZOLINI, P. E. On clutch size and hatching success of the South American turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *P. unifilis* Troschel, 1848 (Testudines, Podocnemididae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 415-430, 2003.

CAPÍTULO 5 - ONTOGENIA DOS OSSOS DA CARAPAÇA EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO - O Brasil tem a fauna mais rica de toda a América Central e do Sul, mas a maioria das informações sobre répteis é ainda preliminar. A *Podocnemis expansa*, conhecida popularmente como tartaruga-da-amazônia, é largamente distribuída pela bacia amazônica e seus afluentes. Com objetivo de investigar a seqüência de formação dos elementos ósseos que formam a carapaça, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa* coletaram-se embriões e filhotes recém-nascidos, a partir do 18º dia de incubação natural. Efetuou-se morfometria e os embriões foram submetidos à técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens. A carapaça é composta por 8 pares de ossos costais, 11 pares de costelas, 7 ossos neurais, onze pares de ossos periféricos, 1 osso nual que forma a parte cranial da carapaça, 1 osso supra-pigal e 1 osso pigal que forma a parte caudal da carapaça. No estágio 16 estão presentes centros de ossificação do segundo ao sétimo par de costelas. No estágio 19, iniciam-se expansões ósseas nas costelas mais craniais. Os ossos neurais começam a se ossificar no estágio 20, seguindo do osso nual no estágio 21. No estágio 23 o primeiro par de ossos periféricos apresentam centros de ossificação. No estágio 26, os ossos supra-pigal e o pigal iniciam o processo de ossificação. A aproximação dos ossos que formam a armadura rígida da carapaça, só ocorre depois de 46 dias da eclosão.

Palavras-chave: Carapaça, *Podocnemis expansa*, Répteis, Ossificação.

**BONE ONTOGENY OF THE CARAPACE OF THE GIANT AMAZON RIVER
TURTLE *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE)**

ABSTRACT - Brazil has the richest fauna in all of Central and South America, but most of the information about reptiles is still incomplete. *Podocnemis expansa*, known popularly as the giant Amazon river turtle, is widely distributed through the basin of the Amazon and its tributaries. To investigate the sequence of the formation of the bone elements comprising the carapace in the various stages of pre- and post-natal development in *P. expansa*, embryos and newborns were collected, starting from the 18th day of natural incubation. Biometric measurements were taken and the embryos were subjected to the clearing technique and to bone and cartilage staining. The carapace is composed of 8 pairs of costal bones, 11 pairs ribs, 7 neural bones, 11 pairs of peripheral bones, 1 nuchal bone that is part of the cranial portion of the carapace, 1 suprapigal bone, and 1 pigal bone that forms the caudal part of the carapace. In stage 16, ossification centers are present in the first seven pairs of ribs. In stage 17, the last pair of ribs begins to ossify. The bone expansions in the more cranial ribs begin in stage 19. The neural bones begin to ossify in stage 20, followed by the nuchal bone in stage 21. The first pair of peripheral bones presents ossification centers in stage 23, while the ossification process in the suprapigal and pigal scutes begins in stage 26. The bones that form the rigid armor of the carapace only begin to come together 46 days after hatching.

Key words: Carapace, *Podocnemis expansa*, Reptile, Ossification.

INTRODUÇÃO

A fauna de Testudines no Brasil é bastante diversificada, entretanto, Ribas e Monteiro Filho (2002) e Rodrigues (2005) ressaltam o quanto a literatura herpetológica de modo geral é casual na América do Sul, sendo aquela referente à Testudines particularmente incipiente. Deste modo, a biologia das espécies neotropicais é pouco conhecida, assim como a morfologia, salienta Machado Júnior et al. (2006).

A *Podocnemis expansa* é uma das representantes da família podocnemididae, habita as baías de grandes rios como o Amazonas e seus afluentes. Entretanto algumas descrições morfológicas já foram realizadas. Isto tem sido demonstrado nas contribuições de Malvásio et al. (2002) e Santos et al. (2003), na descrição da morfologia dos órgãos reprodutores e morfologia do coração e comportamento da artéria coronária, respectivamente. O esqueleto de algumas espécies de testudines já é tema de estudos anatômicos (GAFFNEY, 1990). No entanto, o conhecimento do tempo de ossificação da carapaça fica restrito a poucas espécies, como *Chelydra serpentina* (SHEIL; GREENBAUM, 2005; GILBERT et al., 2001), *Apalone spinifera* (SHEIL, 2003), *Trachemys scripta*. (GILBERT et al., 2001).

Para Gilbert et al. (2001), o casco dos Testudines é uma novidade evolutiva e tem valor adaptativo. É formado por duas partes principais, a dorsal que corresponde à carapaça e a ventral que corresponde ao plastrão, o qual é ligado a carapaça por pontes laterais. O esqueleto da carapaça é composto por um mosaico de ossos dérmicos e uma camada epidérmica de queratina externa, também chamada de escudo. Cada escudo cobre uma área particular do mosaico ósseo (ALIBARDI; THOMPSON 1999a e 1999b). O estudo do esqueleto em Testudines tem sido muito útil para o entendimento de adaptações ao ambiente, assim como para a utilização nas análises filogenéticas. Pode também fornecer valiosas informações aplicáveis às análises cladísticas.

O presente trabalho tem por objetivos a descrição da seqüência de formação dos elementos ósseos, que compõem a carapaça, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

62 embriões e 43 filhotes recém-nascidos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos nos períodos de desova ocorridos em 2005 e 2006 na área de reprodução protegida pelo IBAMA/RAN (Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios), nas praias do Rio Araguaia – Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13° 20' 38,7" S e 50° 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN.

Amostras de ovos e filhotes foram coletadas aleatoriamente, de um ninho escolhido ao acaso, até a eclosão. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni *et al.* (1990). Após a eclosão, os filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos com temperatura em torno de 27 °C e alimentados com ração para peixes.

Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se morfometria (Quadro 1 e 2) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta), precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, altura, comprimento crânio-caudal e peso corporal, seguindo-se a orientação de Malvásio *et al.* (2002a) e Dani *et al.* (1990).

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red S e da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem a carapaça (Figura 3 e 4), foram analisados em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus) e câmera fotográfica digital

(fe100, Olympus 6.0). Ainda, dois desenhos representativos da carapaça, foram confeccionados (Figuras 1 e 2).

RESULTADOS

Osteologia da carapaça

Ossos neurais: O osso neural 1 é alongado craniocaudalmente e estreito lateralmente, quando comparado com os demais. Sua margem cranial se articula com o osso nuchal, sendo ligeiramente mais estreita que a margem caudal. Toda a extensão das margens laterais se articula com o primeiro par de ossos costais. A face caudal se articula com o segundo osso neural. Nos demais ossos neurais, a margem cranio lateral de cada placa se articula com o osso costal posicionado mais cranialmente a esta, enquanto a face caudolateral se articula com o respectivo osso costal. Os ossos neurais 2 e 3 são mais longos que largos e apresentam formato hexagonal, sendo as faces cranio laterais reduzidas em tamanho se comparadas às faces caudolaterais. De forma geral, os ossos neurais 4, 5 e 6 são hexagonais, sendo mais curtos craniocaudalmente que os anteriores. O osso neural 7 é o último da série neural e possui formato pentagonal (Figura 2).

Ossos costais: O osso costal 1 é mais largo craniocaudalmente que os demais ossos costais. A sua margem cranio lateral possui um formato curvo e se articula com os ossos nuchal, cranio medialmente e periféricos 1, 2, 3 e 4, lateralmente; a margem medial se articula com os ossos neurais 1 e 2. De forma geral, os contatos laterais, caudais e craniais dos ossos costais, assim como o seu formato, não possuem grandes variações dentre os demais. Os ossos costais de 2 a 8 são semelhantes em seus formatos retangulares, sendo os mais caudais ligeiramente inclinados caudalmente. A margem medial dos ossos costais de 2 a 6 ainda se articula com os ossos neurais, enquanto o osso costal 7 se articula com o osso neural 7 e com o osso costal contralateral. O osso costal 8 se articula, medialmente, com osso costal contralateral e com o osso supra-pigal (Figura 2).

Costelas: Possui onze pares de costelas, que servem como base para o desenvolvimento dos ossos costais (Figura 1).

Osso nugal: Possui forma trapezoidal, com a margem caudal mais larga. A margem cranial participa da formação da borda da carapaça. A margem caudal articula-se com o primeiro par de ossos costais e com o osso neural 1. As margens laterais articulam-se com o primeiro par de ossos periféricos (Figura 2).

Osso supra-pigal: É um osso impar com formato triangular. Craniolateralmente articula-se com a margem caudal do último par de ossos costais. Caudalmente articula-se com o osso pigal e com o par de ossos periféricos 11 (Figura 2).

Osso pigal: O osso pigal participa da formação da borda caudal da carapaça. Cranialmente articula-se com a margem caudal do supra-pigal e lateralmente articula-se com o par de ossos periféricos 11 (Figura 2).

Ossos periféricos: São onze pares de ossos periféricos que se articulam com os seus correspondentes craniais e caudais e medialmente com os ossos costais. O primeiro par de ossos periféricos se articula com o osso nugal e o último par com os ossos pigal e supra-pigal. De cada lado, os 11 ossos periféricos formam a borda lateral da carapaça (Figura 2).

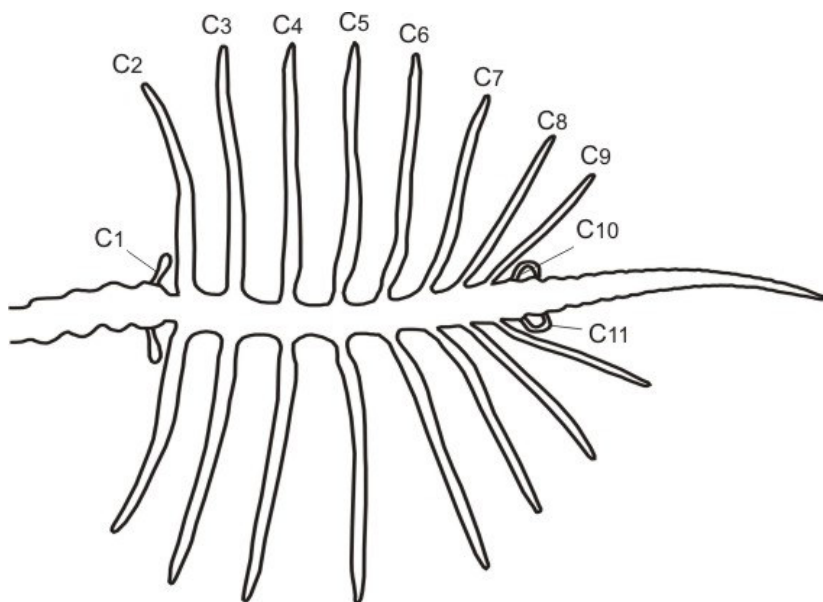


Figura 1: Desenho esquemático das costelas de embrião de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. C, costela.

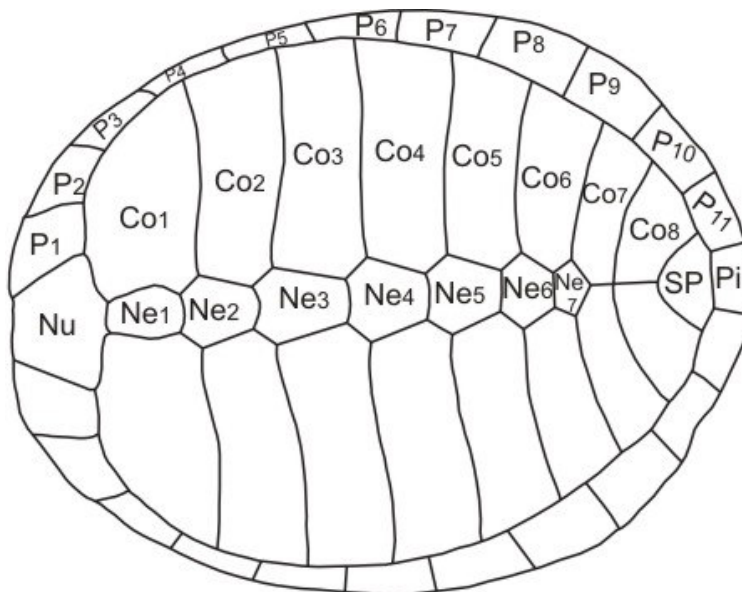


Figura 2: Desenho esquemático da carapaça de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. Co, osso costal; Ne, osso neural; Nu, osso nucal; SP, osso supra-pigal; Pi, osso pigal, P, osso periférico.

Seqüência de ossificação da carapaça

Foi observada coloração com alcian blue somente nas costelas, indicando que nesses elementos ocorre ossificação do tipo endocondral (Figuras 2A e B).

No estágio 16 estão presentes centros de ossificação do segundo ao sétimo par de costelas, sendo que os três últimos pares apresentam menor grau de retenção do corante alizarina. No início do estágio 17 o oitavo par de costelas já mostra centros de ossificação (Figuras 3A e B) e no estágio 23 o primeiro par apresenta centros de ossificação.

No final do estágio 19, iniciam-se expansões ósseas nas costelas mais craniais, que parecem orientar o desenvolvimento dos ossos costais. Isto sugere que o osso costal de *Podocnemis expansa* seja derivado da costela. No estágio 23 é possível perceber que essa ossificação progride de forma não uniforme e nesse mesmo estágio os ossos costais mais craniais começam a se fundir, no sentido mediolateral (Figuras 4C e F).

No estágio 20, são visíveis centros de ossificação nos ossos neurais 3 a 6. No estágio 21, todos os ossos neurais e o osso nuchal já apresentam centros de ossificação. No estágio 23, o primeiro par de ossos periféricos apresenta centros de ossificação (Figuras 4D, E e F).

No estágio 25, o segundo par de ossos periféricos apresenta centro de ossificação, seguido do terceiro ao oitavo par de ossos periféricos no estágio 26. Nesse mesmo estágio, ainda são observados centros de ossificação no osso supra-pigal e no pigal (Figuras 4A e B).

Do nono ao décimo primeiro par de ossos periféricos, os centros de ossificação surgem apenas cinco dias após eclosão. A aproximação dos ossos, que formam a armadura rígida da carapaça, somente ocorre depois de 46 dias da eclosão (Figuras 5C, D, E e F).

A ossificação na região lateral da carapaça é mais demorada e forma as fontanelas (espaços) entre os ossos costais e os ossos periféricos. O desenvolvimento ósseo da carapaça ocorre, ao mesmo tempo, nos sentidos craniocaudal e mediolateral (Figura 5).

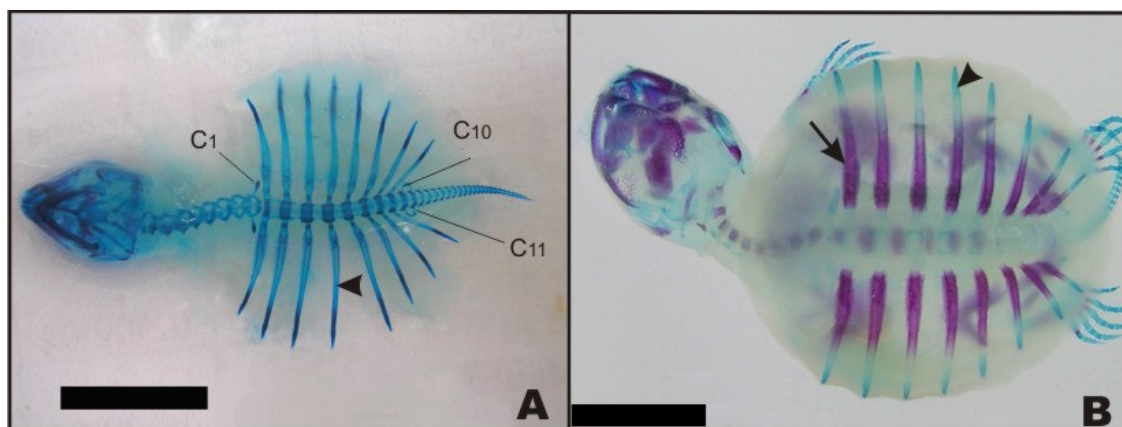


Figura 3: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista ventral. **(A)**, estágio 15. **(B)**, estágio 17. Seta, início de ossificação; cabeça de seta, cartilagem. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A)x7. Barra: 10mm.

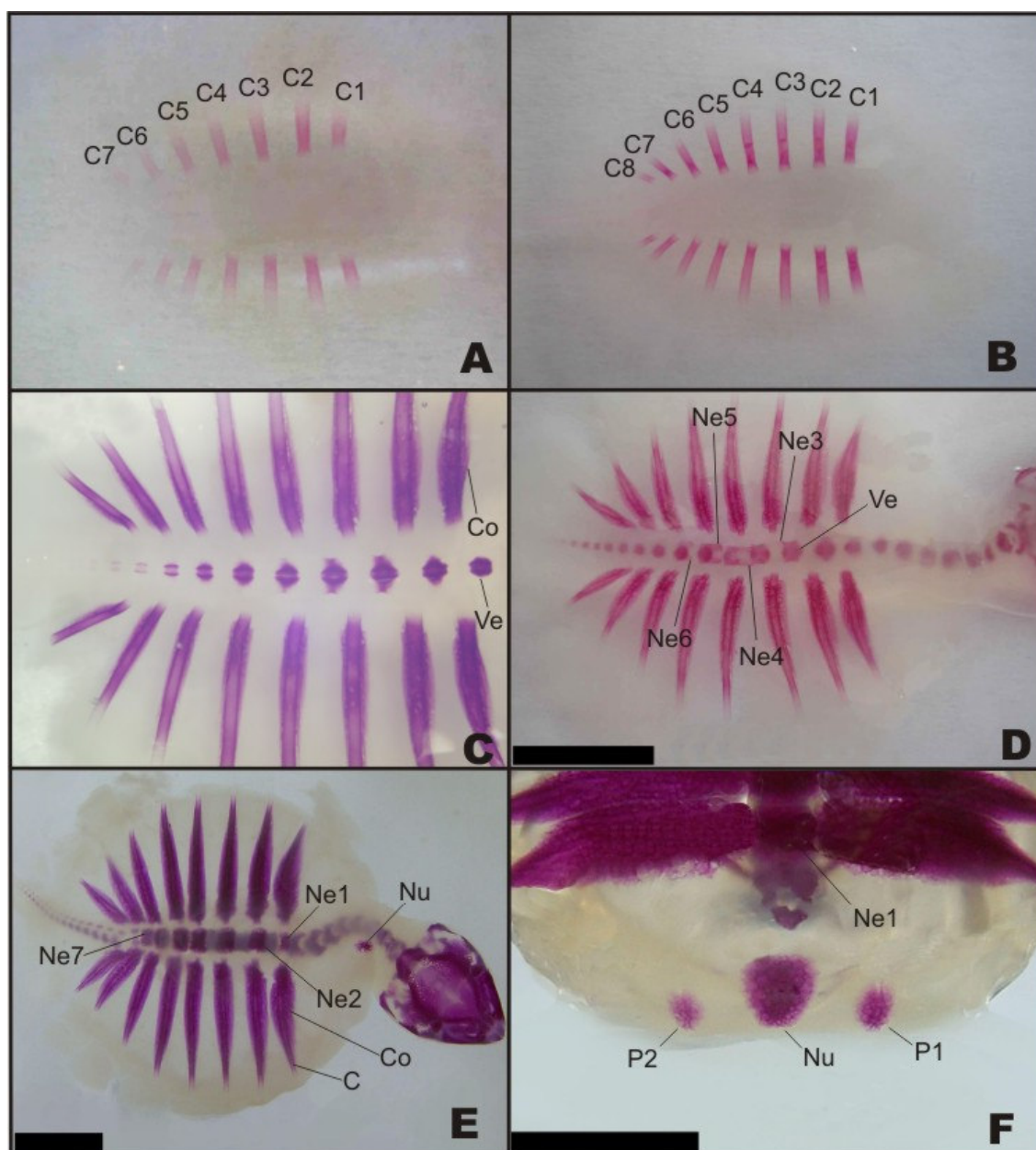


Figura 4: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista dorsal. **(A)** estágio 16. **(B)** estágio 17 - Desenvolvimento das costelas. **(C)** estágio 19. **(D)** estágio 20 - desenvolvimento dos ossos costais e ossos neurais. **(E)** estágio 21. **F**, final do estágio 23. C, costela; Co, osso costal; Ve, vértebra; Ne, osso neural; Nu, osso nuchal; Pi, osso pigal; SP, osso supra-pigal. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A, B e C)x7. Barra - 10 mm.

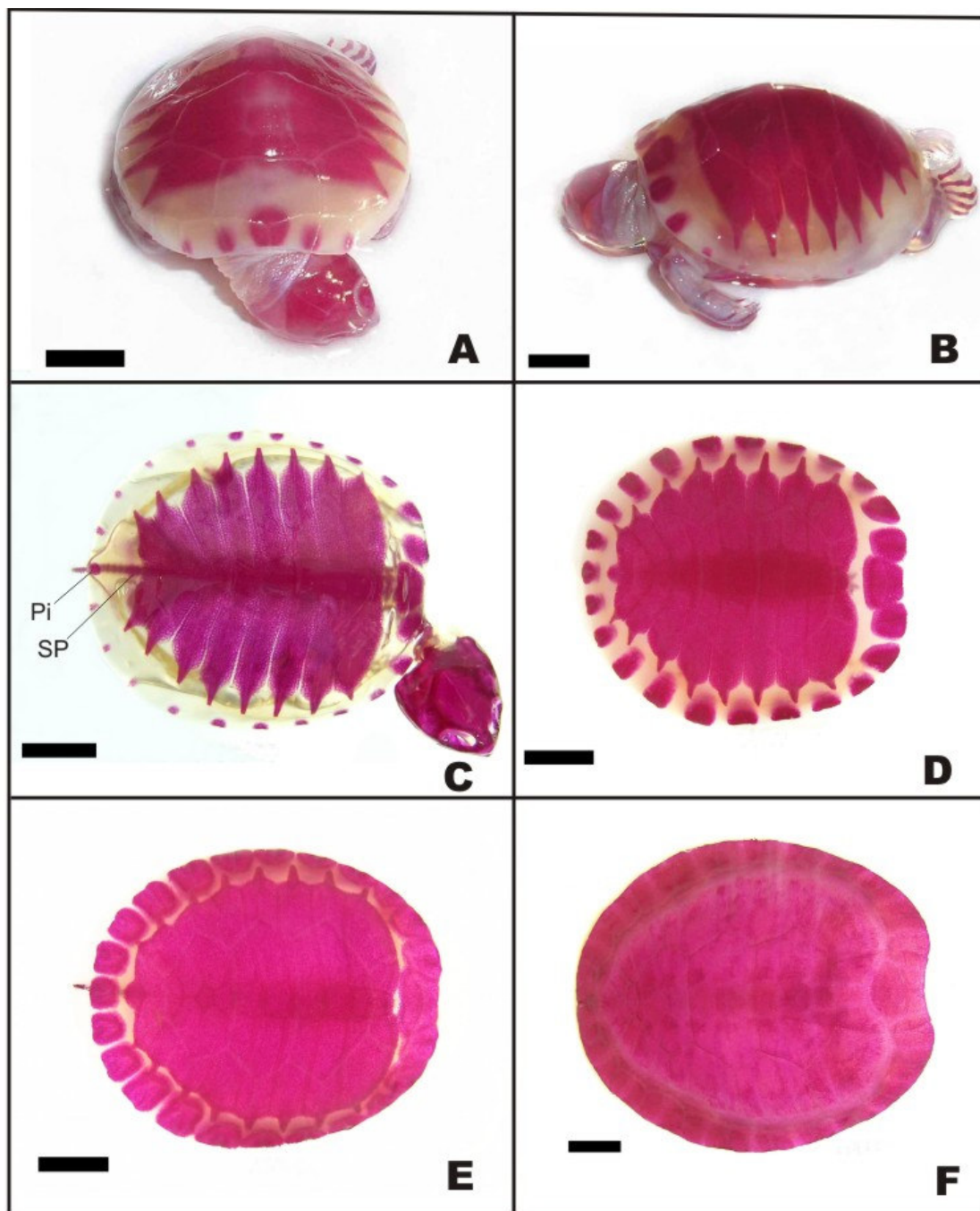


Figura 5: Fotografias de embriões e filhotes de *P. expansa*, vista dorsal. (A) estágio 25. (B) estágio 26 - desenvolvimento dos ossos periféricos. (C) 5º dia após eclosão - desenvolvimento dos ossos periféricos, pigal e supra-pigal. (D) 18º dia após eclosão. (E) 43º dia após eclosão. (F) 46º dia após eclosão - desenvolvimento da carapaça. P, ossos periféricos; Nu, osso nucal; SP, osso supra-pigal; Pi, osso pigal. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S. Barra - 10 mm.

DISCUSSÃO

Segundo França (2004), o formato da carapaça é bastante variável dentre os pleurodiros. Broin (2000) sugere que a morfologia geral pode variar ontogeneticamente de mais arredondada em juvenis a mais alongada, em adultos de alguns podocnemidídeos. Em *A. spinifera* (Sheil, 2003), a carapaça possui nove pares de costelas e 22 placas dérmicas projetando dorsalmente (costais, neurais e uma nugal). Fato interessante na anatomia desse Testudine é que as margens distais das costelas 2 a 8 estendem-se além das margens laterais dos ossos dérmicos, formando fontanelas que são recobertas por membranas dos escudos epidérmicos. Wyneken ([1998?]) também ressalta que a fontanela é completamente fechada por osso em algumas tartarugas adultas, mas em outras espécies essa fontanela se mantém caudolateralmente. Característica que não é compartilhada com *P. expansa*.

Em *T. scripta* (Gilbert et al., 2001), as costelas se apresentam completamente cartilaginosas, só mais tarde, a região central começa a se ossificar, sendo as costelas os primeiros ossos da carapaça a iniciar o processo de ossificação. O mesmo ocorre em *P. expansa*, onde as costelas se desenvolvem na região central e no sentido crânio-caudal. Em *C. serpentina* e *A. spinifera*, as costelas também são as primeiras a desenvolver-se, a ossificação é maior na região cranial indicando que o sentido é também crânio-caudal (SHEIL; GREENBAUM, 2005; SHEIL, 2003).

Com exceção de alguns ossos periféricos, o desenvolvimento dos ossos dérmicos da carapaça de *P. expansa* ocorre ainda no período embrionário, diferentemente do apresentado por Gilbert et al. (2001), para *T. scripta*. Embora as costelas destes animais comessem a se ossificar ainda no período embrionário os ossos dérmicos da carapaça se desenvolvem depois da eclosão, como aparecimento de pequenos centros de ossificação nas margens das costelas mais craniais e uma extensão de osso na região nugal.

Após o início do desenvolvimento ósseo das costelas de *P. expansa*, surgem, ao redor desses ossos, centros de ossificação, que parecem orientar o desenvolvimento dos ossos costais no sentido crânio-caudal, assim como informaram Gilbert et al. (2001) e Kalin (1945) para as espécies *C. serpentina* e *T. scripta*. Gilbert et al. (2001) e Sheil e Greenbaum (2005) ainda observaram que, em

C. serpentina, o contato entre os ossos costais adjacentes não ocorre até que a carapaça alcance um comprimento de aproximadamente 4 cm. Segundo Sheil (2003), em *A. spinifera*, o osso nual da carapaça e os ossos costais se desenvolvem junto com as costelas, não especificando uma seqüência precisa entre esses ossos.

Suzuki (1963) informou que os ossos neurais são os primeiros ossos dérmicos a mostrar sinais de ossificação na carapaça de *T. scripta*. Por outro lado, em *P. expansa*, a ossificação dos ossos costais está mais adiantada do que os ossos neurais, o que também foi observado por Gilbert et al. (2001) nos estudos com *T. scripta* e *C. serpentina*. Nessas espécies, os ossos neurais são formados em associação com as espinhas neurais das vértebras torácicas.

Em *C. serpentina* (RIEPEL, 1993a), os ossos neurais começam a se desenvolver durante o período embrionário, no entanto, existe muita variação na sincronização de desenvolvimento ósseo dentro dessa espécie. No entanto, Rieppel (1993b) conclui que o padrão de ossificação visto em *C. serpentina* não pode ser típico de todos os Testudines.

Além dos centros de ossificação nos ossos nual, costal e neural, a ossificação dos ossos periféricos também é iniciada somente nos recém eclodidos em *T. scripta*, diferentemente do que ocorre em *P. expansa*, onde a ossificação desses ossos inicia-se ainda no período embrionário. Gilbert et al. (2001) afirmam que os centros de ossificação nos ossos periféricos começam na região cranial da carapaça. Estes centros de ossificação formam a borda da carapaça e se expandem tanto em direção aos ossos periféricos vizinhos como em direção aos ossos costais, durante o crescimento, assim como acontece na *P. expansa*. O osso pigal é formado depois do último par de ossos periféricos, sendo, portanto, o último osso a ossificar-se. Já em *C. serpentina* os ossos periféricos começam a se ossificar após o osso nual.

Em *P. expansa*, a seqüência de ossificação difere das demais espécies de Testudines estudados. Porém, o sentido de progressão da ossificação é o mesmo, ou seja, crânio-caudal.

Atenção considerável se faz necessário para documentar os eventos da seqüência de formação óssea durante a ontogenia, devido o alto potencial de variação intraespecífica e interespecífica, nas espécies aqui analisadas.

CONCLUSÕES

Em *Podocnemis expansa*, a carapaça é formada por 1 osso nual, 7 ossos neurais, 1 osso pigal, 1 osso supra-pigal, 8 pares de costelas, 8 pares de ossos costais e 11 pares de ossos periféricos.

A seqüência de ossificação ocorre na seguinte ordem: costelas>ossos costais>ossos neurais>osso nual>ossos periféricos>osso supra-pigal>osso pigal e o sentido é crânio-caudal.

Não existe um modelo de ossificação para todos os Testudines até agora estudados.

REFERÊNCIAS

ALIBARDI, L.; THOMPSON, M. B. Morphogenesis of shell and scutes in the turtle *Emydura macquarii*. **Australian Journal of Zoology**, Melbourne, v. 47, p. 245-260, 1999a.

ALIBARDI, L.; THOMPSON, M. B. Epidermal differentiation during carapace and plastron formation in the embryonic turtle *Emydura macquarii*. **Journal of Anatomy**, London, v. 194, p.531-545, 1999b.

BROIN, F. The oldest pre-podocnemidid turtle (Chelonii, Pleurodira), from the early Cretaceous, Ceará State, Brasil, and its environment. **Treballs del Museu de Geologia de Barcelona**. Madrid, v. 9, p. 43-95, 2000.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*,

pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**. Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

FRANÇA, A. G. **Osteologia de um quelônio fóssil (Pleurodira, Podocnemidae) do cretáceo superior (maastrichtiano) de Minas Gerais, Brasil**. 2004. 80F. Dissertação (Monografia em Ciências Biológicas) – Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GAFFNEY, E. S. The comparative osteology of the Triassic turtle *Proganochelys*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 194, p.1-263, 1990.

GILBERT, S. F., G. A. LOREDO, A. BRUKMAN,; A. C. BURKE. Morphogenesis of the turtle shell: the development of novel structure in tetrapod evolution. **Evolution & Development**, Malden, v. 3, p.47–58, 2001.

KALIN, J. Zur morphogenese des panzers bei den schildkroten. **Acta Anatomica**. Basel, v. 1, p.144-176. 1945.

MACHADO JÚNIOR, A.A.N.; SOUSA, A.L.; SANTOS, F.C.F.; PEREIRA, J.G. Morfologia dos órgãos genitais femininos do muçua (*Kinosternon scorpioides*). **Archives of Veterinary Science**. Curitiba, v. 11, n. 2, p. 25-29, 2006.

MALVÁSIO, A.; SOUZA, A.M.; GOMES, N.; SAMPAIO, F.A. A.; MOLINA, F. B. Morfometria e morfologia do canal alimentar pós-faríngeo de *Trachemys dorbignyi*

(Duméril & Bibron, 1835), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812.), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Anapsida, Testudines).

Instituto Pau Brasil, São Paulo, v. 5, p. 39-51, 2002a.

MALVASIO, A.; SOUZA, A. M.; REIS, E. S.; FARIAS, E.C. Morfologia dos órgãos reprodutores de recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Instituto Pau Brasil**, São Paulo, n. 27-37, 2002b.

RIBAS, E. R.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. Distribuição e habitat das tartarugas de água-doce (Testudines, Chelidae) do Estado do Paraná, Brasil. **Biociências**, Maceio, v.10, n.2, p. 15-32, 2002.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993a.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. IV. The homology of the reptilian (amniote) astragalus revisited. **Journal of Paleontology**, Tulsa, v. 13, p. 31-47, 1993b.

RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, São Paulo, v. 1, n 1, p. 87-94, 2005.

SANTOS, A. L. Q.; ALVARENGA, J. R.; MORAES, F. M.; AVILA JUNIOR, R. H.; CARVALHO, S. F. M.; MAGALHÃES, L. M.; ANDRADE, M. B.; MARQUES, F. K.; DENADAI, J. Morfologia externa, topografia do coração e comportamento da artéria coronária de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812). **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 103-108, 2003.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p. 42-78, 2003a.

SUZUKI, H. K. Studies on the osseous system of the slider turtle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 109, 351-410, 1963.

WYNEKEN, J. **The Anatomy sea turtles**. [1998?]. Disponível em <<http://www.ivis.org/advances/wyneken/toc.asp>>. Acesso em: 15 Jun. 2007.

CAPÍTULO 6 - ONTOGENIA DOS OSSOS DO PLASTRÃO EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO - A *Podocnemis expansa* é conhecida popularmente como tartaruga-da-Amazônia e é considerada uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente. Com objetivo de se investigar a seqüência de formação dos elementos ósseos que formam o plastrão, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, coletaram-se embriões e filhotes, a partir do 18º dia de incubação natural. Efetuou-se biometria e os embriões e filhotes foram submetidos à técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens. Os ossos epiplastrão, endoplastrão, hioplastrão, hipoplastrão, xifiplastrão e o mesoplastrão formam o plastrão desse testudines. No estágio 16 observam-se centros de ossificação na grande maioria dos ossos do plastrão. De acordo com a retenção do corante alizarina a seqüência é: primeiro o hioplastrão e o hipoplastrão, depois o endoplastrão, seguido do xifiplastrão e por último o mesoplastrão. O osso epiplastrão mostra-se com centro de ossificação apenas no estágio 20. Todos esses elementos possuem centros de ossificação independentes e se unem posteriormente. O fechamento do plastrão só ocorre depois de sete meses após a eclosão.

Palavras-chave: Plastrão, *Podocnemis expansa*, Reptilia, Ossificação.

BONE ONTOGENY OF THE PLASTRON OF THE GIANT AMAZON RIVER TURTLE *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

ABSTRACT: The *Podocnemis expansa* is known popularly as the giant Amazon river turtle and is considered one of the wild species more exploited most in zoo technology. With the objective of investigating the formation sequence of the bony elements which form the plastron/breastplate, in the different pre and post natal development stages, embryos and nestlings were collected, as from the 18th day of natural incubation. Morphometrics occurred and the embryos and nestlings were submitted to the diafanization and coloration technique of bones and cartilages. The epiplastron, endoplastron, hioplastron, hipoplastron, xifiplastron and the mesoplastron bones form the breastplate of these turtles. In stage 16 ossification centers are observed in the great majority of the breastplate bones. With regard to the retention of the alizarin the sequence is: first the hioplastron and the hipoplastron, then the endoplastron, followed by the xifiplastron and lastly the mesoplastron. The epiplastron bone shows itself with ossification center in stage 20 only. All these elements have independent ossification centers and they join together later. The closing of the breastplate only takes place seven months after hatching

Key words: Plastron, *Podocnemis expansa*, Reptile, Ossification.

INTRODUÇÃO

Os Testudines possuem uma característica morfológica altamente singular entre os tetrápodes e há muito tempo tem despertado a curiosidade de vários pesquisadores (GILBERT et al., 2001). São répteis que possuem o corpo encaixado em um casco ósseo, onde a porção dorsal é chamada carapaça e a porção ventral plastrão, são recoberto por uma camada de placas epidérmica especializada e dura. Essa estrutura varia entre as espécies de Testudines e regiões do corpo. (POUGH et al., 2003; ALIBARDI, 2002).

A carapaça e o plastrão são de origem da crista neural (CLARK et al., 2001) e vários genes estão envolvidos no desenvolvimento do casco (VINCENT et al., 2003; KURAKU et al., 2005; MYERS et al., 2006). Para Clark et al. (2001), isso fortalece a hipótese de que o exoesqueleto dos vertebrados é de origem das células da crista neural.

Segundo Mader et al. (2006), os pontos de união entre os escudos de queratina não são alinhados com as suturas entre as placas ósseas subjacentes e esse arranjo gera maior resistência ao casco.

Estudos anatômicos sobre o esqueleto dos répteis já vêm sendo realizados há muito tempo. No entanto, o conhecimento do critério biológico para a sequência de formação óssea é restrito a poucas espécies. Isto tem sido demonstrado nas contribuições de Rieppel (1993a), Rieppel (1993b) e Sheil (2005), no estudo da ossificação do esqueleto de *Alligator mississippiensis*, de *Chamaeleo hoehnelii* e de *Macrochelys teminckii*, respectivamente.

O corante alizarina red S tornou-se universal para a coloração óssea, por suas propriedades seletivas. Moriguchi et al. (2003) elucidaram o mecanismo de adsorção da coloração do osso com esse corante, por microespectroscopia, e comprovaram sua eficácia pela detecção de depósitos de cálcio na reação de coloração. Alguns pesquisadores já estudaram a sequência de ossificação do plastrão com esse método de coloração dos ossos, como nas espécies *Chelydra serpentina* (RIEPPPEL, 1993c), *Apalone spinifera* (SHEIL, 2003) e *Trachemys scripta* (GILBERT et al, 2001).

A espécie *Podocnemis expansa*, conhecida popularmente como tartaruga-da-amazônia, tem sua distribuição no rio Amazonas e em quase todos os seus afluentes (MUNDIM et al., 1999). É considerada uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente (LUZ et al., 2003). Segundo Alho et al. (1979) é o maior Testudine de água doce da América do Sul e atualmente está classificada sob ameaça de extinção, de acordo com a CITES¹ e IUCN².

O presente trabalho tem por objetivos descrever a sequência de formação dos elementos ósseos, que compõem o plastrão, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

62 embriões e 43 filhotes recém-nascidos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos nos períodos de desova ocorridos em 2005 e 2006 na área de reprodução protegida pelo IBAMA/RAN (Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios), nas praias do Rio Araguaia – Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13° 20' 38,7" S e 50° 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN.

Amostras de ovos e filhotes foram coletadas aleatoriamente, de um ninho escolhido ao acaso, até a eclosão. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni *et al.* (1990). Após a eclosão, os filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos com temperatura em torno de 27 °C e alimentados com ração para peixes.

Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se morfometria (Quadro1 e 2) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta), precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, altura, comprimento

¹ Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

² International Union for Conservation of Natures and Natural Resources

crânio-caudal e peso corporal, seguindo-se a orientação de Malvásio et al. (2002) e Dani et al. (1990).

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red S e da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem o plastrão (Figuras 2, 3 e 4), foram analisados em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus) e câmera fotográfica digital (fe100, Olympus 6.0). Ainda, dois desenhos representativos do plastrão foram elaborados, utilizando-se para tal seis esqueletos de *P. expansa* adultos do acervo do LAPAS (Figura 1).

RESULTADOS

Osteologia do plastrão

Epiplastrão: O par de epiplastrão possui formato de segmento de arco e forma a borda cranial do plastrão. Articula-se, medialmente, com o seu contralateral, com a margem craniolateral do endoplastrão e com a margem craniolateral do hioplastrão (Figura 1).

Endoplastrão: É um osso impar, localizado medialmente com formato de losango. Articula-se com as margens caudomediais dos ossos epiplastrões e com as margens craniomediais dos ossos hioplastrões (Figura 1).

Hioplastrão: É um osso par e amplo com formato irregular na margem lateral. Cada hioplastrão se articula, medialmente, com o seu contralateral, com a margem caudomedial do endoplastrão, com a margem caudolateral do epiplastrão, com a margem cranial do hipoplastrão e caudolateralmente se articula com o mesoplastrão. O osso hioplastrão possui uma projeção óssea dorsal, a ponte cranial, que se articula com o osso costal 1, conectando o plastrão à carapaça. O hioplastrão une-se, ainda, aos ossos periféricos 3, 4 e 5 (Figura 1).

Hipoplastrão: É um osso par e amplo com formato irregular na margem lateral. Cada hipoplastrão se articula, medialmente, com o seu contralateral, com a margem caudal do hioplastrão, com a margem cranial do xifiplastrão e craniolateralmente com o mesoplastrão. O osso hipoplastrão possui uma projeção óssea dorsal, a ponte caudal, que se articula com o osso costal 5, conectando o plastrão a carapaça. O hipoplastrão une-se, ainda, aos ossos periféricos 6, 7 e 8 (Figura 1).

Mesoplastrão: O par de mesoplastrões possui formato quadrangular e se localiza lateralmente no plastrão. Articula-se com a margem caudolateral do hioplastrão e com a margem craniolateral do hipoplastrão (Figura 1).

Xifiplastrão: O xifiplastrão é também um osso par. Possui formato aproximadamente retangular, com a face caudal menor do que a cranial e forma a borda caudal do plastrão. Presença da incisura caudal (região caudomedial), pouco desenvolvida nas fêmeas e com formato de “U” nos machos. A face dorsal do xifiplastrão apresenta uniões com a cintura pelvina, representadas pelas cicatrizes púbica (cranial) e isquiática (caudal). Cada xifiplastrão se articula, medialmente, com o seu contralateral e com a margem caudal do osso hipoplastrão (Figura 1).

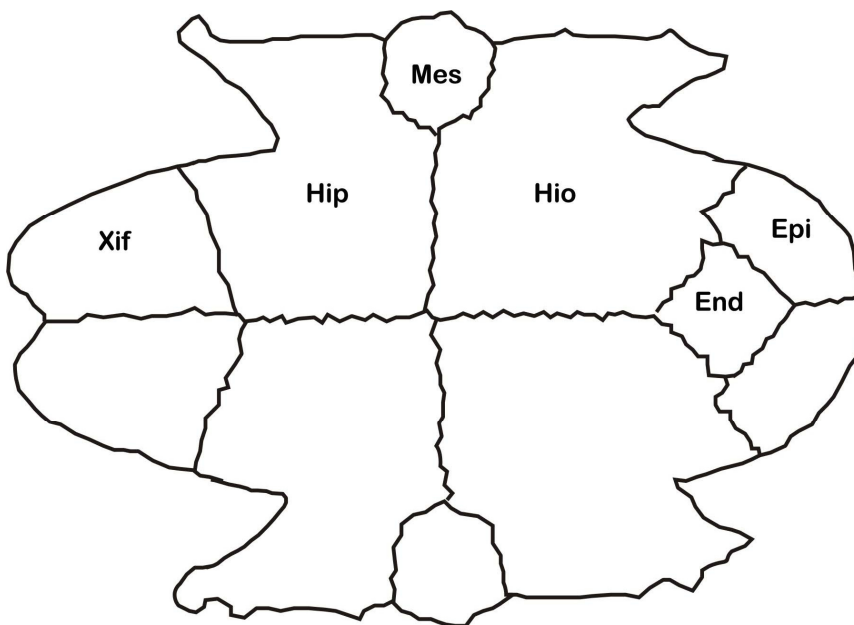


Figura 1: Desenho esquemático dos elementos ósseos do plastrão de *Podocnemis expansa* adulta. Vista dorsal. Epi, Epiplastrão; End, Endoplastrão; Hio, Hioplastrão; Mês, Mesoplastrão; Hip, Hipoplastrão; Xif, Xifiplastrão.

Seqüência de ossificação do plastrão

Nenhuma coloração com alcian blue foi observada nos ossos do plastrão durante o desenvolvimento. Os elementos do plastrão começam a se ossificar durante a vida embrionária, e na *P. expansa*, o futuro plastrão pode ser identificado por 11 centros de ossificação na região ventral (Figura 2).

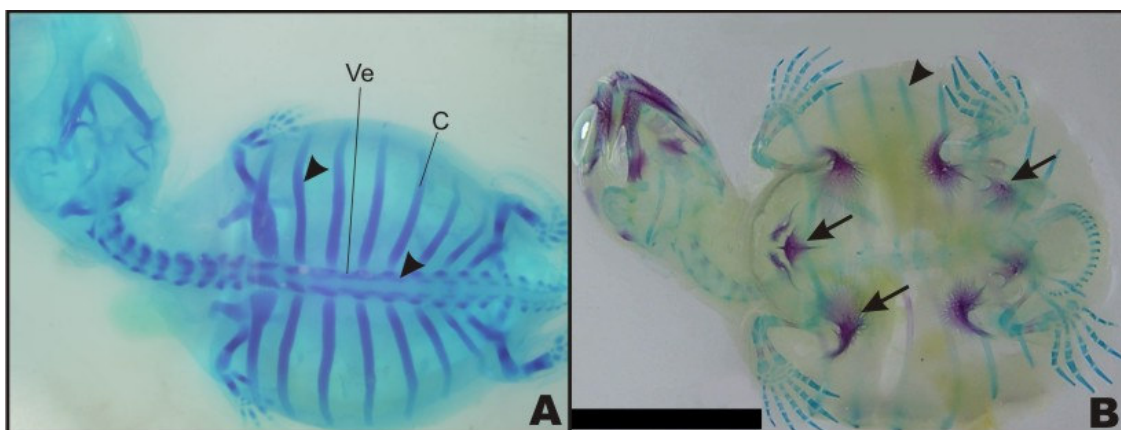


Figura 2: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista ventral. **(A)** estágio 15. **(B)** estágio 17. Ve, vértebra; C, costela, setas, início de ossificação; cabeça de seta, cartilagem. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. Aumento: (A)x7. Barra: 10mm.

No estágio 16 observam-se centros de ossificação na grande maioria dos ossos do plastrão. De acordo com a retenção de corante alizarina, a seqüência segue assim: primeiro o hioplastrão e o hipoplastrão, depois o endoplastrão, seguido do xifiplastrão e por último o mesoplastrão (Figura 3A).

O osso epiplastrão mostra-se com centro de ossificação apenas no estágio 17. Todos esses elementos possuem centros de ossificação independentes e seguem o desenvolvimento de forma irregular, principalmente o hioplastrão e o hipoplastrão. Estes formam espículas ósseas que se encaixam, tanto na linha

mediana com o osso contralateral, quanto entre ossos vizinhos e, unem-se posteriormente (Figuras 3B e C).

Durante o desenvolvimento ósseo do plastrão duas fontanelas são formadas. Uma cranial, entre os ossos hioplastrões, caudolateralmente, e o osso endoplastrão, cranialmente, e outra caudal, entre o hioplastrão, cranialmente, o hipoplastrão, lateralmente, e o xifiplastrão, caudalmente. A fontanela caudal é maior e permanece durante todo o período embrionário (Figura 4).

No sexto mês pós-natal, em condições ideais de criação, ainda é vista uma pequena área irregular central com ausência de ossificação, a fontanela caudal, que corresponde às partes mediais dos ossos hioplastrões e partes mediais dos ossos hipoplastrões. Somente depois de sete meses pós-natal foi observado o fechamento completo dessa fontanela (Figura 4F).



Figura 3: Fotografias de embriões de *P. expansa*, vista ventral. **(A)** estágio 16: Desenvolvimento do endoplastrão, hioplastrão, hipoplastrão, xifiplastrão e mesoplastrão. **(B)** estágio 17: Desenvolvimento do epiplastrão. **(C)** estágio 20: Desenvolvimento de todos os elementos ósseos do plastrão. Epi, epiplastrão; End, endoplastrão; Hio, hioplastrão; Hip, hipoplastrão; Mes, mesoplastrão e xif, xifiplastrão. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S. Aumento: (A)x7; (B)x32. Barra: 10 mm.

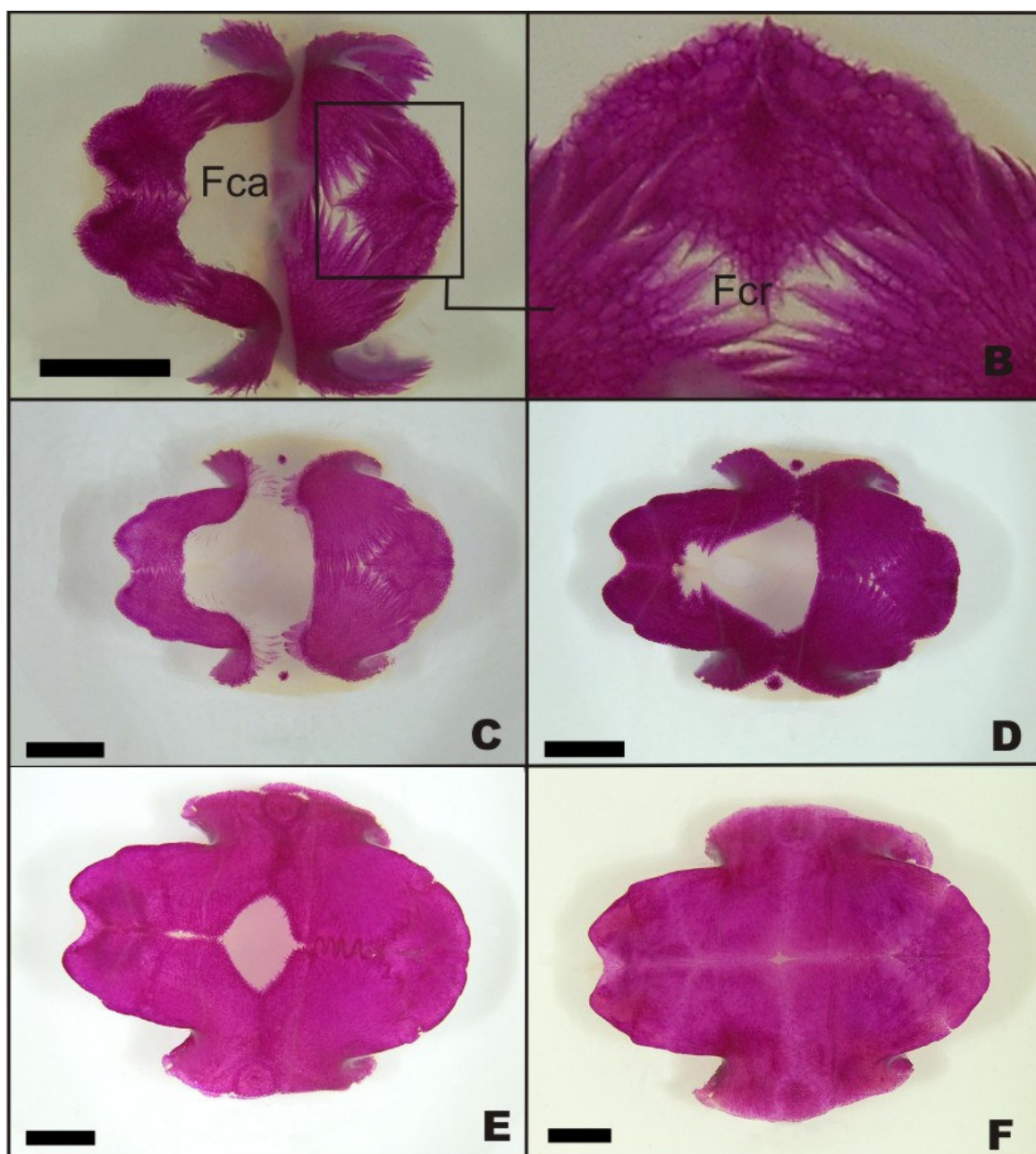


Figura 4: Fotografias de embriões e filhotes de *P. expansa*, vista ventral. (A) e (B) estágio 24; (C) 5º dia após eclosão, (D) 17º dia após eclosão, (E) 53º dia após eclosão, (F) 7º mês após eclosão: Fechamento do plastrão. Fca, fontanela caudal, Fcr, fontanela cranial. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S. Barra: 10 mm.

DISCUSSÃO

As diferenças na sincronização de ossificação são aparentes entre as espécies comparadas e *P. expansa*, nas unidades estruturais do esqueleto do plastrão. Diferenças anatômicas no número de elementos esqueléticos que compõem o plastrão também ocorrem, com presença do epiplastrão, endoplastrão, hioplastrão, hipoplastrão e xifiplastrão em chelidade viventes. Nas espécies da família podocnemididae, além desses ossos possui o mesoplastrão. Apesar de pertencer a mesma ordem, Testudines e a mesma subordem, pleurodira (OLIVEIRA; KELNNER, 2005; FRANÇA, 2004).

Neste estudo, embora tenham sido nomeados os estágios dos embriões, as comparações foram feitas com outras espécies, em termos de seqüência de acontecimentos no desenvolvimento da ossificação.

O plastrão começa a se ossificar durante a vida embrionária, fato observado em *T. scripta* (GILBERT *et al.*, 2001), *C. serpentina* (GILBERT *et al.*, 2001; RIEPPEL, 1993c), *A. spinifera* (SHEIL, 2003), bem como em *P. expansa*. O futuro plastrão pôde ser identificado por nove centros de ossificação na derme ventral em *Macrochelys temminckii* (SHEIL, 2005), *T. scripta*, *C. serpentina* e *A. spinifera*, diferentemente da *P. expansa*, onde foram evidenciados 11 centros de ossificação.

A diferença no número de centros de ossificação é devido à ausência ou presença do mesoplastrão. Em Chelidae fósseis como *Prochelidella* e *Yaminuechelys*, o mesoplastrão encontra-se lateralmente disposto, sendo que em Chelidae viventes este se encontra ausente como, por exemplo, em *Phrynops sp.* (KISCHLAT 1994; MEYLAN 1996; DE LA FUENTE *et al.*, 2001; DE LA FUENTE, 2003). Diferença anatômica é também notória em *Pelusios sp.*, onde os mesoplastrões se unem medialmente (MEYLAN, 1996). Isso não ocorre em *P. expansa*, onde os mesoplastrões são separados pelos ossos hioplastrão e hipoplastrão.

Em *A. spinifera*, o início da ossificação do plastrão ocorre entre os estágios 19 e 20 (SHEIL, 2003), em *C. serpentina* entre os estágios 20 e 21 (Rieppel, 1993c) e para Sheil e Greenbaum (2005) tudo isso ocorre no estágio 21, também em estudo

com *C. serpentina*. Em *P. expansa*, a ossificação do plastrão inicia-se mais cedo, entre os estágios 16 e 17.

Tanto em *P. expansa* como nas demais espécies analisadas, a seqüência de aparecimento dos centros de ossificação, nos elementos ósseos do plastrão, difere significativamente.

Para Rieppel (1993c), em *C. serpentina*, os primeiros centros de ossificação a aparecer são os dos ossos da região cranial do plastrão, o endoplastrão e o epiplastrão, no estágio 20, seguidos do hioplastrão, hipoplastrão e xifiplastrão, no estágio 21. Segundo Sheil e Greenbaum (2005), também em *C. serpentina*, todos os ossos que compõem o plastrão apresentam centros de ossificação no estágio 21. Apesar de se tratar da mesma espécie, os autores notificam diferenças na cronologia e na seqüência de aparecimento da formação óssea.

Em *A. spinifera* (SHEIL, 2003), diferentemente do que ocorre em *P. expansa*, a seqüência de aparecimento dos centros de ossificação é crânio-caudal, ou seja, endoplastrão, hioplastrão, hipoplastrão e xifiplastrão, estando ausente o mesoplastrão. O osso epiplastrão, em *A. spinifera* e *P. expansa*, só vai mostrar centros de ossificação mais tarde, no estágio 20.

Estudos histológicos realizados por Gilbert et al. (2001), confirmam que todos os ossos do plastrão se ossificam intramembranosamente, sem quaisquer precursores de cartilagem. Em *P. expansa*, nenhuma reação ao corante alcian blue foi observada nos ossos do plastrão, durante o desenvolvimento.

A presença de espículas ósseas, que se encaixam entre ossos vizinhos, foi observada durante a ossificação do plastrão em *C. serpentina*, *T. scripta* (GILBERT et al., 2001) e em *P. expansa*. Para Gilbert et al. (2001), esse evento não era esperado uma vez que a linha mediana forma uma divisão entre os ossos pares em lados opostos do plastrão. No entanto, o limite da linha mediana não foi respeitado pelo desenvolvimento das espículas. Além do mais, as espículas, quando cruzaram a linha mediana, não se fundiram imediatamente. Isto é um possível requisito para o crescimento continuado do plastrão durante o seu desenvolvimento.

CONCLUSÕES

De acordo com a retenção do corante alizarina a sequência de ossificação do plastrão é: hioplastrão=hipoplastrão>endoplastrão>xifiplastrão>mesoplastrão>epiplastrão.

O fechamento do plastrão só ocorre depois de sete meses após a eclosão.

REFERÊNCIAS

ALHO, C.J.R.; CARVALHO, A.G.; PÁDUA, L.F.M. Ecologia da tartaruga da amazônia e avaliação de seu manejo na reserva biológica do trombetas. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 9, n. 38, p. 29-47. 1979.

ALIBARDI L. Immunocytochemical observations on the cornification of soft and hard epidermis in the turtle *Chrysemys picta*. **Zoology**, Jena, v. 105, p. 31–44, 2002.

CLARK, K., G.; BENDER, B. P.; MURRAY, K. PANFILIO, S.; COOK, R. DAVIS, K.; MURNEN, R. S.; TUAN, AND S. F. GILBERT. Evidence for the neural crest origin of turtle plastron bones. **Gênesis** New York, v. 31, p.111–117, 2001.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*, pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DE LA FUENTE, M. Two new pleurodiran turtles from the portezuelo Formation (Upper Cretaceous) of northern Patagonia, Argentina. **Journal of Paleontology**, Tulsa, v. 77, n. 3, p.559-575, 2003.

DE LA FUENTE, M., F. L. BROIN e T. M. DE BIANCO. The oldest and first nearly complete skeleton of a chelid, of the Hydromedusa sub-group (Chelidae, Pleurodira), from the Upper Cretaceous of Patagonia. **Bulletim de la Societe Geologique de France**, Paris, v. 172, n. 2, p. 237-244, 2001.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

FRANÇA, A. G. **Osteologia de um quelônio fóssil (Pleurodira, Podocnemidae) do cretáceo superior (maastrichtiano) de Minas Gerais, Brasil**. 2004. 80F. Dissertação (Monografia em Ciências Biológicas) – Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GILBERT, S. F., G. A. LOREDO, A. BRUKMAN.; A. C. BURKE. Morphogenesis of the turtle shell: the development of novel structure in tetrapod evolution. **Evolution & Development**, Malden, v. 3, p.47–58, 2001.

KISCHLAT, E. E. Observações sobre Podocnemis elegans Suarez (Chelonii, Pleurodira, Podocnemididae) do Neocretáceo do Brasil. **Acta Geológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 39, n.27, p.345-351, 1994.

KURAKU, S., R. USUDA, AND S. KURATANI. Comprehensive survey of carapacial ridge-specific genes in turtle implies co-option of some regulatory genes in carapace evolution. **Evololution & Development**, Malden, v. 7, p.3–17, 2005.

LUZ, V. 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**, Viçosa, v.32, n.1, p.1-9, 2003.

MADER, D. R.; BENNETT, R. A.; FUNK, R. S.; FITZGERALD, K. T.; VERA, R. HERNANDEZ-DIVERS, S. J. Surgery In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006, p.552-584.

MEYLAN, P. A. Morphology and Relationships of the Early Cretaceous side-necked turtle, *Araripemys barretoii* (Testudines: Pelomedusoides: Araripemydidae) from the Santana Formation of Brazil. **Journal of Vertebrate Paleontology**, Los Angeles, v. 16, p. 20-33, 1996.

MYERS, E. M.; JANZEN, F. J.; ADAMS, D. C.; TUCKER, J. K. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). **Evolution; International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v. 60, n. 3, p. 563–572, 2006.

MORIGUCHI, T.; YANO, K.; NAKAGAWA, S.; KAJI, F. Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 260, p. 19–25, 2003.

MUNDIM, A. V.; QUEIROZ, R. P.; SANTOS, A. L. Q.; BELLETI, M. E.; LUZ, V. L. F. Bioquímica sanguínea da tartaruga da amazônia (*Podocnemis expansa*) em seu habitat natural. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 15, n. 2, p. 35-43, 1999.

OLIVEIRA, G. R.; KELLNER, A. W. A. Note on a plastron (Testudines, Pleurodira) from the lower cretaceous crato member, Santana formation, Brazil. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v.63, n.3, p.523-528, 2005.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B, **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003.

RIEPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. V. patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* Daudin (Reptilia, Crocodylia). **Journal of Zoology**, London, v. 109, p. 301-3251, 1993a.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. 2. *Chamaeleo hoehnelii* (Squamata, Chamaeleoninae), with comments on the homology of carpal and tarsal bones. **Herpetologica**, Lafayette, v. 49, n. 1, p. 66-78, 1993b.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993c.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York v. 256, p. 42-78, 2003.

SHEIL, C. A. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). **Journal of Morphology**, New York, v. 263, p. 71-106, 2005.

VINCENT, C., M. BONToux, N. M. LE DOUARIN, C. PIEAU, AND A.-H. MONSORO-BURQ. *Msx* genes are expressed in the carapacial ridge of turtle shell: a study of the European pond turtle, *Emys orbicularis*. **Development Genes and Evolution**, Berlin, v. 213, p. 464–469, 2003.

CAPÍTULO 7 – ONTOGENIA DOS OSSOS DA CINTURA PEITORAL E DOS MEMBROS TORÁDICOS EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO - Com objetivo de investigar a seqüência de formação dos ossos da cintura peitoral e do membro torácico, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal em *Podocnemis expansa*, coletou-se embriões e filhotes recém-nascidos, a partir do 18º dia de incubação natural. Efetuou-se biometria e os embriões e filhotes foram submetidos à técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens. O esqueleto do braço (estilopódio) é composto pelo osso úmero e o esqueleto do antebraço (zeugopódio) compreende dois ossos, a ulna e o rádio. O esqueleto da mão (autopódio) é formado pelos ossos: ulnar do carpo (UC), central do carpo 2 (C2), central do carpo 3 (C3), ossos distais do carpo (DCI, DCII, DCIII, DCIV e DCV), pisiforme do carpo (PC), osso intermédio do carpo (IC), 5 ossos metacarpos (MCI, MCII, MCIII, MCIV e MCV) e 14 falanges, duas no primeiro dedo e três em cada um dos demais dedos, cuja fórmula falângica é 2:3:3:3:3. No estágio 19, a escápula, o processo acromial e o coracóide já mostram centros de ossificação. No estágio 16, observaram-se centros de ossificação no osso úmero, seguido pelo osso ulna e, finalmente, o osso rádio. No estágio 23, o IC apresenta centro de ossificação, no estágio 24, toda a fileira distal do carpo apresentou centros de ossificação, exceto do DC V. Ainda nesse estágio também se verificaram centros de ossificação nos UC, CII e CIII. O DCV só mostrou centros de ossificação no início do estágio 25. O PC somente é visto 40 dias após a eclosão. A retenção do corante nos metacarpos ocorre na seguinte ordem: MCIII > MCII = MCIV > MCI > MCV. No estágio 20 torna-se evidente que, em todos os metacarpos, os centros de ossificação progridem em direção às epífises. A seqüência de retenção de corante nas falanges distais (FD) ocorre na ordem: FD III > FD II > FD IV > FD I > FD V. Nas falanges médias (FM): FM III > FM IV > FM II > FM V. E, finalmente, nas falanges proximais (FP): FP I > FP III > FP IV > FP II > FP V. Diferenças e semelhanças na sincronização de ossificação são evidentes entre *Podocnemis expansa* e as espécies comparadas. Assim, não existe um padrão de osteogênese para todos os

Testudines, devido à variação do local inicial de formação óssea e da seqüência de ossificação.

Palavras-chave: Esqueleto, Ossificação, Alizarina, *Podocnemis expansa*, Répteis.

BONE ONTOGENY OF PECTORAL GIRDLE AND FORELIMB OF THE GIANT AMAZON RIVER TURTLE *podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

ABSTRACT: With the objective of investigating the sequence of bone formation of the breast bone and thoracic member, in the different stages of development be they pre or post natal *Podocnemis expansa*, embryos and newly born nestlings were collected, as from the 18th day of natural incubation. Morphometrics occurred and the embryos and nestlings were submitted to the diafanization and coloration technique of bones and cartilages. The arm skeleton (stylopodium) is composed by the humerus bone and the forearm skeleton (zeugopodium) consists of two bones, the ulna and the radius. The hand skeleton (autopodium) is formed by the following bones: carpus ulnare (UC), carpus central 2 (C2), carpus central 3 (C3), distal carpus bones (DCI, DCII, DCIII, DCIV and DCV), carpus pisiform (PC), intermediate carpus bone (IC), 5 metacarpus bones (MCI, MCII, MCIII, MCIV and MCV) and 14 phalanges, two in the first finger and three in each one of the other fingers, whose phalanx formula is 2:3:3:3:3. In stage 19, the scapula, the acromion and coracoid process already show ossification centers. In stage 16, ossification centers were observed in the humerus bone, followed by the ulna bone and, finally, the radius bone. In stage 23, the IC presents an ossification center, in stage 24, the whole distal row presented ossification centers, except for DC V. Still in that stage ossification centers were also verified in UC, CII and CIII. Only DCV showed ossification centers at the beginning of stage 25. PC is only seen 40 days after hatching. Retention of the stain in the metacarpi occurs in the following order: M III > M II = M IV > M I > M V. In stage 20, it is evident that, in all the metacarpi, the ossification centers progress in the direction of the epiphyses. The sequence of stain retention in the distal phalanges (DP) occurs in the order: DP III > DP II > DP IV > DP I > DP V. In the medial phalanges (MP), the stain retention sequence is: MP III > MP IV > MP II > MP V. Lastly, the proximal phalanges (PP) retain staining in the following sequence: PP I > PP III > PP IV > PP II > PP V. The differences and similarities in the synchronization of ossification of *Podocnemis expansa* and

comparable species are evident. Thus, there is no osteogenetic pattern common to all chelonians, due to variations in the initial site of bone formation and the sequence of ossification.

Key words: Ossification, Alizarin, *Podocnemis expansa*, Reptiles.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de hábitos terrestres trouxe uma revolução na locomoção dos vertebrados. Entretanto, nos tetrápodos, os membros adquiriram função dominante e positiva na progressão (ROMER; PARSONS, 1985).

O esqueleto apendicular dos répteis é fortemente adaptado ao tipo de ambiente em que vive o que resultou em várias modificações na sua estrutura. (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006; POUGH et al., 2003). Segundo Romer e Parsons (1985), em Testudines adultos essa unidade do esqueleto exibe várias modificações que vai desde as nadadeiras das tartarugas marinhas aos membros mais curtos dos jabutis. A maioria das diferenças são essas de proporção, mas também há grande variação no número de elementos ósseos.

O esqueleto dos animais é um conjunto de estruturas vivas capaz de crescer, adaptar e se reparar. O tecido ósseo está presente em quase todas as regiões do corpo, e os elementos esqueléticos individuais são bastante diversos na sua morfologia e arquitetura tecidual (WHITE, 2003).

A maioria dos ossos dos répteis se forma e cresce por ossificação endocondral, um processo caracterizado por uma cartilagem intermediária. O padrão de acontecimentos, que formam este modelo, envolve um processo de várias fases em que células mesenquimais pré-condrogênicas formam condensações, antes de se diferenciarem em condroblastos (POGUE et al., 2003).

Segundo Tagariello et al. (2005), cada uma destas etapas, desde transição de condensação à diferenciação, é caracterizada por padrões temporais específicos e várias mudanças ocorrem em períodos previsíveis. As perturbações desta série, altamente harmônica de acontecimentos em desenvolvimento de cartilagem e osso, crescimento e homeostase, inevitavelmente resultam em defeitos do esqueleto (BELL et al., 2006).

Para Fritsch (2003) e Gray et al. (1996), o conhecimento do critério biológico para a seqüência de formação óssea, em local e tempo previsível, é de grande interesse clínico. O osso está sujeito a numerosas alterações patológicas, que impedem a função normal de sustentação e movimento. Esses distúrbios são alvo

da medicina preventiva e cirúrgica e, para serem mais bem solucionados necessitam de subsídios da ciência básica (GUPTA, 2005).

Os Testudines têm sido alvo de numerosos estudos que observam os efeitos dos fatores bióticos e abióticos durante a embriogênese (BARBARA *et al.*, 2003; PACKARD *et al.*, 2000 e SÁ *et al.*, 2005). No entanto, a maioria desses trabalhos focalizou principalmente a morfologia externa (DANNI *et al.*, 1990; TOKITA; KURATANI, 2001). Poucos autores forneceram dados que descrevessem a seqüência de ossificação do esqueleto (RIEPPEL, 1993a; SHEIL; GREENBAUM, 2005).

Existem numerosos trabalhos para outros répteis e anfíbios. Isto tem sido demonstrado nas contribuições de RIEPPEL (1993b), RIEPPEL (1993c) e RIEPPEL (1994a), no estudo da ossificação do esqueleto de *Alligator mississippiensis*, de *Chamaeleo hoehnelii* e de *Gehyra oceanica*, respectivamente, e de Pugener e Maglia (1997) e de Perotti (2001), no desenvolvimento do esqueleto de *Discoglossus sardus* e do *Leptodactylus chaquensis*. Esses poderão fornecer dados comparativos úteis para esclarecer a colocação filogenética dos Testudines, entre outros répteis e amniotas.

A espécie *Podocnemis expansa*, conhecida popularmente como tartaruga-da-amazônia, é largamente distribuída pela bacia amazônica (MUNDIM *et al.*, 1999). Segundo Alho *et al.* (1979), este é o maior Testudines de água doce da América do Sul e atualmente é considerada uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente (SÁ *et al.*, 2004).

Embora o desenvolvimento dos membros em testudines tenha sido assunto de várias investigações, é relativamente pequeno o conhecimento sobre o padrão do desenvolvimento ósseo do esqueleto apendicular em *P. expansa*.

Este estudo teve como objetivo investigar a seqüência de formação dos elementos ósseos, que compõem a cintura peitoral e os membros torácicos, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

62 embriões e 43 filhotes recém-nascidos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos nos períodos de desova ocorridos

em 2005 e 2006 na área de reprodução protegida pelo IBAMA/RAN (Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios), nas praias do Rio Araguaia – Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13º 20' 38,7" S e 50º 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN.

Amostras de ovos e filhotes foram coletadas aleatoriamente, de um ninho escolhido ao acaso, até a eclosão. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni et al. (1990). Após a eclosão, os filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos com temperatura em torno de 27 °C e alimentados com ração para peixes.

Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se morfometria (Quadro 1 e 2) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta), precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, altura, comprimento crânio-caudal e peso corporal, seguindo-se a orientação de Malvásio et al. (2002) e Danni et al. (1990).

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red e da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem a cintura peitoral e os membros torácicos (Figuras 3, 4 e 5), foram analisados em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus) e câmera fotográfica digital (fe100, Olympus 6.0). Ainda, dois desenhos representativos foram confeccionados, utilizando-se para tal seis esqueletos de *P. expansa* adultos do acervo do LAPAS (Figuras 1 e 2).

RESULTADOS

Osteologia da cintura peitoral e dos membros torácicos

Cintura peitoral: Exibe uma estrutura trirradiada com dois prolongamentos ventrais. A cintura peitoral possui dois ossos: a escápula com o processo acromial e o coracóide. Articula-se com os membros torácicos e é utilizada como principal base de inserção dos músculos apendiculares (Figura 1).

Escápula: Possui formato em L, com o processo acromial mais curto estendendo-se dorsomedialmente (Figura 1). Na metade distal, o processo acromial mostra contorno triangular e se aproxima das vértebras cervicais 7 e 8. A região da escápula que forma a fossa glenóide é projetada dorsolateralmente, formando uma face articular côncava com bordas salientes. A extremidade distal da escápula aproxima-se do osso costal 3.

Coracóide: É composto de uma área articular proximal e uma lâmina distal larga e delgada (Figura 1). A face cranial da lâmina é côncava. O corpo do osso apresenta-se ligeiramente encurvado dorsalmente. A extremidade proximal apresenta uma área articular lisa, a qual se une à escápula para formar a cavidade glenóide.

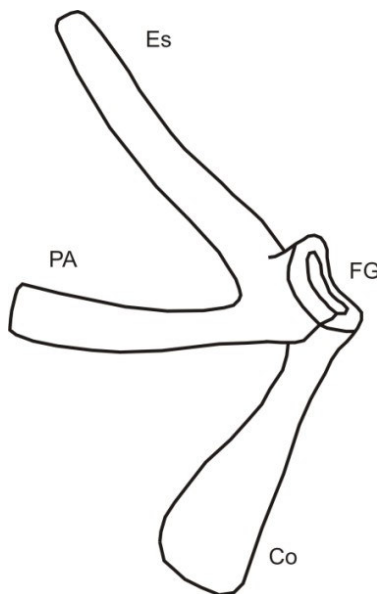


Figura 1: Desenho esquemático dos ossos da cintura peitoral de *Podocnemis expansa*. Es, escápula; PA, processo acromial; FG, fossa glenóide; Co, coracóide.

Membros torácicos: É composto pelo estilopódio, osso úmero, zeugopódio, osso ulna e o osso rádio e o autopódio, ossos do carpo, metacarpos e falanges (Figura 2).

Úmero: O osso úmero articula-se proximalmente com a escápula por meio da cabeça e distalmente aos ossos do zeugopódio pelo côndilo.

Este osso possui duas projeções bem desenvolvidas, na extremidade proximal, que se localizam dorsal e ventralmente, os tubérculos dorsal e ventral. A cabeça do úmero é esférica, presa a epífise proximal por um estreitamento. O tubérculo ventral é maior do que o dorsal. Observa-se ainda na extremidade proximal a presença de uma cavidade, a fossa intertubercular.

A extremidade distal do úmero é formada pelo côndilo direcionado crânio lateralmente e este pelo capítulo, ventralmente e pela tróclea dorsalmente. O capítulo articula-se com a ulna e a tróclea articula-se com o rádio. Estas articulações são aproximadamente do mesmo formato e tamanho (Figura 2).

Rádio: O osso rádio compõe anatomicamente a parte ventral do esqueleto do antebraço. É um osso longo, possui a superfície articular umeral em formato semi-lunar. A superfície cranial da extremidade proximal é plana e une-se com a ulna. Articula-se proximalmente com o úmero, distalmente com o carpo e cranialmente com a ulna (Figura 2).

Ulna: É um dos ossos que formam o antebraço, sendo o maior deles. Articula proximalmente com úmero, distalmente com o carpo e cranialmente com o rádio. É um osso longo e sua extremidade proximal apresenta superfície articular umeral de formato ovóide (Figura 2).

Carpo: O carpo é constituído por dez ossos irregulares com extensas superfícies articulares, dispostos em três fileiras: a primeira é representada pelo osso intermédio do carpo, posicionado entre as extremidades distais dos ossos rádio e ulna. A segunda articula-se com a ulna e o rádio e é constituída medialmente, pelos seguintes ossos: intermédio do carpo (IC), central do carpo 2 (C2), central do carpo 3 (C3), ulnar do carpo (UC) e pisiforme do carpo (PC) (Figura 2).

A terceira fileira articula-se com os ossos do metacarpo distalmente e com os ossos da segunda fileira do carpo proximalmente, e é constituída, mediolateralmente, pelos seguintes ossos: distais do carpo I (DCI), distal do carpo II (DCII), distal do carpo III (DCIII), distal do carpo IV (DCIV), distal do carpo V (DCV).

Metacarpos: Os metacarpos consistem de cinco elementos ósseos, convencionalmente numerados no sentido mediolateral de metacarpos I, II, III, IV e V. Estes ossos são longos, com cabeça distal e base expandida proximal, que se articulam com as falanges proximais e com a terceira fileira do carpo, respectivamente (Figura 2).

Falanges: Cada mão possui 14 falanges, duas no primeiro dedo e três em cada um dos demais dedos, cuja fórmula falângica é 2:3:3:3:3. As falanges proximais são mais curtas do que as médias, exceto no dedo I. As falanges distais apresentam formato de cone, cuja metade distal é achatada dorsoventralmente (Figura 2).

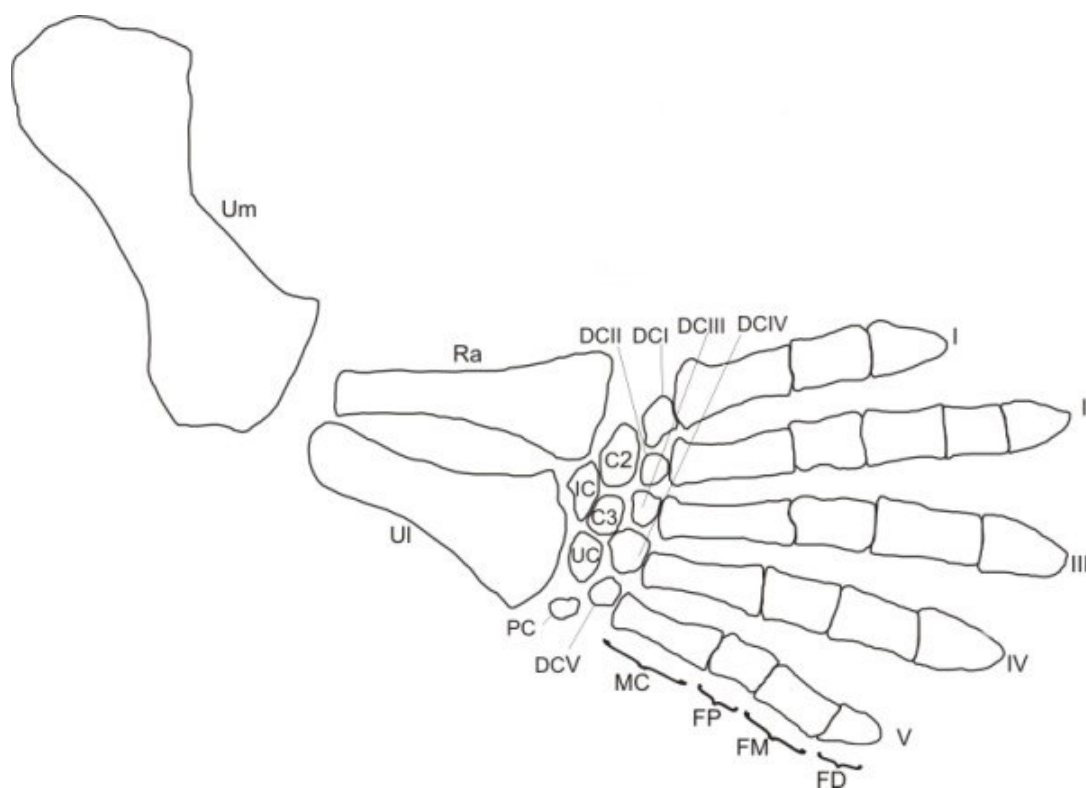


Figura 2: Desenho esquemático dos ossos do membro torácico de *Podocnemis expansa*. Um, osso úmero; Ra, osso rádio; Ul, osso ulna; DCI, distal do carpo I; DCII, osso distal do carpo II; DCIII, osso distal do carpo III; DCIV, osso distal do carpo IV; DCV, osso distal do carpo V; C2, osso central do carpo 2; C3, osso central do carpo 3; IC, osso intermédio do carpo; UC, osso ulnar do carpo; PC, osso pisiforme do carpo; Mc, osso metacarpo; FP, falange proximal; FM, falange media, FD, falange distal; (I) dedo I; (II) dedo II; (III) dedo III; (IV) dedo IV; (V) dedo V.

Seqüência de ossificação da cintura peitoral e membros torácicos

No estágio 16, observaram-se centros de ossificação no osso úmero, seguido pelo osso ulna e, finalmente, o osso rádio. Essa seqüência é definida pela observação da retenção de corante (Figuras 3D, E e F). No estágio 19, a escápula, o processo acromial e o coracóide já mostram centros de ossificação (Figuras 3A, B e C).

A ossificação dos metacarpos (Mc) torna-se aparente na diáfise no início do estágio 20 e o Mc III exibe ossificação mais extensa, com maior retenção de alizarina (Figura 4A). Isto sugere que o McIII seja o primeiro osso a apresentar centro de ossificação. A retenção do corante ocorre na seguinte ordem: McIII>McII=McIV>McI>McV. No final do estágio 20 torna-se evidente que, em todos os metacarpos, os centros de ossificação progridem em direção às epífises (Figura 4B e C).

Durante o início do estágio 20 (Figura 4B), as falanges distais (FD) exibem centros de ossificação nos dedos I a IV, e nos dedos II e III o processo encontra-se mais avançado. A ossificação de todas as falanges distais só foi verificada no final do estágio 20 (Figura 4C). Portanto, a seqüência de retenção de corante nas falanges distais ocorre na ordem: FDIII>FDII>FDIV>FDI >FD V.

Os centros de ossificação das falanges médias (FM) aparecem primeiramente no dedo III, no início do estágio 20 (Figura 4B) e segue nos dedos IV e II, no final do estágio 20 (Figura 4C). Simultaneamente, foi observada a presença de centro de ossificação na falange proximal do dedo I. A falange média do dedo V possui centro de ossificação no estágio 21 (Figura 4D). O grau de ossificação ocorre assim: FMIII>FMIV>FMII>FM V.

Com exceção do dedo V, no estágio 22 (Figura 4E), todas as falanges proximais (FP) apresentam centro de ossificação. O evento acontece na seguinte ordem: FPI>FPIII>FPIV>FPII>FPV (Figura 4F).

No estágio 23, o IC apresenta centro de ossificação (Figura 5A). No estágio 24, toda a fileira distal do carpo apresentou centros de ossificação, exceto do DC V (Figura 5B). Notou-se maior retenção da alizarina nos DCIII e DCIV. Neste mesmo estágio também se verificaram centros de ossificação nos UC, CII e CIII. O DCV só mostrou centros de ossificação no início do estágio 25 (Figura 5C e D). O PC é o

último osso a apresentar centro de ossificação, visto somente 40 dias após a eclosão (Figura 5E). Os ossos do carpo se ossificam na ordem que se segue: IC>CII=DCIII>DCIV>DCII=DCI=CIII>UC> DCV>Pi (Figura 5F).

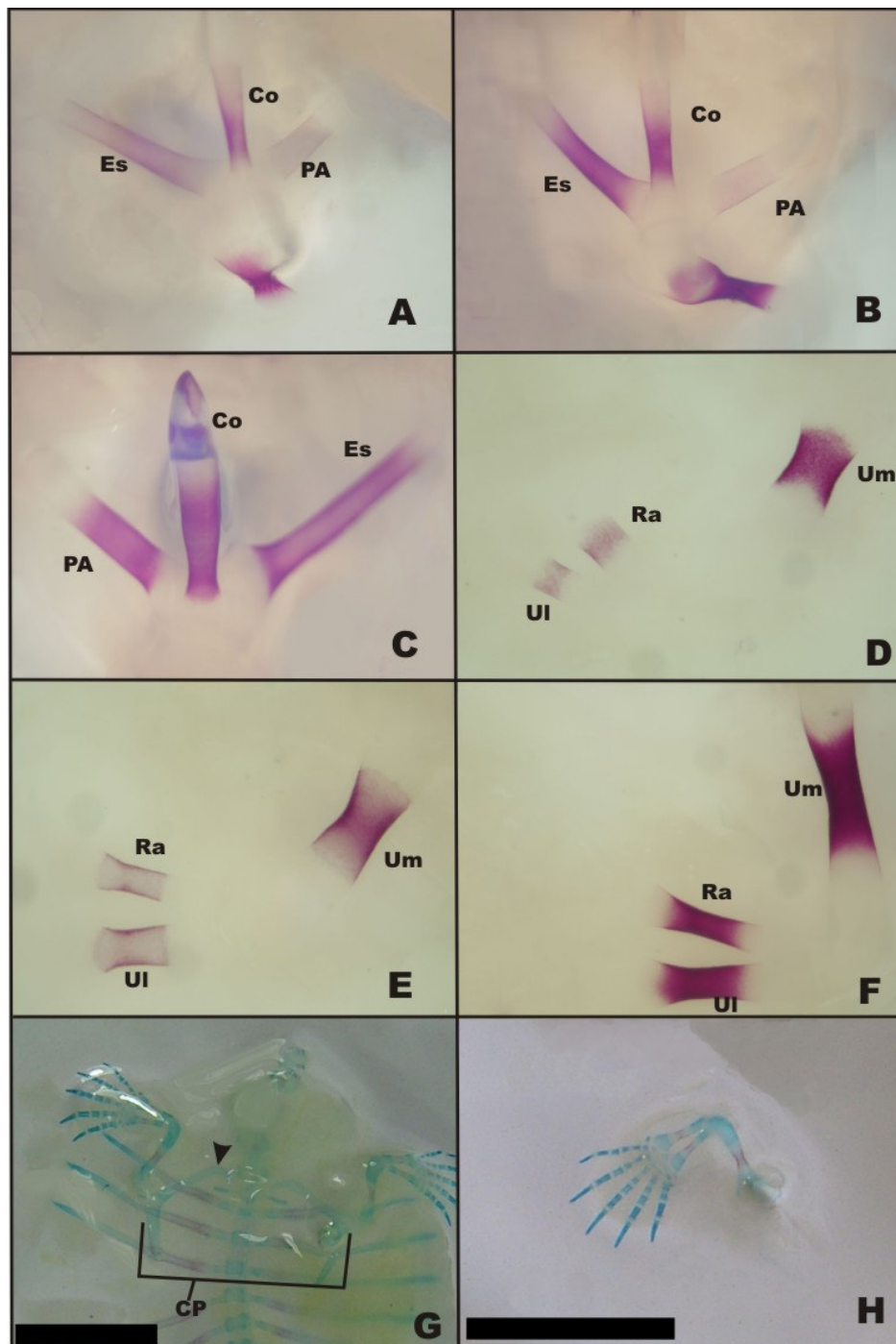


Figura 3: Fotografias de cinturas peitorais e membros torácicos de embriões de *Podocnemis expansa*. (A) início do estágio 19. (B) final do estágio 19. (C) estágio 20. (D) estágio 16. (E) estágio 17. (F) estágio 19. (G) e (H): estágio 17. Es, escápula; PA, processo acromial; Co, osso coracóide; Um, osso úmero; Ra, osso rádio; Ul, osso ulna; CP, cintura escapular; cabeça de seta, cartilagem. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S e alcian blue. (A, B e C) 10x, (D) 25 x, (E e F) 20x, (G e H) barra 10 mm.

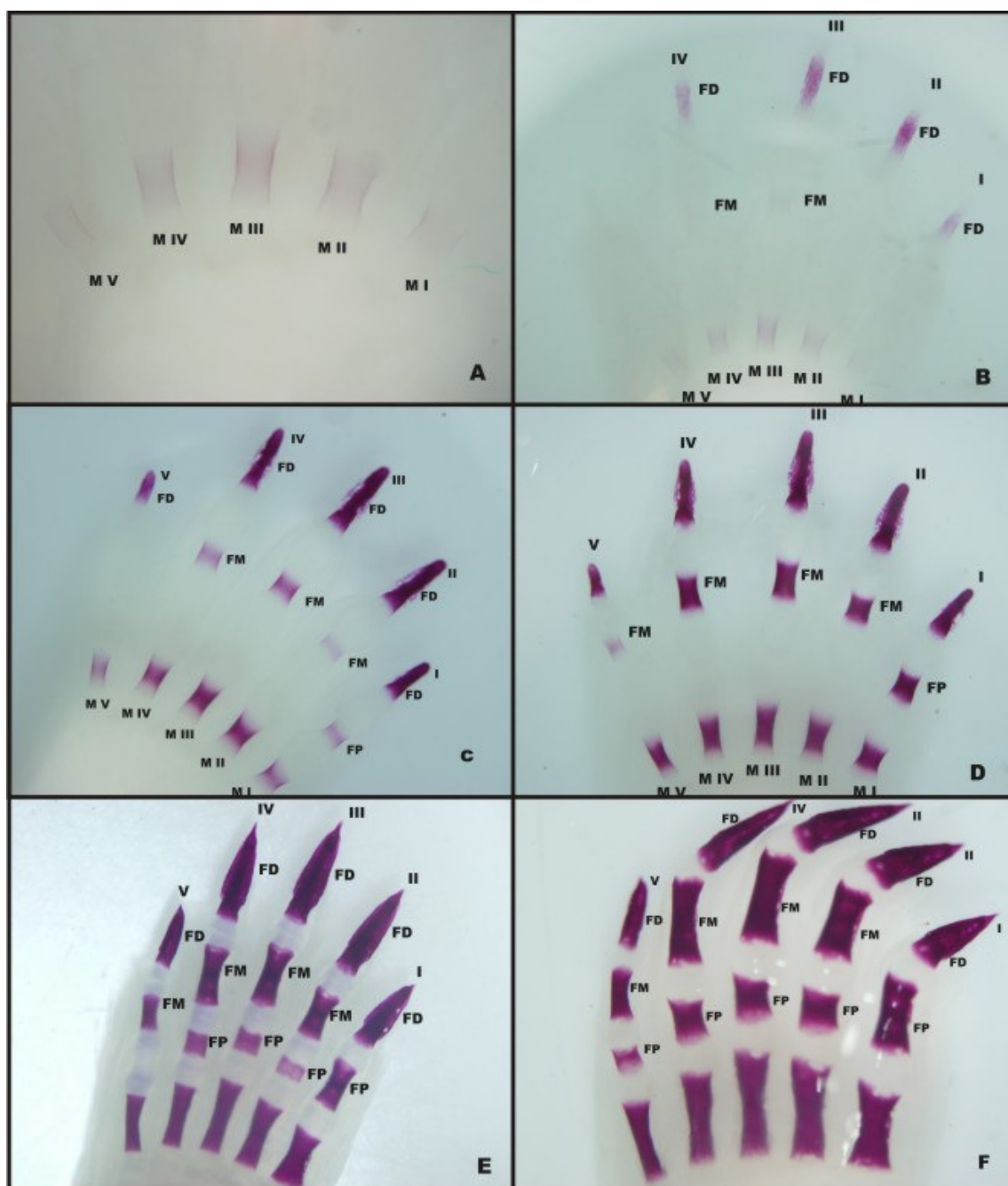


Figura 4: Fotografias de mãos de embriões de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. (A) e (B) estágio 20, desenvolvimento dos ossos metacarpos e das falanges distais. (C) e (D) estágios 20, 21, desenvolvimento das falanges médias. (E) e (F) estágios 22, 23, desenvolvimento das falanges proximais. FD, falanges distais; FM, falanges médias; FP, falanges proximais; Mc, metacarpos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S. (A) 40 x, (B, C, D e F) 16 x, (E) 12,5 x.

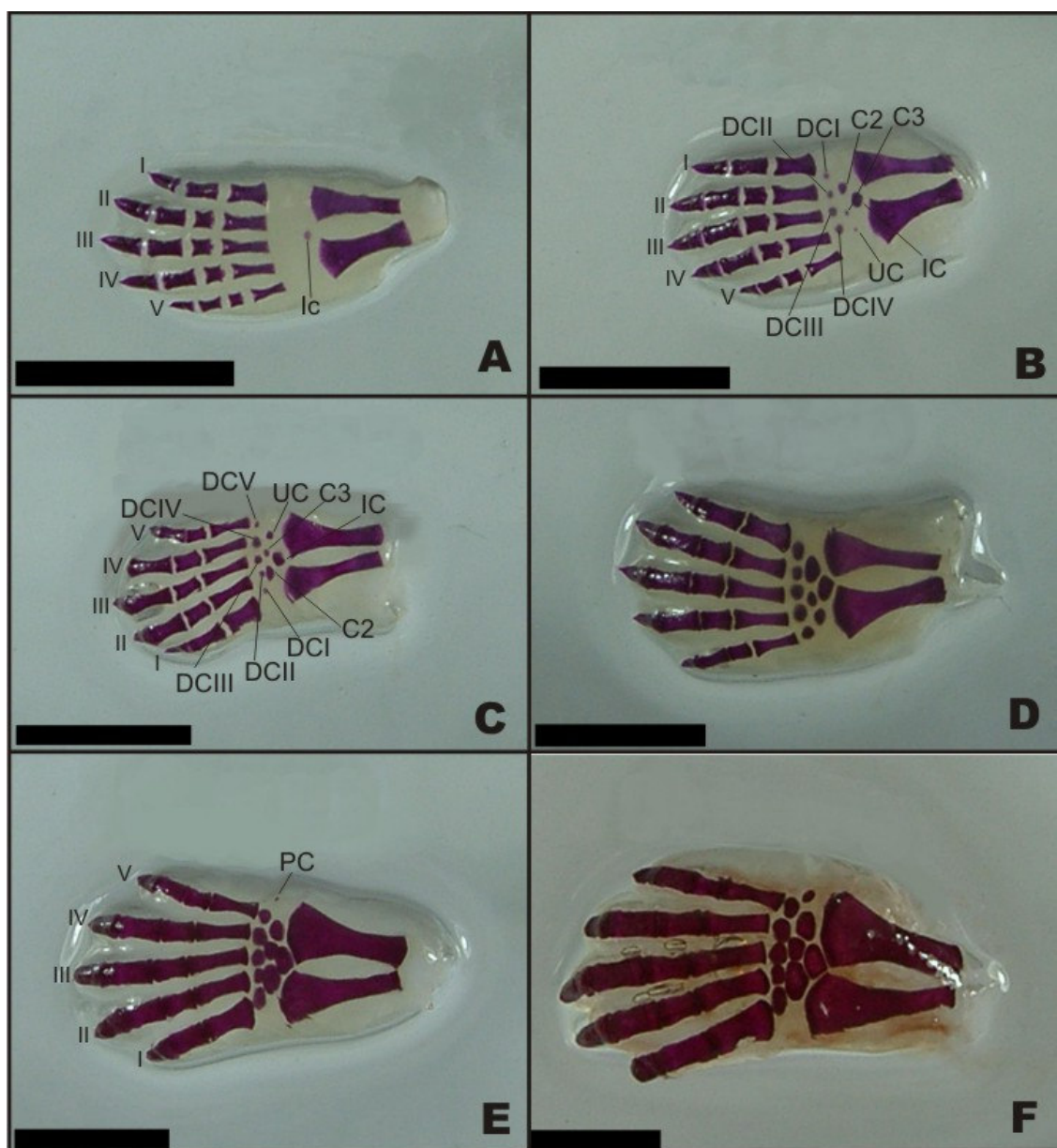


Figura 5: Fotografias de antebraços e mãos de embriões e filhotes de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. **(A)** estágio 23. **(B)** estágio 24. **(C)** início do estágio 25. **(D)** final do estágio 25. **(E)** 40 dias após eclosão. **(F)** 45 dias após eclosão. DCI, osso distal do carpo I; DCII, osso distal do carpo II; DCIII, osso distal do carpo III; DCIV, osso distal do carpo IV; DCV, osso distal do carpo V; C2, osso central do carpo 2; C3, osso central do carpo 3; IC, osso intermédio do carpo; UC, osso ulnar do carpo; Pi, osso pisiforme do carpo; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração com alizarina red S. Barra 10mm.

DISCUSSÃO

A técnica de diafanização e coloração de ossos têm sido utilizada e mostra-se eficiente para evidenciar os centros de ossificação. Isso pode ser observado nos trabalhos de Franz-Odenaal (2005), Patton e Kaufman (1995), Nakane e Tsudzuki (1999), com ossificação em camundongo, em *C. serpentina* e em codorna japonesa.

Neste estudo, embora tenham sido nomeados os estágios para os embriões, as comparações foram feitas entre as espécies, em termos de seqüência de acontecimentos do desenvolvimento da ossificação.

As diferenças e semelhanças na sincronização de ossificação são aparentes entre *Chelydra serpentina*, *Apalone spinifera*, *Macrochelys temminckii* e *P. expansa*, nas unidades estruturais da cintura peitoral e membros torácicos. Diferenças anatômicas na fórmula falângica também ocorrem, com 2:3:3:3:3 para *P. expansa*, *C. serpentina* e *M. temminckii*, 2:3:3:3:2 para *Chelonia mydas* e *Caretta caretta*, e 2:3:3:4:3 para *A. spinifera*, apesar de todas pertencerem a mesma ordem dos Testudines (RIEPEL, 1993a, SHEIL, 2003, SANCHEZ-VILLAGRA, 2007). Romer e Parsons, (1985) salientou que a fusão embrionária é a principal causa da redução em número de elementos do esqueleto e que fusões entre alguns dos ossos do carpo podem ser vistos tanto em Testudines quanto em outros grupos. Porém, tais fusões não ocorrem em *P. expansa*.

Em *M. temminckii* (SHEIL, 2005) e *C. serpentina* (RIEPEL, 1993a), o úmero ossifica-se antes do rádio e da ulna. De acordo com Sheil e Greenbaum (2005), também em estudo com *C. serpentina*, esses elementos ósseos se ossificam simultaneamente no estágio 21. O mesmo ocorre com *P. expansa*, diferindo apenas no tempo, estágio 16.

A escápula e o coracóide ossificam, em *C. serpentina*, *M. temminckii*, e *P. expansa*, após o osso úmero (RIEPEL, 1993a; SHEIL, 2005; Sheil e Greenbaum, 2005). Para Sheil (2003), em *A. spinifera*, essa seqüência ocorre de maneira diferente, com a escápula e o coracóide no estágio 19 e por último o úmero, o rádio e a ulna no estágio 20.

Os ossos distais do carpo I, II, III, central do carpo III e intermédio do carpo, em *A. spinifera*, apresentam centros de ossificação no estágio 24. Segundo Sheil

(2003), não foi possível definir a seqüência de aparecimento. Em *P. expansa* o osso intermédio do carpo é o primeiro a apresentar centros de ossificação e isso ocorre no estágio 23. Finalmente, no estágio 24 os ossos distais do carpo I, II, III, IV, juntamente com o central do carpo 2, 3 e o ulnar do carpo mostram centros de ossificação, com menor grau de retenção de coloração nesses dois últimos. Segundo Sanchez-vilagra et al. (2007), em *C. caretta* o intermédio do carpo e o ulnar do carpo são os primeiros ossos dessa região a exibir ossificação. O osso pisiforme só mostra centros de ossificação após 40 dias pós-natal. Em *C. mydas* o pisiforme também é o último a iniciar o desenvolvimento dos ossos do carpo. E assim, como em *A. spinifera*, esse osso se ossifica ainda durante o período embrionário (SHEIL, 2003).

Diferentemente do que ocorre em *A. spinifera* e *P. expansa*, os ossos do carpo em *M. temminckii* não apresentam centros de ossificação durante o período embrionário (SHEIL, 2005), o mesmo ocorre em *C. serpentina*, exceto o osso distal do carpo II, que apresenta centro de ossificação no estágio 24 (RIEPPPEL, 1993a; SHEIL; GRENNBAUM, 2005).

Tanto em *C. serpentina*, *A. spinifera*, *M. temminckii*, quanto em *P. expansa*, o início do processo de ossificação em Mc I e Mc V apresenta-se cronologicamente semelhante.

Uma reconsideração sobre o desenvolvimento esquelético de *C. serpentina*, evidenciando variações intraespecíficas, foi realizado por Sheil e Greenbaum (2005), que apontaram o Mc IV como primeiro centro de ossificação. Em seguida apareceu o Mc III depois o Mc II. Esses acontecimentos foram semelhantes àqueles em *M. temminckii* e diferentes dos de *P. expansa*.

De acordo com Sheil (2003), os centros de ossificação na *A. spinifera* começam a aparecer em Mc II, Mc III e Mc IV, sem revelar a seqüência na retenção do corante, embora a maior variação na seqüência da ossificação tenha ocorrido nesses três ossos, em *P. expansa*.

Os padrões de ossificação das falanges de *C. serpentina*, propostos por Rieppel (1993a) e Sheil e Greenbaum (2005), não são idênticos em todos os pontos observados. Mas, é possível afirmar que em ambos os estudos, a osteogênese nos dedos da mão inicia-se nas falanges distais e prossegue no sentido disto–proximal.

Este padrão foi constatado em *P. expansa*, assim como acontece com *M. temminckii* (SHEIL, 2005), onde os centros de ossificação surgem primeiramente nas falanges distais dos dedos I a IV. Subseqüentemente, aparecem nas falanges médias dos dedos II a IV e depois na falange proximal do dedo I. Já na *A. spinifera* (SHEIL, 2003), o progresso da ossificação, nas falanges dos dedos I a III, ocorre no sentido próximo-distal.

Estas informações indicam que em *P. expansa*, *M. temminckii* e *C. serpentina*, o padrão de formação de osso dos dedos I a IV é semelhante, com exceção do dedo V da *M. temminckii* (SHEIL, 2005), onde a osteogênese é mais demorada em relação aos outros dedos, e avança próximo-distal.

Detalhes da seqüência relativa de ossificação foram documentados para lagartos e crocodilianos e comparações entre estes estudos identificam padrões entre linhagens importantes de Reptilia.

A seqüência e sincronização da ossificação em *P. expansa* exibem similaridades, bem como diferenças, quando comparada com *Lacerta vivipara* (RIEPPPEL, 1992), *Lacerta agilis exígua* (RIEPPPEL, 1994b) e *Alligator mississippiensis* (RIEPPPEL, 1993b). Fica evidente que estudos mais quantitativos são necessários para documentar a variabilidade natural de formação do osso.

Falanges de *Lacerta vivipara*, *Lacerta agilis exígua* e *Alligator mississippiensis* geralmente se ossificam numa direção próximo-distal, ao passo que estes elementos, em *P. expansa*, ossificam-se numa direção disto-proximal.

Segundo Rieppel (1993a), atenção considerável tem sido dispensada para documentar seqüências do desenvolvimento ósseo durante a ontogenia, mas relativamente pouco se conhece sobre variações intraespecíficas em qualquer táxon. Destacam-se, neste sentido, as diferenças na cronologia de ossificação notadas entre alguns dos ossos que compõem o esqueleto apendicular da *P. expansa*.

CONCLUSÕES

A escápula, o processo acromial e o coracóide mostram centros de ossificação no estágio 19.

O úmero, a ulna e o rádio se ossificam antes dos ossos da cintura peitoral no estágio 16.

A seqüência de ossificação dos ossos do carpo é: IC>CII=DCIII>DCIV>DCII=DCI=CIII>UC>DCV>Pi.

A seqüência de ossificação dos metacarpos é: Mc III > Mc II = Mc IV > Mc I > Mc V

A fórmula falângica da *Podocnemis expansa* é 2:3:3:3:3 e o sentido de progressão da ossificação é disto-proximal.

A seqüência de ossificação das falanges é: FD III > FD II > FD IV > FD I > FD V; FM III > FM IV > FM II > FM V e FP III > FP IV > FP II > FP V.

Não existe um padrão de osteogênese para todos os Testudines.

REFERÊNCIAS

ALHO, C. J. R.; CARVALHO, A. G.; PÁDUA, L. F. M. Ecologia da tartaruga da amazônia e avaliação de seu manejo na reserva biológica do trombetas. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 9, n. 38, p. 29-47. 1979.

BARBARA, A.; BELL, B. A.; SPOTILA, J.R.; PALADINO, F.V.; REINA, R.D. Low reproductive success of leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, is due to high embryonic mortality. **Biological Conservation**, Essex, v. 115, p.131–138, 2003.

BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, p. 457-465, 2006.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*, pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, v. 4, p. 3-15, 1936.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

FRANZ-ODENDAAL, T. A. Intramembranous ossification of scleral ossicles in *Chelydra serpentina*. **Zoology**, Chicago, v.109, p.75-81, 2005.

FRITSCH, H. Development of the Human Hand: A Short, Up-to-Date Overview. **European Surgery**, v 35, p. 125–128, 2003.

GRAY, C.; BOYDE, A.; JONES, S. J. Topographically Induced Bone Formation In Vitro: Implications for Bone Implants and Bone Grafts. **Bone**, New York, v. 18, p. 115-123, 1996.

GUPTA, R. K. Long bone fractures in osteopetrosis: awareness of primary pathology and appropriate pre-operative planning necessary to avoid pitfalls in fixation. **Injury Extra**, v. 36, p. 37-41, 2005.

MALVÁSIO, A.; SOUZA, A.M.; GOMES, N.; SAMPAIO, F.A. A.; MOLINA, F. B. Morfometria e morfologia do canal alimentar pós-faríngeo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812.), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Anapsida, Testudines). **Instituto Pau Brasil**, São Paulo, v. 5, p. 39-51, 2002.

MUNDIM, A. V.; QUEIROZ, R. P.; SANTOS, A. L. Q.; BELLETI, M. E.; LUZ, V. L. F. Bioquímica sanguínea da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) em seu habitat natural. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 15, n. 2, p. 35-43, 1999.

NAKANE, Y.; TSUDZUKI, M. Development of the skeleton in Japanese quail embryos. **Development Growth and Differentiation**, Nagoya, v. 41, p. 523–534, 1999.

PACKARD, G. C.; PACKARD, M. J. E.; BIRCHARD, G. F. Availability of water affects organ growth in prenatal and neonatal snapping turtles (*Chelydra serpentina*). **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 170, p. 69-74, 2000.

PATTON, J. T.; KAUFMAN, M. H. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. **Journal of Anatomy**, London, v. 186, p. 175-185, 1995.

PEROTTI, M. G. Development of *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). **Herpetologica**, Lafayette, v. 57, n. 3, p. 318-335, 2001.

POGUE, R.; SEBALD, E.; KING, L.; KRONSTADT, E.; KRAKOW, D.; COHN, D. H. A transcriptional profile of human fetal cartilage. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 23, p. 299–307, 2004.

PUGENER, L. A.; MAGLIA, A. M. Osteology and skeletal development of *Discoglossus sardus* (Anura, Discoglossidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 233, n. 3, p. 267-286, 1997.

RIEPPEL, O. Studies on skeletal formation in reptiles. III. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta vivipara* Jacquin (Reptilia, Squamata). **Zoology**, Jena, v. 68, p.1-25, 1992.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993a.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. V. patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* Daudin (Reptilia, Crocodylia). **Journal of Zoology**, London, v. 109, p. 301-3251, 1993b.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. 2. *Chamaeleo hoehnelii* (Squamata, Chamaeleoninae), with comments on the homology of carpal and tarsal bones. **Herpetologica**, Lafayette, v. 49, n. 1, p. 66-78, 1993c.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles - patterns of ossification in the limb skeleton of *Gehyra oceanica* (Lesson) and *Lepidodactylus lugubris* (Dumeril and Bibron). **Annales des Sciences Naturelles-zoologie et Biologie Animale**, Paris, v. 15, n. 2, p. 83-91, 1994a.

RIEPPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles - patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta agilis-exigua* Eichwald (Reptilia, Squamata). **Journal of Herpetology**, Athens, v. 28, p. 145-153, 1994b.

ROMER, A. S.; T. PARSONS. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985.

SANCHEZ-VILLAGRA, M. R.; MITGUTSCH, C.; NAGASHIMA, H.; KURATANI, S. Autopodial Development in the Sea Turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. **Zoological Science**, Tokyo, v. 24, p. 257-263, 2007.

SÁ, V. A.; QUINTANILHA, L. C.; FRENEAU, G. E.; LUZ, V. L. F.; BORJA, A. R.; SILVA, P. C. Crescimento ponderal de filhotes de tartaruga gigante da Amazônia (*Podocnemis expansa*) submetidos a tratamento com rações isocalóricas contendo

diferentes níveis de proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2351-2358, 2004.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p. 42-78, 2003.

SHEIL, C. A. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). **Journal of Morphology**, New York, v. 263, p. 71-106, 2005.

TAGARIELLO, A.; SCHLAUBITZ, S.; HANKELN, T.; MOHRMANN, G.; STELZER, C.; SCHWEIZER, A.; HERMANN, P.; LEE, B. SCHMIDT, E. R.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B. Expression profiling of human fetal growth plate cartilage by EST sequencing. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 24, p. 530 – 538, 2005.

TOKITA, M.; KURATANI, S. Normal embryonic stages of the chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). **Zoological Science**, Tokyo, v. 18, p. 705–715, 2001.

WHITE, D. G.; HERSHEY, H. P.; MOSS, J. J.; DANIELS, H.; TUAN, R. S.; BENNETT, V. D. Functional analysis of fibronectin isoforms in chondrogenesis: Full-length recombinant mesenchymal fibronectin reduces spreading and promotes condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells. **Differentiation**, London, v. 71, p. 251–261, 2003.

CAPÍTULO 8 – ONTOGENIA DOS OSSOS DA CINTURA PELVINA E DOS MEMBROS PELVINOS EM TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO - Com objetivo de investigar a seqüência de formação óssea da cintura pelvina e dos membros pelvinos, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal em *Podocnemis expansa*, coletou-se embriões e filhotes, a partir do 18º dia de incubação natural. Efetuou-se biometria e os embriões foram submetidos à técnica de diafanização com coloração dos ossos e cartilagens. A região do estilopódio é composta pelo osso fêmur, o zeugopódio compreende dois ossos, tíbia e fíbula e o autopódio é formado pelos ossos: intermédio do tarso (IT), fibular do tarso (FT), central do tarso (CT), distais do tarso (DTI, DTII, DT III e DTIV), 5 metatarsos (Mtl, MtII, MtIII, MtIV e MtV) e 14 falanges, duas no quinto dedo e três em cada um dos demais dedos, cuja fórmula falângica é 3:3:3:3:2. No estágio 16 o fêmur, tíbia e fíbula apresentam centros de ossificação na diáfise progredindo para as epífises. No estágio 19, os ossos da cintura pelvina mostram centros de ossificação. Nos ossos do tarso o DT I é o primeiro a apresentar centros de ossificação, no início do estágio 24, seguindo com IT, depois o CT e o DT II no final do estágio 24, DT III e DT IV no estágio 25. O FT mostra centro de ossificação no último estágio embrionário, estágio 26. A retenção do corante nos metatarsos ocorre na seguinte ordem: MtIII>MtII=MtIV>MtV>Mtl. No estágio 20 torna-se evidente que, em todos os metatarsos, os centros de ossificação progridem em direção às epífises. A seqüência de retenção de corante nas falanges distais (FD) ocorre na ordem: FD V > FD IV > FD III > FD II > FD I. Nas falanges médias (FM): FM III > FM IV > FM II > FM I. Nas falanges proximais (FP): FP V > FP I > FP II > FP III > FP IV. As diferenças e semelhanças na sincronização de ossificação são evidentes entre *Podocnemis expansa* e as espécies comparadas. Assim, não existe um padrão de osteogênese para os Testudines, devido à variação do local inicial de formação óssea e da seqüência de ossificação.

Palavras-chave: Esqueleto, Ossificação, Alizarina, *Podocnemis expansa*, Répteis.

BONE ONTOGENY OF PELVIC GIRDLE AND HINDLIMB OF THE GIANT AMAZON RIVER TURTLE *Podocnemis expansa* SCHWEIGGER, 1812 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

ABSTRACT With objective of investigating the sequence of bone formation of the pelvic girdle and pelvic members, in the different stages of pre and post-natal development in *Podocnemis expansa*, embryos and nestlings, as from the 18th day of natural incubation, were collected. Morphometrics took place and the embryos were submitted to the diafanization technique with coloration of bones and cartilages. The stylopodium area is composed by the femur bone, the zeugopodim consists of two bones, tibia and fibula and the autopodium is formed by the following bones: intermedium of tarso (IT), fibulare of tarso (FT), centrale of tarso (CT), distal bones of tarso (DTI, DTII, DT III and DTIV), 5 metatarsos (Mtl, MtII, MtIII, MtIV and MtV) and 14 phalanges, two in the fifth finger and three in each one of the other fingers, whose phalange formula is 3:3:3:3:2. In stage 16 the femur, tibia and fibula present ossification centers in the diaphysis progressing from the epiphysis. In stage 19, the bones of the pelvic waist line show ossification centers. In the tarsal bones the DT I is the first to present ossification centers, at the beginning of stage 24, proceeding with IT, later CT and DT II at the end of stage 24, DT III and DT IV in stage 25. FT shows ossification center in the last embryonic stage, which is stage 26. Retention of the stain in the metatarsal occurs in the following order: M III > M II = M IV > M V > M I. In stage 20, it is evident that, in all the metatarsal, the ossification centers progress in the direction of the epiphyses. The sequence of stain retention in the distal phalanges (DP) occurs in the order: DP V > DP IV > DP III > DP II > DP I. In the medial phalanges (MP), the stain retention sequence is: MP III > MP IV > MP II > MP I. Lastly, the proximal phalanges (PP) retain staining in the following sequence: PP V > PP I > PP II > PP III > PP IV. The differences and similarities in the synchronization of ossification of *Podocnemis expansa* and comparable species are evident. Thus, there is no osteogenetic pattern common to all chelonians, due to variations in the initial site of bone formation and the sequence of ossification.

Key words: Skeleton, Ossification, Alizarin, *Podocnemis expansa*, Reptile.

INTRODUÇÃO

A ordem Testudines, um dos representantes dos répteis, atualmente podem ser encontrados nos mares e em todos os continentes, com exceção da Antártida (POUGH et al., 2003). A estrutura dos membros é altamente variável, refletindo o ambiente e os modos de locomoção das diferentes espécies. Os padrões esqueléticos dos membros dos tetrapodos derivaram do padrão primitivo por meio de perdas e fusões, que podem ser constatadas pelo desenvolvimento embrionário (HILDEBRAND; GOSLOW, 2006; ROMER; PARSONS, 1985).

A maioria dos ossos dos répteis se forma e cresce por ossificação endocondral, um processo caracterizado por uma cartilagem intermediária. O padrão de acontecimentos, que formam este modelo, envolve um processo de várias fases em que células mesenquimais pré-condrogênicas formam condensações, antes de se diferenciarem em condroblastos (POGUE et al., 2004).

Segundo Tagariello et al. (2005), cada uma destas etapas, desde transição de condensação à diferenciação, é caracterizada por padrões temporais específicos e várias mudanças ocorrem em períodos previsíveis. As perturbações desta série, altamente harmônica de acontecimentos em desenvolvimento de cartilagem e osso, crescimento e homeostase, inevitavelmente resultam em defeitos do esqueleto (BELL et al., 2006).

Para Fritsch (2003) e Gray et al. (1996), o conhecimento do critério biológico para a seqüência de formação óssea, em local e tempo previsível, é de grande interesse clínico. O osso está sujeito a numerosas alterações patológicas, que impedem a função normal de sustentação e movimento. Esses distúrbios são alvos da medicina preventiva e cirúrgica e, para serem mais bem solucionados necessitam de subsídios da ciência básica (GUPTA, 2005).

Em Testudines, poucos autores forneceram dados que descrevessem a seqüência de formação óssea. Em outras espécies de répteis, como *Alligator mississippiensis*, *Chamaeleo hoehnelii* e *Gehyra oceanica*, isso tem sido bem estudado (RIEPEL, 1993b; RIEPEL, 1993c; RIEPEL, 1994a). Esses poderão fornecer dados comparativos úteis para esclarecer a colocação filogenética dos Testudines, entre outros répteis e amniotas.

A espécie *Podocnemis expansa*, conhecida popularmente como tartaruga-da-amazônia, é largamente distribuída pela bacia amazônica (MUNDIM et al., 1999). Segundo Alho et al. (1979), a *P. expansa* é o maior Testudine de água doce da América do Sul e atualmente é considerada uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente (SÁ et al., 2004).

Embora o desenvolvimento dos membros em Testudines tenha sido assunto de muita investigação, é relativamente pequeno o conhecimento sobre o padrão do desenvolvimento ósseo do esqueleto apendicular em *P. expansa*.

Este estudo teve como objetivo investigar a sequência de formação dos elementos ósseos, que compõem a cintura pelvina e os membros pelvins, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal, em *P. expansa*.

MATERIAL E MÉTODOS

62 embriões e 43 filhotes recém-nascidos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) foram adquiridos nos períodos de desova ocorridos em 2005 e 2006, na área de reprodução protegida pelo IBAMA/RAN (Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios), nas praias do Rio Araguaia – Goiás, Brasil, na região denominada Remansão (13° 20' 38,7" S e 50° 38' 05,7" W), com licença nº 117/2005-IBAMA/RAN.

Amostras (ovos e filhotes) foram coletadas aleatoriamente, de um ninho escolhido ao acaso, até a eclosão. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram nomeados de acordo com os critérios morfológicos externos de Danni et al. (1990). Após a eclosão, os filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos com temperatura em torno de 27 °C e alimentados com ração para peixes.

Todos os embriões foram retirados dos ovos cortando-se a casca com tesoura cirúrgica, isolando-os do vitelo e dos seus envoltórios. Efetuou-se morfometria (Quadro e 2) com auxílio de paquímetro metálico (125 MEB-6/150, Starret), precisão de 0,05 milímetro, e balança analítica (AND HR-120, Gravimeta), precisão de 0,1 grama. Os parâmetros registrados foram: comprimento da carapaça, largura da carapaça, comprimento do plastrão, largura do plastrão, altura, comprimento crânio-

caudal e peso corporal (PC), seguindo-se a orientação de Malvásio et al. (2002) e Danni et al. (1990).

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por KOH e coloração dos ossos pela alizarina red S e da cartilagem pelo alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e de Dingerkus e Uhler (1977) modificado, no Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

A presença de centros de ossificação, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento dos elementos ósseos que compõem a cintura e os membros pelvins (Figuras 3, 4 e 5), foram analisados em microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus) e câmera fotográfica digital (fe100, Olympus 6.0). Ainda, dois desenhos representativos dos ossos da cintura pelvina e dos ossos do membro pelvino foram confeccionados, utilizando-se para tal seis esqueletos de *P. expansa* adultos do acervo do LAPAS (Figuras 1 e 2).

RESULTADOS

Osteologia da cintura pelvina e dos membros pelvins

Cintura pelvina: É formada por três pares de ossos: ílio, ísquio e pube. Os três ossos contribuem para a formação do acetábulo, onde se articulam os membros pelvins (Figura 1).

Ílio: O osso ílio compõe a maior parte da cintura pelvina. A extremidade dorsal é trirradiada com uma expansão caudomedial, caudolateral e uma craniomedial, mais afilada. Na extremidade ventral, a porção lateral do ílio forma a maior parte da superfície articular do acetábulo côncavo, onde se une com o ísquio e o pube. A extremidade dorsal do ílio é unida à carapaça na região das placas costais 7 e 8 (Figura 1).

Ísquio: O osso ísquio forma a parte caudoventral do acetábulo. A extremidade distal possui formato aproximadamente triangular em seção transversal. A sua superfície ventral encontra-se unida à superfície dorsal da região caudal do xifiplastrão (Figura 1).

Pube: O osso pube forma a parte cranioventral do acetábulo. A porção proximal conecta-se ao ílio dorsalmente e ao ísquio, caudalmente. Une-se com a superfície dorsal da região cranial do xifiplastrão, formando uma cicatriz ovalada (Figura 1).

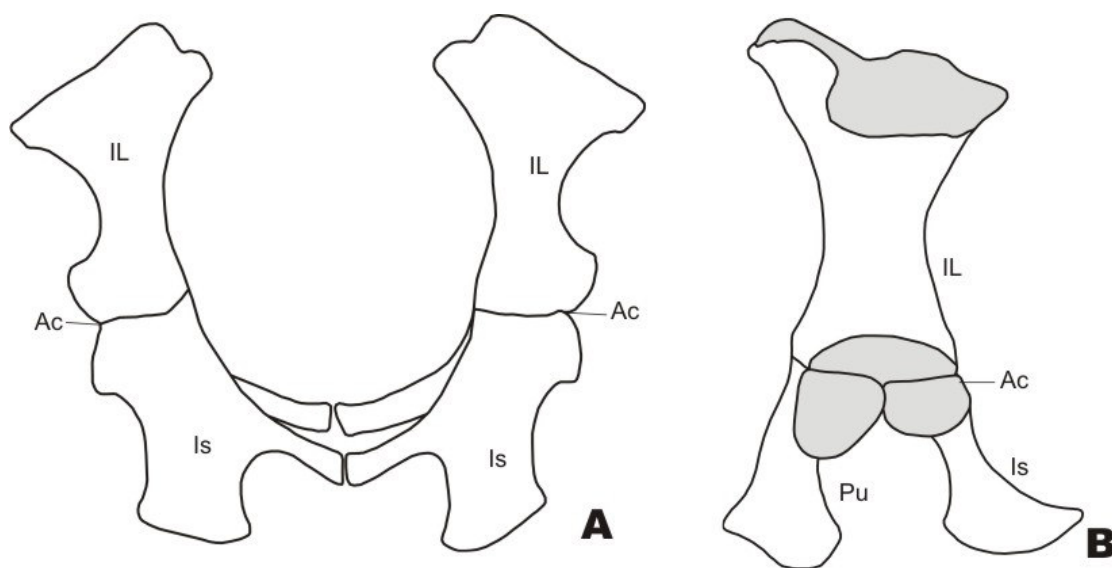


Figura 1: Desenho esquemático dos ossos da cintura pelvina. **A**, cintura pelvina; vista cranial **B**, metade esquerda da cintura pelvina, vista lateral. IL, osso ílio; Is, osso ísquio, Pu, osso pube; Ac, acetábulo.

Membro pelvino: É composto pelo estilopódio, osso fêmur, zeugopódio, osso tíbia e o osso fíbula e o autopódio, ossos do tarso, metatarsos e falanges (Figura 2).

Fêmur: De modo geral o osso fêmur possui eixo cilíndrico com extremidades expandidas. Proximalmente exibe uma cabeça ovalada, ajustada ao acetábulo e dois processos bem desenvolvidos: trocanter menor, dorsalmente e trocanter maior ventralmente. Articula-se com a tíbia e com a fíbula distalmente (Figura 2).

Tíbia: Possui a extremidade proximal expandida. A face articular proximal apresenta uma concavidade mediocaudal rasa que se articula com a região ventral da

superfície articular da extremidade distal do fêmur. Distalmente articula-se com o tarso (Figura 2).

Fíbula: A fíbula é delgada, com a extremidade distal expandida. O eixo da fíbula é praticamente reto. Articula-se distalmente com o tarso e proximalmente com a região dorsal da superfície articular da extremidade distal do fêmur (Figura 2).

Tarso: É formado por sete ossos irregulares: intermédio do tarso (IT), fibular do tarso (FT), central do tarso (CT), distais do tarso (DTI, DTII, DT III e DTIV). Proximalmente articula-se com a tíbia e com a fíbula e distalmente se articula com os ossos metatarsos (Figura 2).

Metatarsos: Os ossos metatarsos consistem de cinco elementos ósseos, convencionalmente numerados no sentido médio-lateral de metatarsos I, II, III, IV e V. Articula-se com o tarso pelas suas extremidades proximais e com as falanges proximais pelas suas extremidades distais (Figura 2).

Falanges: Cada pé possui 14 falanges, duas no quinto dedo e três em cada um dos demais dedos, cuja fórmula falângica é 3:3:3:3:2 (Figura 2).

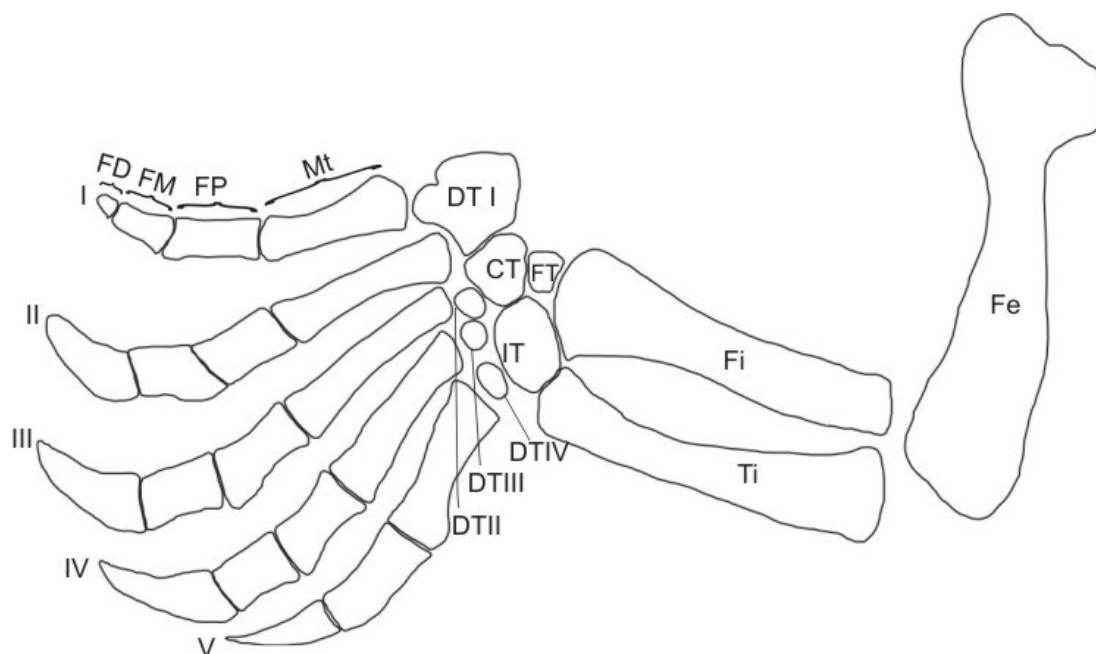


Figura 2: Desenho dos ossos do membro pélvico esquerdo de *Podocnemis expansa*. Fe, osso fêmur; Fi, osso fíbula; Ti, osso tíbia; DT I, osso distal do tarso I; DT II, osso distal do tarso II, DT III, osso distal do tarso III, DT IV; osso distal do tarso IV CT, osso central do tarso, IT, osso intermédio do tarso; FT, osso fibular do tarso; FD, falanges distais; FM, falanges médias; FP, falanges proximais; Mt, ossos metatarsos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V.

Seqüência de ossificação da cintura pelvina e dos membros pelvins

No estágio 16, o fêmur, a tibia e a fíbula apresentam centros de ossificação na diáfise progredindo para as epífises (Figuras 3A, B e C). No estágio 19, os ossos da cintura pelvina, ílio, ísquio e pube mostram centros de ossificação (Figuras 3D, E e F). Nos ossos do tarso o DT I é o primeiro a apresentar centro de ossificação no início do estágio 22 (Figura 4B). No estágio 23 o IT, o CT, e o DT II, no início do estágio 24 o DT III, e no final desse mesmo estágio o DT IV mostram centros de ossificação (Figuras 4C, D e E). E, finalmente, o FT exibe centro de ossificação no último estágio de desenvolvimento, estágio 26 (Figura 4F). De acordo com a retenção de corante a seqüência ocorre assim: DTI>CT>IT>DTII>DTIII>DT IV>FT.

A ossificação dos metatarsos (Mt) torna-se aparente inicialmente na diáfise dos mesmos e no estágio 18 os Mt V ao Mt II exibem ossificação. A retenção de alizarina parece ser maior no Mt III e menor nos Mt II, Mt IV e Mt V (Figura 5A). O centro de ossificação do Mt I aparece no estágio 19 (Figura 5B). No estágio 20, o processo de ossificação já é bem mais adiantada, progredindo em direção às epífises, com o Mt I sempre mais atrasado (Figura 5C). Assim, a retenção do corante ocorre na seguinte ordem: MtIII>MtII=MtIV>MtV>MtI.

Durante o estágio 18, as falanges distais (FD) exibem centros de ossificação nos dedos IV e V. No dedo III o processo de ossificação ocorre no estágio 19 e no dedo II no estágio 20 (Figuras 5A, B e C). A ossificação da falange distal do dedo I só foi verificada no estágio 25 (Figura 5H). Portanto, a seqüência de retenção de corante nas falanges distais ocorre na ordem: FD V>FD IV>FD III>FD II>FD I.

Os centros de ossificação das falanges médias (FM) aparecem primeiramente nos dedos III e IV, no estágio 20 e segue no dedo II, no estágio 21 (Figuras 5C e D). Finalmente, no estágio 22 a falange média do dedo I mostra centro de ossificação (Figura 5E). O grau de ossificação ocorre assim: FM III > FM IV > FM II > FM I.

No estágio 19 há presença de um centro de ossificação bem suave na falange proximal do dedo V. No estágio 20 a coloração apresenta-se um pouco mais evidente, o que indica que essa é a primeira falange proximal a iniciar o processo de ossificação (Figuras 5B e C). No estágio 21, centro de ossificação foi evidenciado na falange proximal do dedo I (Figura 5D). No estágio 22, a falange proximal do dedo II mostra centro de ossificação, o dedo III no estágio 23 e o dedo IV no estágio 24

(Figuras 5E, F e G). O evento acontece na seguinte ordem: FP V > FP I > FP II > FP III > FP IV.

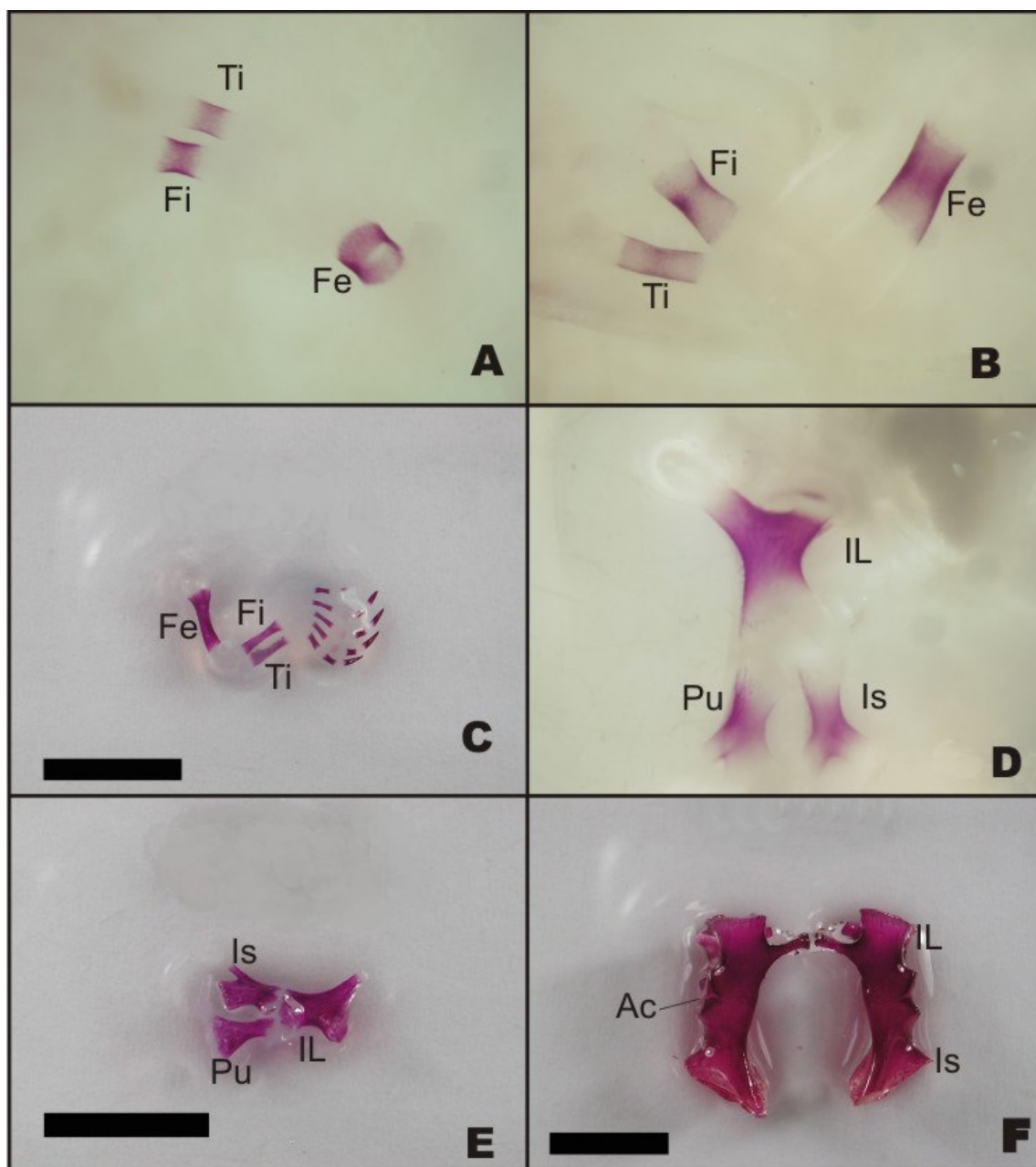


Figura 3: Fotografias de embriões de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 16; (B) estágio 17; (C) estágio 19, (D) estágio 20, (E) estágio 21, (F) 6 meses após eclosão. Fe, osso fêmur, Ti, osso tíbia, Fi, osso fíbula, IL, osso ílio, Is, osso ísquio, Pu, osso pube. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red S (A e B) x 25, (C) x12,5, (D) x7, (C, E e F) barra: 10 mm.

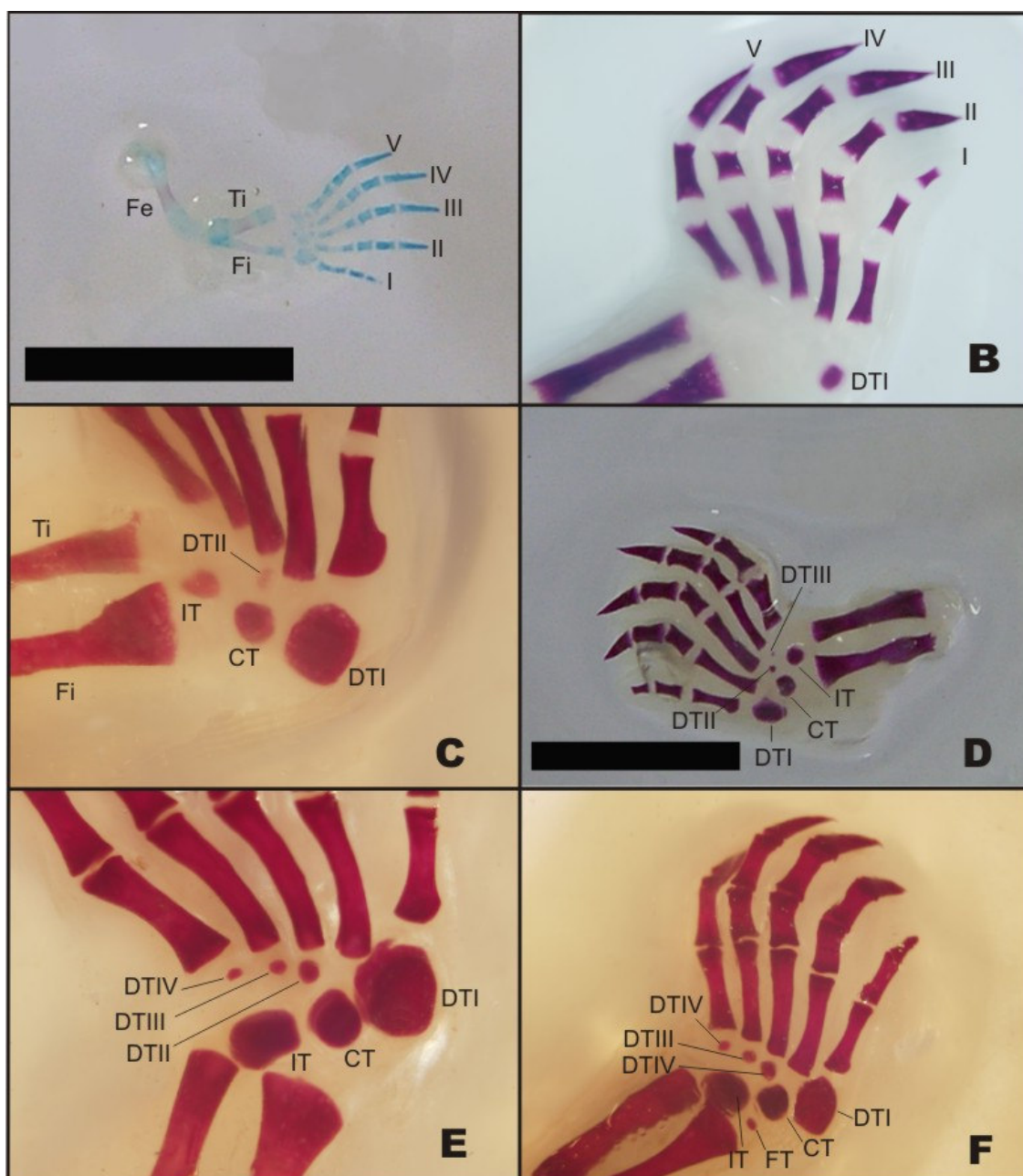


Figura 4: Fotografias de membros pelvins de embriões de *Podocnemis expansa*. (A) estágio 19, (B) início estágio 22, (C) estágio 23, (D) início do estágio 24, (E) final do estágio 24, (F) estágio 26. Fe, osso fêmur; Fi, osso fíbula; Ti, osso tíbia; DT I, osso distal do tarso I; DT II, osso distal do tarso II, DT III, osso distal do tarso III, DT IV, osso distal do tarso IV; DT V, osso distal do tarso V; CT, osso central do tarso, IT, osso intermédio do tarso; FT, osso fibular do tarso; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red S e cartilagem com alcian blue. (B)x10; (C e E)x 12,5; (F)x7; (A e D) barra 10mm.

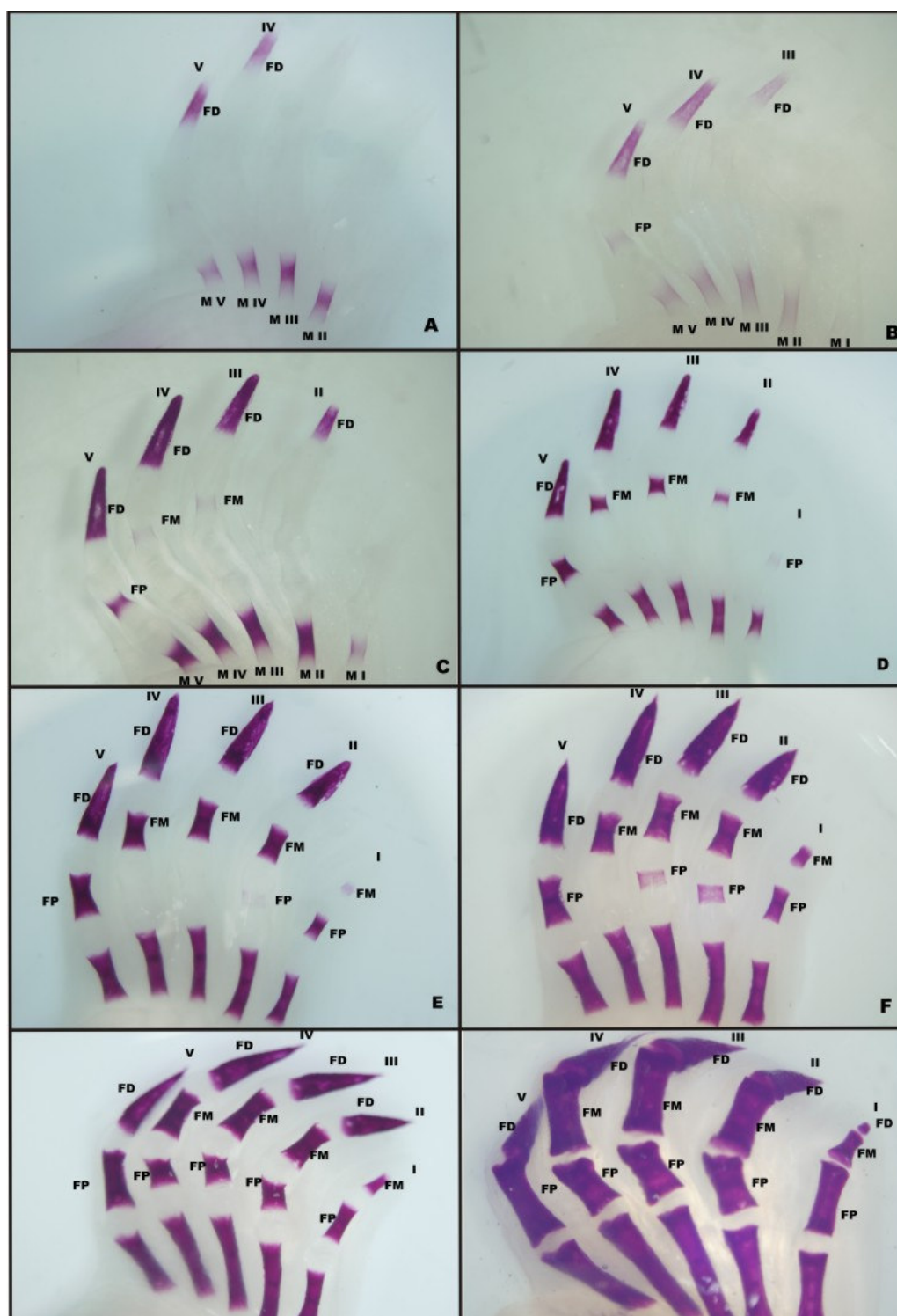


Figura 5: Fotografias de pés de embriões de *Podocnemis expansa*, vista dorsal. (A) estágio 18, (B) estágio 19, C – estágio 20: Desenvolvimento dos metatarsos e das falanges distais. (D) estágio 21, (E) final do estágio 22: Desenvolvimento das falanges médias. (F) estágio 23, (G) estágio 24, (H) estágio 25: Todos os centros de ossificação. FP, falanges proximais; FM, falanges médias; FD, falanges distais; Mt, ossos metatarsos; I, dedo I; II, dedo II; III, dedo III; IV, dedo IV; V, dedo V. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com alizarina red S e cartilagem com alcian blue. (A, B e C)x16 e (D, E, F, G e H)x 12,5.

DISCUSSÃO

Neste estudo, embora tenham sido nomeados os estágios para os embriões, as comparações foram feitas entre as espécies, em termos de seqüência de acontecimentos do desenvolvimento da ossificação.

As diferenças e semelhanças na sincronização de ossificação são aparentes entre *Chelydra serpentina*, *Apalone spinifera*, *Macrochelys temminckii* e *P. expansa*, nas unidades estruturais do esqueleto da cintura pelvina e membros pelvins. Segundo Burke e Alberch (1985), a maioria das diferenças é encontrada na região do tarso com fusão de alguns ossos. Segundo Romer e Parsons (1985), essa fusão de elementos ósseos proporciona mais apoio aos membros pelvins dos répteis, tornando-os mais adaptados ao meio em que vive. Diferenças anatômicas na fórmula falângica também ocorrem, com 3:3:3:3:2 para *P. expansa*, 2:3:3:3:2 para *C. serpentina* e *M. temminckii* e 2:3:3/4:4/5:2 para *A. spinifera*, apesar de todas pertencerem a mesma ordem, a dos Testudines.

Em *A. spinifera* o fêmur, a tíbia e a fíbula começam a ossificar antes dos elementos ósseos da cintura pelvina (SHEIL, 2003). O mesmo foi observado em *P. expansa*, *C. serpentina* e *M. teminckii* (SHEIL; GREENBAUM, 2005; SHEIL, 2005).

Para Sheil e Greenbaum (2005), em *C. serpentina*, nos ossos do tarso o intermédio é o primeiro a apresentar centro de ossificação, seguido do DT V. Os demais ossos do tarso apresentam centros de ossificação após o nascimento. Em *P. expansa* o DT I é o primeiro, seguido do CT, IT e DT II. Segundo Sheil (2003), em *A. spinifera*, o intermédio apresenta centro de ossificação simultaneamente com os ossos distais do tarso I, II, III e IV. Segundo o autor a ossificação dos distais do tarso ocorre rapidamente, assim não foi possível definir a seqüência entre eles. No estágio 25 o central IV e o fibular do tarso começam a ossificar. Os demais ossos apresentam centros de ossificação depois da eclosão.

Em *P. expansa* todos os ossos do tarso apresentam centros de ossificação no período pré-natal, diferentemente do que ocorre em *M. teminckii*, onde todos os ossos do tarso só apresentam centros de ossificação no período pós-natal (SHEIL, 2005).

As diferenças entre *A. spinifera*, *C. serpentina*, *M. temminckii* e *P. expansa* indicam que há mais de um padrão de ossificação dos elementos ósseos do tarso entre Testudines.

Tanto em *C. serpentina*, *A. spinifera* e *M. temminckii*, quanto em *P. expansa*, o início do processo de ossificação em Mt II ao Mt IV apresenta-se cronologicamente diferente.

Uma reconsideração sobre o desenvolvimento esquelético de *C. serpentina*, evidenciando variações intraespecíficas, foi realizado por Sheil e Greenbaum (2005), que apontaram o Mt IV e o Mt III como os primeiros ossos a apresentar centros de ossificação. Em seguida apareceu o Mt II, o Mt I e depois o Mt V. Os acontecimentos dos dois últimos metatarsos foram semelhantes àqueles em *A. spinifera* e *C. serpentina* de Rieppel (1993a) e diferentes em *P. expansa*.

De acordo com Sheil (2003), os centros de ossificação na *A. spinifera* começam a aparecer em Mt II, Mt III e Mt IV, sem revelar a seqüência na retenção do corante, embora a maior variação na seqüência da ossificação tenha ocorrido, nesses três ossos, em *P. expansa*.

Para Sheil (2005), em *M. temminckii*, o grau de retenção do corante alizarina é maior no Mt IV e diminui progressivamente no Mt I. O autor ainda comenta que o número de espécimes não foi suficiente para relatar com detalhes o aparecimento dos centros de ossificação.

Os padrões de ossificação das falanges de *C. serpentina*, propostos por Rieppel (1993a) e Sheil e Greenbaum (2005), não são idênticos em todos os pontos observados. No entanto, é possível afirmar que em ambos os estudos, a osteogênese nos dedos do pé inicia-se nas falanges distais e prossegue no sentido disto-proximal. Este padrão foi constatado em *P. expansa* nos dedos II, III, IV e V, assim como acontece com *M. temminckii* (SHEIL, 2005), nos dedos de I, II e III, onde o grau de ossificação é maior na falange distal do dedo III e diminui progressivamente na falange distal do dedo I. Já na *A. spinifera* (Sheil, 2003), e no dedo I de *P. expansa*, o progresso da ossificação nas falanges ocorre no sentido próximo-distal.

Estas informações indicam que em *P. expansa*, *C. serpentina* e *M. temminckii* o padrão de formação de osso dos dedos II a IV é semelhante, com exceção do

dedo IV da *M. temminckii* (SHEIL, 2005), onde a osteogênese é mais demorada em relação aos outros dedos, e avança próximo-distal.

Detalhes da seqüência relativa de ossificação foram documentados para lagartos e crocodilianos e comparações entre estes estudos identificam padrões entre linhagens importantes de Reptilia.

A seqüência e sincronização da ossificação em *P. expansa* exibem similaridades, bem como diferenças, quando comparada com *Lacerta vivipara* (RIEPPPEL, 1992), *Lacerta agilis exígua* (RIEPPPEL, 1994b) e *Alligator mississippiensis* (RIEPPPEL, 1993b). Fica evidente que estudos mais quantitativos são necessários para documentar a variabilidade natural de formação do osso.

Falanges de *Lacerta vivipara*, *Lacerta agilis exígua* e *Alligator mississippiensis* geralmente se ossificam numa direção próximo-distal, com dominância do dedo IV, do dedo III e do dedo III, respectivamente, ao passo que estes elementos, em *P. expansa*, ossificam-se numa direção disto-proximal, com dominância do dedo V.

Segundo Rieppel (1993a), atenção considerável tem sido dispensada para documentar seqüências do desenvolvimento ósseo durante a ontogenia, mas relativamente pouco se conhece sobre variações intraespecíficas em qualquer táxon. Destacam-se, neste sentido, as diferenças na cronologia de ossificação notadas entre alguns dos ossos que compõem o esqueleto do pé de *P. expansa*.

CONCLUSÕES

Os ossos fêmur, tíbia e fíbula começam a se ossificar simultaneamente e antes dos ossos da cintura pelvina.

A seqüência de ossificação dos ossos do tarso é: DTI>CT>IT>DTII>DTIII>DTIV>FT.

A seqüência de ossificação dos ossos metatarsos é: MtIII>MtII=MtIV>MtV>MtI.

A fórmula falângica da *Podocnemis expansa* é 3:3:3:3:2. O sentido de progressão da ossificação nos dedos II, III, IV e V é disto-proximal e no dedo I é próximo-distal.

A seqüência de ossificação das falanges é: FD V > FD IV > FD III > FD II > FD I; FM III > FM IV > FM II > FM I e FP V > FP I > FP II > FP III > FP IV.

Não existe um padrão de osteogênese para todos os Testudines.

REFERÊNCIAS

ALHO, C.J.R.; CARVALHO, A.G.; PÁDUA, L.F.M. Ecologia da tartaruga da amazônia e avaliação de seu manejo na reserva biológica do trombetas. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 9, n. 38, p. 29-47. 1979.

BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, Barking, v. 142, p. 457-465, 2006.

BURKE, A. C.; ALBERCH, P. The development and homology of the chelonian carpus and tarsus. **Journal of Morphology**. New York, v. 186, p. 119-131, 1985.

DANNI, T. M. S.; DARDENNE, M. A. R.; NASCIMENTO, S. M. Estudo morfológico do desenvolvimento embrionário da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa*, pelomedusidae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 50, n. 3, p. 619-625, 1990.

DAVIS, D. D.; GORE, U. R. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. **Field Museum of Natural History**, Chicago, v. 4, p. 3-15, 1936.

DIGENKUS, G.; UHLER, L. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. **Stain Technology**, Baltimore, v. 52, n. 4, p. 229-232, 1977.

FRITSCH, H. Development of the Human Hand: A Short, Up-to-Date Overview. **European Surgery**, v 35, p. 125–128, 2003.

GRAY, C.; BOYDE, A.; JONES, S. J. Topographically Induced Bone Formation In Vitro: Implications for Bone Implants and Bone Grafts. **Bone**, New York, v. 18, p. 115-123, 1996.

GUPTA, R. K. Long bone fractures in osteopetrosis: awareness of primary pathology and appropriate pre-operative planning necessary to avoid pitfalls in fixation. **Injury Extra**, v. 36, p. 37-41, 2005.

MALVÁSIO, A.; SOUZA, A.M.; GOMES, N.; SAMPAIO, F.A. A.; MOLINA, F. B. Morfometria e morfologia do canal alimentar pós-faríngeo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812.), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Anapsida, Testudines). **Instituto Pau Brasil**, São Paulo, v. 5, p. 39-51, 2002.

MUNDIM, A. V.; QUEIROZ, R. P.; SANTOS, A. L. Q.; BELLETI, M. E.; LUZ, V. L. F. Bioquímica sanguínea da tartaruga da amazônia (*Podocnemis expansa*) em seu habitat natural. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 15, n. 2, p. 35-43, 1999.

POGUE, R.; SEBALD, E.; KING, L.; KRONSTADT, E.; KRAKOW, D.; COHN, D. H. A transcriptional profile of human fetal cartilage. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 23, p. 299–307, 2004.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B, **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003.

RIEPPPEL, O. Studies on skeletal formation in reptiles. III. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta vivipara* Jacquin (Reptilia, Squamata). **Zoology**, Jena, v. 68, p.1-25, 1992.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). **Journal of Zoology**, London, v. 231, p. 487-509, 1993a.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. V. patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* Daudin (Reptilia, Crocodylia). **Journal of Zoology**, London, v. 109, p. 301-3251, 1993b.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles. 2. *Chamaeleo hoehnelii* (Squamata, Chamaeleoninae), with comments on the homology of carpal and tarsal bones. **Herpetologica**, Lafayette, v. 49, n. 1, p. 66-78, 1993c.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles - patterns of ossification in the limb skeleton of *Gehyra oceanica* (Lesson) and *Lepidodactylus lugubris* (Dumeril and Bibron). **Annales des Sciences Naturelles-zoologie et Biologie Animale**, Paris v. 15, n. 2, p. 83-91, 1994a.

RIEPPEL, O. Studies on skeleton formation in reptiles - patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta agilis-exigua* Eichwald (Reptilia, Squamata). **Journal of Herpetology**, Athens, v. 28, p. 145-153, 1994b.

ROMER, A. S.; T. PARSONS. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985.

SÁ, V. A.; QUINTANILHA, L. C.; FRENEAU, G. E.; LUZ, V. L. F.; BORJA, A. R.; SILVA, P. C. Crescimento ponderal de filhotes de tartaruga gigante da Amazônia (*Podocnemis expansa*) submetidos a tratamento com rações isocalóricas contendo diferentes níveis de proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2351-2358, 2004.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SHEIL, C. A. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 256, p. 42-78, 2003.

SHEIL, C. A. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). **Journal of Morphology**, New York, v. 263, p. 71-106, 2005.

TAGARIELLO, A.; SCHLAUBITZ, S.; HANKELN, T.; MOHRMANN, G.; STELZER, C.; SCHWEIZER, A.; HERMANN, P.; LEE, B. SCHMIDT, E. R.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B. Expression profiling of human fetal growth plate cartilage by EST sequencing. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 24, p. 530 – 538, 2005.

APÊNDICE



Figura 1: **A**, Vista panorâmica do acampamento do RAN/IBAMA, no Rio Araguaia, município de São Miguel do Araguaia, Goiás, Brasil; **B**, **C** e **D**, Coleta dos ovos.

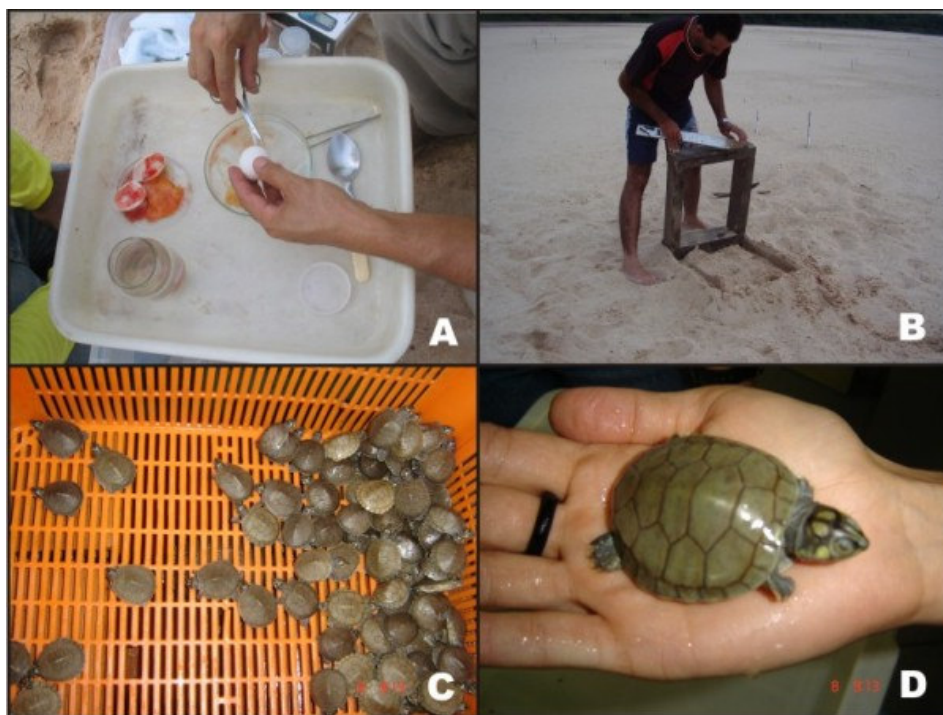


Figura 2: **A**, Retirada do embrião do ovo; **B**, tela envolvendo o ninho; **C** e **D**, filhotes de *P. expansa* recém eclodidos.

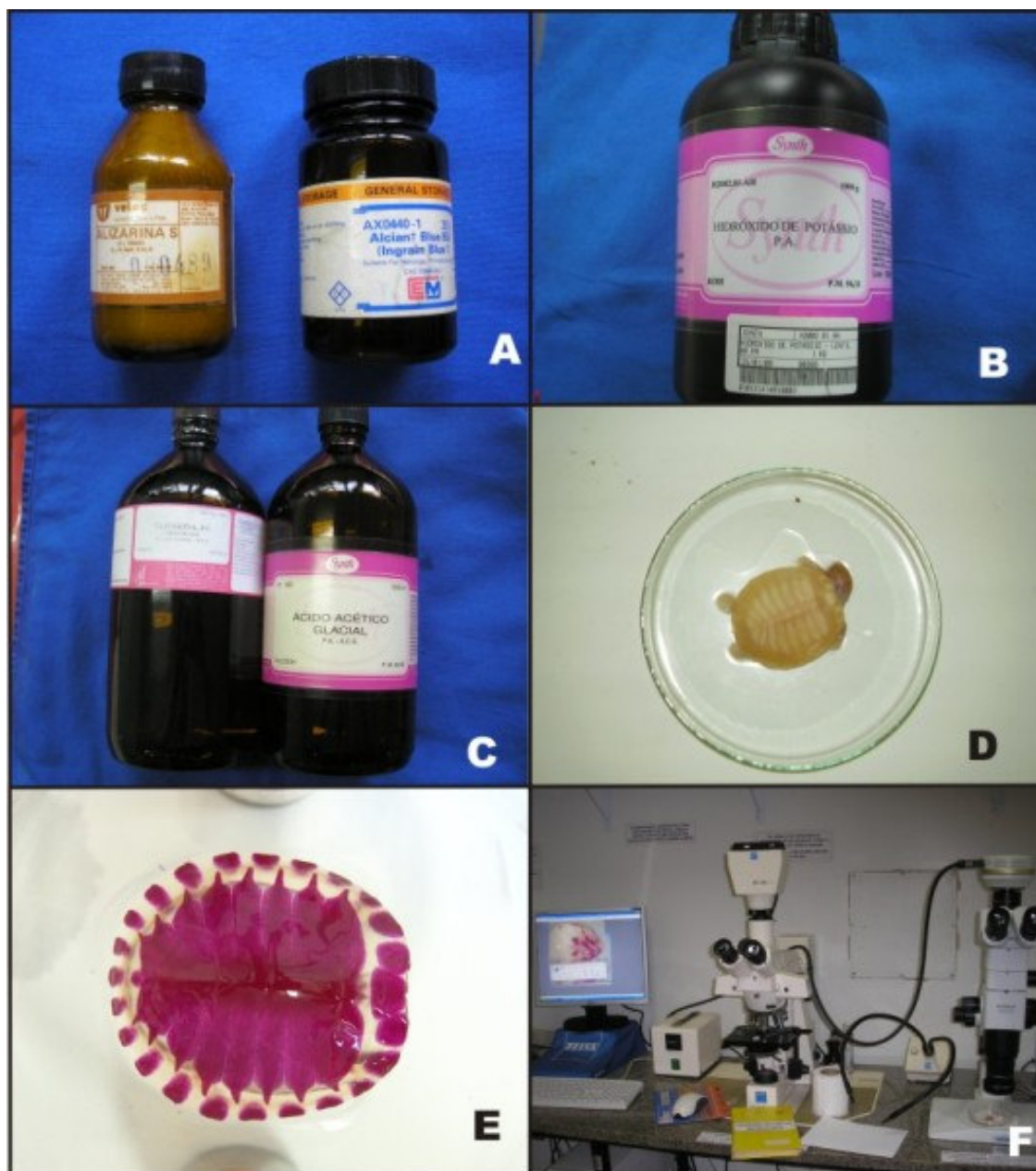


Figura 3: A, B e C, reagentes químicos utilizados na pesquisa; D e E, embriões de *P. expansa* em processamento; F, microscópio estereoscópico (SZX 12, Olympus) com câmera acoplada para captura de imagens (DP10, Olympus).

Quadro 1: Médias de comprimento (Comp.) e largura (Larg.) de carapaça e plastrão, altura, comprimento crânio-caudal (CR) e peso de embriões de *Podocnemis expansa*, dos estágios 17 ao 26.

Estágio	Carapaça		Plastrão		Altura	CR	Peso
	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.			
17	14,55	11,95	10,25	6,60	6,50	31,5	3,20
18	18,45	15,26	11,98	9,05	8,12	36,68	4,03
19	19,76	16,16	13,31	10,78	9,95	37,85	4,52
20	19,99	17,05	14,18	11,85	10,05	39,25	4,97
21	30,51	26,51	22,96	21,75	14,30	42,80	12,98
22	36,42	32,60	27,23	24,13	17,61	49,80	20,02
23	37,95	36,11	26,50	25,31	20,18	52,90	23,83
24	38,55	37,25	27,89	25,02	21,48	54,11	25,23
25	39,86	38,95	29,59	27,31	22,97	56,13	27,89
26	40,15	37,58	26,5	24,63	20,43	60,05	32,65

Quadro 2: Médias de comprimento (Comp.) e largura (Larg.) de carapaça e plastrão, altura, comprimento crânio-caudal (CR) e peso de filhotes de *Podocnemis expansa*, recém-eclodidos.

Animal	Carapaça		Plastrão		Altura	CR	Peso
	Comp.	Larg.	Comp.	Larg.			
1	57,70	47,30	48,85	35,85	23,60	31,71	57,70
2	65,50	58,50	55,70	42,00	26,10	46,36	65,50
3	69,00	59,40	57,90	43,85	29,65	54,88	69,00
4	73,30	63,90	62,00	42,10	30,75	64,33	73,30
5	62,10	55,75	51,85	43,30	25,30	42,33	62,10
6	57,45	52,70	47,50	40,85	24,30	42,31	57,45
7	75,10	64,50	65,15	44,40	33,90	33,52	75,10
8	61,05	56,25	51,80	40,75	25,30	68,20	61,05
9	57,45	50,40	48,55	37,80	25,25	40,73	57,45
10	59,05	52,30	48,85	38,35	25,40	32,48	59,05
11	59,00	51,95	49,25	38,30	21,95	32,98	59,00
12	62,95	56,60	52,45	39,70	22,00	31,85	62,95
13	62,75	53,90	52,10	39,50	25,90	41,95	62,75
14	52,45	42,10	44,90	36,00	24,40	27,63	52,45
15	61,95	56,65	49,85	40,50	26,25	39,70	61,95
16	59,30	55,10	48,70	37,45	24,65	34,00	59,30
17	61,60	58,70	55,90	42,55	30,25	49,50	61,60
18	63,00	54,90	52,45	49,05	29,15	40,04	63,00
19	69,20	59,80	58,30	45,20	30,80	57,11	69,20
20	61,35	54,85	52,00	38,55	26,60	38,07	61,35
21	55,60	50,10	46,80	37,70	20,00	30,50	55,60
22	61,90	55,25	52,80	42,45	27,20	41,50	61,90
23	60,00	54,95	54,20	40,20	27,15	40,87	60,00
24	52,75	47,95	42,70	36,30	29,00	25,40	52,75
25	56,40	51,55	46,10	37,85	20,10	32,20	56,40
26	70,40	59,80	60,20	46,55	31,35	57,70	70,40
27	61,40	54,65	51,00	40,25	25,60	37,80	61,40
28	60,95	55,10	51,55	41,40	27,20	39,30	60,95
29	90,30	56,95	48,80	43,30	27,00	39,84	90,30
30	68,40	61,40	58,35	44,55	29,55	53,94	68,40
31	58,30	51,95	47,50	39,05	25,20	32,11	58,30
32	65,25	58,40	53,50	43,75	27,75	47,63	65,25
33	53,25	50,00	41,45	38,35	23,20	26,90	53,25
34	57,80	51,70	48,00	38,55	25,55	33,52	57,80
35	57,00	51,20	47,40	38,20	25,00	33,63	57,00
36	62,65	48,30	52,20	38,55	26,90	40,27	62,65
37	58,00	49,25	49,50	40,70	24,80	35,30	58,00
38	53,55	46,10	43,45	36,20	25,30	28,00	53,55
39	61,60	56,70	51,50	43,50	26,45	38,50	61,60
40	57,10	52,40	46,10	39,50	20,05	32,13	57,10
41	65,30	59,45	54,90	44,90	28,55	46,96	65,30
42	62,65	55,15	53,30	43,20	26,90	40,91	62,65
43	60,75	53,60	50,25	40,50	25,85	38,80	60,75

