
Ciências Biológicas

Juliana Della Nina Pistoni

**Efeito da hipercarbia no desenvolvimento
de ovos de *Trachemys scripta***



Rio Claro
2010

Juliana Della Nina Pistoni

Efeito de hipercarbia no desenvolvimento de ovos de *Trachemys scripta*

Orientador: Augusto Shinya Abe

Co-orientador: Cléo Alcântara Costa Leite

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

591.1 Pistoni, Juliana Della Nina
P679e Efeito de hipercarbia no desenvolvimento de ovos de
Trachemys scripta / Juliana Della Nina Pistoni. - Rio Claro :
[s.n.], 2010
39 f. : il., figs., gráfs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado
- Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Augusto Shinya Abe

Co-Orientador: Cléo Alcântara Costa Leite

1. Animais – Fisiologia. 2. Hipercarbia. 3. Incubação. 4.
Trachemys scripta. 5. Gás carbônico. I. Título.

Aos meus pais, Domingos e Denise, pelo apoio, dedicação e confiança em mim depositada; à minha irmã, Caroline, pela paciência para escutar e dar suporte; aos meus amigos Carolina(Coró), Cristiane(Cris) e Tulio(Batata), pela amizade sincera e presença marcante em todos os dias desde o início da graduação e ao André (Be) pelo companheirismo e compreensão.

Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTO

Começo agradecendo ao Cléo, pela paciência em me fazer entender a relevância de todos os resultados do trabalho e pela dedicação à elaboração e desenvolvimento de cada etapa e à Marina, pela presença em todos os momentos, naqueles nos quais tudo correu conforme o planejado e também naqueles em que parecia que todo trabalho estava indo por água abaixo.

Agradeço também ao Carlinhos, ao Marcelo e à Samanta, pelo cuidado com os animais sempre, pela paciência e disponibilidade para ajudar em todos os momentos e pelas conversas descontraídas durante a tarde.

Aos meus amigos, um agradecimento especial, por me ouvirem reclamar em tantos momentos e mesmo assim me apoiarem. Coró, mesmo longe por um tempo, esteve sempre presente, me ouvindo noites adentro e me mostrando como a vida também é feita de momentos de diversão. Cris, acho que nem a estrada entre São Paulo e Rio Claro tem noção do quanto você me ajudou todos esses anos, me ouvindo e me animando para voltar para Rio Claro a cada semana. Batata, por sempre me fazer esquecer problemas e me mostrar a beleza e a importância de pequenos detalhes da vida.

Agradeço ao Be, que apesar de não entender muito sobre o que eu estava falando, sempre me ouviu com atenção e dedicação, me apoiou e me acompanhou durante todo o trabalho.

À minha irmã, Carol, que além de me ouvir sempre, independente da situação, sempre me aconselhou, e me mostrou como seguir adiante em momentos que pareciam o fim da linha, fica aqui o meu eterno agradecimento.

Por último, agradeço àqueles sem os quais este trabalho jamais teria sido possível, minha mãe e meu pai, que por algum motivo acreditaram e confiaram em uma capacidade que eu nunca imaginei que tinha.

Obrigada!



“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Fêmeas do quelônio de água doce, *Trachemys scripta*, apresentam ciclo reprodutivo anual. Depositam em média de 7 a 10 ovos entre o final de setembro e o início de dezembro, em ninhos cavados no solo. Como estes são cobertos com o mesmo substrato, sua compactação ou ainda o encharcamento da cobertura ou do ninho pode reduzir, ou até mesmo impedir a difusão dos gases entre a câmara e o meio externo. Isto faz com que os ovos fiquem sujeitos a baixas pressões de O₂ (hipóxia) e altas pressões de CO₂ (hipercarbia). Estudos com esta espécie mostraram que um aumento na concentração de gás carbônico acarreta maior tempo de incubação, maior quantidade de vitelo residual e aumento da mortalidade. Apesar disto, estes experimentos foram realizados com pressões parciais, de 10 a 15% CO₂, muito superiores as possíveis pressões reais. O presente estudo teve como principal objetivo determinar o impacto que concentrações elevadas de CO₂ (3% e 6%) podem causar no desenvolvimento de ovos de *Trachemys scripta* e nos filhotes recém eclodidos. Para isso, os ovos foram coletados no primeiro dia de postura e distribuídos em 3 grupos experimentais: um grupo controle, incubado com ar atmosférico (Controle – C, n = 14), e dois grupos incubados com misturas de gases com 3% de CO₂ (G3, n = 16) e com 6% de CO₂ (G6, n = 15). O ganho de peso dos ovos ao longo do desenvolvimento foi similar entre os grupos. Mesma similaridade ocorre em relação a massa média dos filhotes recém eclodidos (C = 9,89±0,81g; G3 = 10,11±0,60g e G6 = 10,58±0,36g). A média do tempo de incubação foi similar entre os grupos experimentais (C = 60,12±0,97dias, G3 = 59,00±0,98dias e G6 = 60,80±1,14dias). A hipercarbia também não alterou a taxa mortalidade dos ovos (C = 43%; G3 = 27%; G6 = 37%). Além disto, tanto o ganho de peso quanto a taxa metabólica foram similares entre os grupos experimentais por três meses após a eclosão. A partir da análise destes dados, é possível concluir que a hipercarbia (até 6% CO₂) não altera nenhum parâmetro que influencie a viabilidade dos ovos, velocidade e padrão de desenvolvimento, ou mesmo o padrão metabólico geral dos jovens recém eclodidos nesta espécie. Ainda é possível que este resultado seja diferente se a hipercarbia for combinada com hipóxia, ou se níveis ainda mais elevados de hipercarbia ocorrerem nos ninhos.

Palavras chave: Hipercarbia, incubação, *Trachemys scripta*, gás carbônico.

ABSTRACT

Females of the painted turtle, *Trachemys scripta*, have an annual reproductive cycle. Their nest periods in Brazil starts around September and they lay about 7 - 10 eggs in nests dug in the soil. The eggs hatch in December. It is possible that the nest cover cause problems for the gas diffusion, also, the rain can wet or compact the soil covering the nest, or even soaked the whole area. Those problems may change the nests intern atmosphere decreasing O₂ partial pressure (hypoxia) and increasing CO₂ partial pressure (hypercarbia). The main objective of this study was to determine if and how hypercarbia (3% and 6%CO₂), could influence the eggs and early post-hatching development of the *Trachemys scripta*. We used three experimental groups of eggs incubated in: normal atmosphere (Control group CG, n = 14), hypercarbia with 3% of CO₂ (G3%, n = 16) and with 6% of CO₂ (G6%, n = 15). The profile of the mass increment during the egg development were not different among the groups, GC = 9.89±0.81g; G3% = 10.11±0.60g and G6% = 10.58±0.36g. In addition, the mass of the post-hatching turtles were the not different. There were not differences between the duration of the incubation period among the experimental groups, GC = 60.12±0.97days, G3% = 59.00±0.98days and G6% = 60.80±1.14days. The mortality rates were not affected by the hypercarbia, GC = 0.43 (43%), G3% = 0.27 (27%) and G6% = 0.37 (37%). Furthermore, the mass increment and the metabolic rate were the same among the early development of the turtles until 3 month after hatching. We conclude that hypercarbia (up to 6% of CO₂) does not cause any alteration on the eggs or post-hatching normal development. It is possible that the combination of hypercarbia and hypoxia change those results.

Key words: Hypercarbia, incubation, *Trachemys scripta*, CO₂.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Foto de *Trachemys* sp em uma baía do Jacarezário da Unesp – Rio Claro/SP.11
- Figura 2:** A: fêmea de *Trachemys scripta* cavando o ninho com as patas posteriores, para desovar; B: detalhe das patas posteriores fazendo o buraco no solo.12
- Figura 3:** Foto sistema de incubação dos ovos. Do lado esquerdo temos os cilindros com as misturas contendo 3 e 6% de gás carbônico, e do lado direito a câmara de incubação a 30°C.18
- Figura 4:** Esquema do sistema de incubação dos ovos de *Trachemys scripta*.19
- Figura 5:** Foto do momento da eclosão dos ovos. A: Logo que os filhotes rompem a casca dos ovos. B: Momento que o filhote consegue se desvencilhar da casca e sair andando.20
- Figura 6:** Esquema simplificado do sistema de respirometria automatizado, utilizado para coleta de dados de VO₂, dos filhotes recém eclodidos.22
- Figura 7:** Tempo de incubação dos ovos de *Trachemys scripta*, expresso em dias. Em branco observamos o GC, com uma média de 60,12±0,97 dias, em cinza o G3% com um valor médio de 59,00±0,98 dias e o grupo com a coloração preta é o G6%, com uma média de 60,80±1,14 dias. A comparação foi realizada com uma ANOVA One Way, e não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores. Dados expressos como média ± erro padrão.24
- Figura 8:** Mortalidade total de cada grupo. Em branco observamos o GC, com mortalidade de 0,43 (43%), em cinza o G3%, mortalidade de 0,27 (27%) e em preto é o G6%, com uma mortalidade de 0,37 (37%).25
- Figura 9:** Evolução da massa (g) dos ovos de *Trachemys scripta* ao longo da incubação (expressa em porcentagem). Em A temos os três grupos experimentais, em preto temos os dados referentes ao GC, em cinza escuro temos os dados do G3%, e em cinza claro temos os dados do G6%. O gráfico B é referente ao GC, C ao G3% e D ao G6. Os valores foram comparados através do teste ANOVA Two Way para medidas repetidas e o Método Holm-Sidak, e as letras iguais mostram as medidas que foram estatisticamente consideradas semelhantes, e as letras diferentes mostram as medidas significativamente diferentes. Dados expressos como média ± erro padrão.26

Figura 10: Massa (g) dos filhotes recém eclodidos. Em branco observam-se os dados do GC, em cinza os dados do G3%, e em preto os dados do G6%. Os valores das médias de massa dos filhotes recém eclodidos foi GC=9,89±0,81 g; G3%=10,11±0,60 g e G6%=10,58±0,36 g, estes valores foram testados com ANOVA One Way, e não foram observadas diferenças significativas entre eles. Dados expressos como média ± erro padrão.27

Figura 11: Consumo de O₂, expresso em mlO₂/Kg/hora, dos filhotes recém eclodidos de cada grupo. Em branco observamos os dados do GC, que obteve uma média de 71,60±6,07 mlO₂/Kg/hora; em cinza o G3%, que obteve uma média de 80,92±8,01 mlO₂/Kg/hora e em preto o G6% com uma média de 77,10±6,43 mlO₂/Kg/hora. Entretanto com a utilização do teste ANOVA One Way, não foram observadas diferenças significativas entre os valores. Dados expressos como média ± erro padrão.28

Figura 12: Evolução da massa (g) dos filhotes, da eclosão aos meses seguintes. O gráfico A representa em preto o GC, em cinza claro o G3%, e em cinza escuro o G6%, as marcações preenchidas mostram que são estatisticamente diferentes do peso inicial. Os gráficos B, C e D, são referentes ao GC, G3% e G6%, respectivamente, e as letras iguais mostram as medidas que foram estatisticamente consideradas semelhantes, e as letras diferentes mostram as medidas significativamente diferentes (ANOVA Two Way para medidas repetidas e o Método Holm-Sidak). Dados expressos como média ± erro padrão.29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Trachemys scripta* é uma tartaruga de água doce, conhecida popularmente por tigre-d'água (Figura 1), nativa nos seguintes países: Belize, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Estados Unidos e Venezuela (IUCN, 2010). Nos anos 70, fazendas norte-americanas começaram a comercializar estas tartarugas como animais de estimação e muitas acabaram abandonadas em diferentes lugares (FERRONATO et al, 2009). Por esta razão, atualmente, esta espécie de tartaruga é considerada invasora, em diversos países, como, França, Alemanha, Israel, África do Sul (IUCN, 2010) e Brasil (FERRONATO et al, 2009).

A base alimentar de *Trachemys scripta* é composta por gramíneas e plantas aquáticas, contudo, esta espécie pode se alimentar também de insetos (MOLL, 1990) e outros pequenos animais com regularidade; (*observação pessoal*).

Um estudo realizado com a subespécie *T. scripta scripta* mostrou que o período reprodutivo destes animais tem início na primavera e dura até o verão. Nos Estados Unidos este período corresponde aos meses entre abril e julho (ARESCO, 2004). Em um trabalho realizado na região sul do Brasil, com uma espécie do mesmo gênero, *T. dorbignyi*, foi demonstrado que a época reprodutiva também corresponde às estações da primavera e verão, ou seja, o período entre outubro e janeiro (BAGER, 2007).

Os animais encontrados no Jacarezário, da UNESP – Rio Claro/SP, são mantidos em baias cercadas não cobertas, que possuem uma parte com água e outra com terra e grama, e vegetação de maior porte. Estes recintos possuem sempre regiões com sol e sombra, e os animais ficam sujeitos às variações climáticas do meio. O período reprodutivo destes animais ocorre entre o final de setembro e o início do mês de dezembro (A. S. Abe, *Comunicação pessoal*).

Esta observação corrobora com a literatura, que indica que os padrões reprodutivos de tartarugas d'água estão intimamente relacionados com parâmetros ambientais, como por exemplo, o clima (GIBBONS, 1982).

As fêmeas deste grupo depositam seus ovos em ninhos cavados por elas mesmas no solo (Figura 2). Após a postura, estes ninhos são cobertos com o



Figura 1: Foto de *Trachemys* sp em uma baia do Jacarezário da Unesp – Rio Claro/SP.



Figura 2: A: fêmea de *Trachemys scripta* cavando o ninho com as patas posteriores, para desovar; B: detalhe das patas posteriores fazendo o buraco no solo.

mesmo substrato. Os ninhos possuem cerca de 15 cm de profundidade, os ovos ocupam aproximadamente 10 cm na parte inferior e os 5 cm superiores do buraco são cobertos com o substrato (A. S. Abe, *comunicação pessoal*). A média de ovos por fêmea de *T. scripta* ainda não é um consenso entre os pesquisadores. Contudo sabe-se que o tamanho da postura está intimamente relacionado com o tamanho da fêmea, de forma que quanto maior for a fêmea, mais ovos por ninho ela deposita (CONGDON e GIBBONS, 1983; ARESCO, 2004), fêmeas menores colocam, em média, 6 a 7 ovos por ninho (CONGDON e GIBBONS, 1983; ARESCO, 2004) e as maiores constroem ninhos de 9 a 10 ovos (CONGDON e GIBBONS, 1983; JACKSON, 1988).

Os répteis foram o primeiro grupo capaz de se reproduzir exclusivamente em meio terrestre (OLIVEIRA, 1993). O desenvolvimento do ovo amniótico foi um importante passo para isto. Tal ovo possui os seguintes anexos embrionários: o âmnion, o córion e o alantóide, que juntos proporcionaram condições para que o desenvolvimento embrionário ocorra em meio terrestre (GOIN et al, 1978). A vascularização do embrião ocorre inicialmente na membrana do vitelo e posteriormente a membrana cório-alantóica se torna mais vascularizada (POUGH et al, 1993).

A casca dos ovos dos répteis possui poros, assim como os ovos das aves, entretanto não há na literatura, informações sobre o diâmetro destes poros. Há informações sobre ovos de aves. Ovos de galinha, por exemplo, têm poros com diâmetro de 17 a 20 μm (WANGENSTEEN e RAHN, 1970/71). O ar atmosférico atravessa a casca do ovo através destes poros, entrando em contato com os capilares da membrana cório-alantóica, pelos quais ocorrem as trocas gasosas (POUGH et al, 1993). As trocas ocorrem por difusão. O consumo de O_2 e produção de CO_2 pelos tecidos do embrião em desenvolvimento formam o gradiente necessário para esta difusão de O_2 do ar atmosférico para o sangue e uma liberação de CO_2 do sangue para o meio externo (ACKERMAN, 1991).

No momento da desova há sobreposição de ovos. Este contato reduz a área funcional para trocas gasosas dos ovos. Além disto, certas características do solo que cobre o ninho, aliada a profundidade do mesmo, também podem reduzir a difusão de gases entre interior do ninho e meio externo.

Segundo Ackerman (1977), ao longo do desenvolvimento, tais ovos podem ficar sujeitos a pressões progressivamente mais baixas de O_2 (hipóxia) e mais altas de CO_2 (hipercarbia). Diferentes situações podem ser responsáveis por maior ou menor disponibilidade de gases nos ninhos. Problemas na difusão gasosa podem, por exemplo, ser agravados por chuvas (CHABRECK, 1975) e/ou alagamentos (PLUMMER, 1976). A água pode reduzir drasticamente a difusão de O_2 para o ninho, seja pelo preenchimento dos poros e “espaços” do solo por massas de água, ou pela redução destes espaços aéreos por compactação do solo. Isto também pode ocorrer também no caso das marés altas (SEYMOUR et al, 1986; KAM, 1988), que podem cobrir os ninhos de tartarugas marinhas. Mesmo em condições de normóxia no ninho, os embriões podem enfrentar uma situação de hipóxia causada pela limitação da capacidade de difusão de O_2 pela casca e pelas membranas (KAM, 1993) e pela redução da PO_2 na câmara de gás (TAZAWA, 1980).

Smith e colaboradores (2006) mantiveram ovos de galinha em um ambiente sem ventilação durante os primeiros 10 dias de incubação. Isto causou elevação da PCO_2 , alcançando um nível de 1 a 1,5%. Neste experimento foi observado que a hipercarbia acarreta aumento da PCO_2 e da vascularização da membrana cório-alantóica, aumento de peso na fase embrionária, do 10^o ao 17^o dia de incubação, e diminuição do tempo de incubação.

Em *T. scripta* foi observado que uma maior a concentração de gás carbônico durante a incubação acarreta maior tempo de incubação e maior quantidade de vitelo residual (em gramas) no nascimento (ETCHBERGER et al, 1992). Na mesma espécie também foi observada redução no número de eclosões relacionado com o aumento da concentração de CO_2 durante a incubação (ETCHBERGER et al, 2002). Contudo, nestes experimentos foram utilizadas pressões parciais de CO_2 muito além das possíveis pressões reais, chegando a 15%, por exemplo. Portanto, apesar dos resultados obtidos nestes estudos serem interessantes, sua relevância ecológica real passa a ser discutível.

As evidências de que há redução dos níveis de O_2 e aumento nos níveis de CO_2 nos ninhos são claras. Tem sido demonstrado que estas variações, hipóxia e hipercarbia, causam alterações importantes no desenvolvimento embrionário. Acreditamos que a incubação dos ovos em condições de hipercarbia pode gerar alterações durante o período embrionário que se refletirão no tempo e capacidade

de desenvolvimento dos indivíduos. Acreditamos que é importante realizar a análise dos efeitos da hipóxia e da hiper carbia de forma separada para não ocorrer sobreposição dos resultados, desta maneira, neste trabalho serão estudados os efeitos de elevadas concentrações de gás carbônico, assim os resultados encontrados serão devido a hiper carbia, para estudar os efeitos caudados pela hipóxia será necessária a realização de outros estudos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- Determinar se concentrações elevadas de CO₂ (3% e 6%) causam impacto no desenvolvimento de ovos de *Trachemys scripta*;
- Determinar se tais alterações têm reflexo no desenvolvimento inicial dos animais recém eclodidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Indivíduos de *Trachemys scripta* foram mantidos em terrários ao ar livre, no Jacarezário, na UNESP – Rio Claro/SP. Nos terrários os animais tiveram livre acesso à água e foram alimentados diariamente com vegetais picados como, por exemplo, mamão, banana, manga, acelga, alface, entre outros, sempre em quantidades suficientes para todos os animais de cada recinto. Durante a época de desova foi realizado o acompanhamento diário das fêmeas e a coleta dos ovos logo após postura.

Foram utilizados 45 ovos, provenientes de 6 ninhadas: A (n = 11 ovos), B (n = 9), D (n = 8), E (n = 5), H (n = 5) e I (n = 7), divididos entre 3 grupos: controle (GC), hipercapnia a 3% CO₂ (G3) e hipercapnia a 6% CO₂ (G6), incubados artificialmente em substrato de vermiculita úmida e mantidos em uma câmara climática à 30°C (Figuras 3 e 4). Inicialmente cada grupo continha: GC n = 14 ovos, G3% n = 15 e G6% n = 16. As ninhadas foram selecionadas conforme a proximidade da data de desova, para que os ovos estivessem sempre com um tempo de desenvolvimento próximo. Para formar os grupos experimentais os ovos de cada ninhada foram divididos de maneira aleatória em cada grupo, sempre procurando fazer com que todos os grupos ficassem com um número próximo de ovos de cada ninhada.

Logo após a coleta os ovos foram numerados, medidos e pesados em balança semi-analítica ($\pm 0,01g$) (Owa Labor). Os grupos foram separados em caixas fechadas, que possuíam um sistema de entrada e saída ar, através do qual era bombeada uma mistura de gases com 3 ou 6% de CO₂, 21% de O₂ e o restante de N₂. A mistura de gases foi fornecida por São Carlos Gases, e antes de ser utilizada foi testada em um analisador de O₂ e em um analisador de CO₂ para garantir sua composição. No grupo controle houve bombeamento de ar atmosférico. O ar bombeado foi umidificado à saturação antes de entrar nas caixas de incubação.

Os ovos foram pesados e vistoriados semanalmente para controle da umidade da vermiculita e verificação da viabilidade dos mesmos. Um ovo foi considerado como morto quando começava a murchar e sua massa diminuía significativamente de uma semana para a outra.

Foram observados parâmetros acerca da viabilidade dos ovos, como mortalidade e porcentagem de eclosão. O desenvolvimento foi analisado aferindo o

tempo total de incubação, a porcentagem de sucesso, massa dos ovos ao longo da incubação. Após a eclosão (Figura 5) foi aferida a massa dos filhotes ao longo primeiros meses de vida e a taxa metabólica de repouso, logo após a eclosão.



Figura 3: Foto sistema de incubação dos ovos. Do lado esquerdo temos os cilindros com as misturas contendo 3 e 6% de gás carbônico, e do lado direito a câmara de incubação a 30°C.

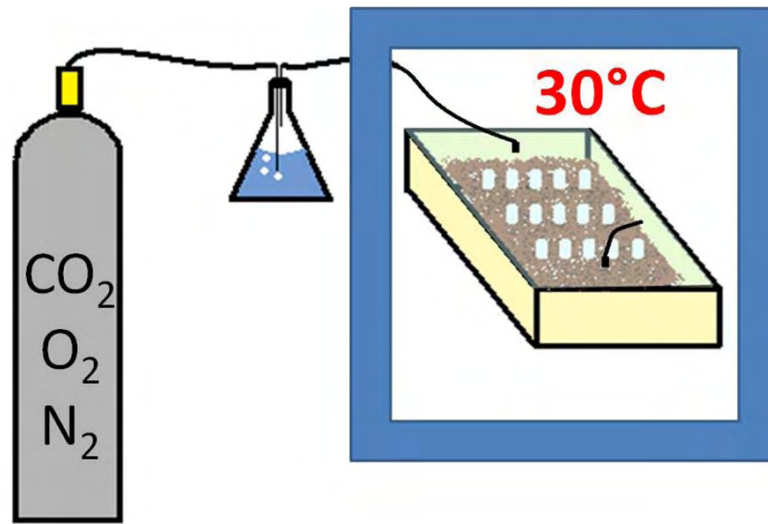


Figura 4: Esquema do sistema de incubação dos ovos de *Trachemys scripta*.



Figura 5: Foto do momento da eclosão dos ovos. A: Logo que os filhotes rompem a casca dos ovos. B: Momento que o filhote consegue se desvencilhar da casca e sair andando.

Para a realização das análises, o tempo de incubação foi transformado em porcentagem de desenvolvimento, com o intuito de igualar a fase de desenvolvimento de cada ovo, já que cada um possui um total de tempo de incubação diferente dos outros. Para isso consideramos o dia da desova como 0% de incubação e a data de eclosão de cada ovo foi considerada como 100% de incubação, e desta maneira transformamos o tempo de incubação em porcentagem. Posteriormente organizamos as medidas de massa em 10 classes de acordo com o a porcentagem de desenvolvimento: 0-10%; 11-20%; 21-30%; 31-40%; 41-50%; 51-60%; 61-70%; 71-80%; 81-90% e 91 a 99%, que foram representadas nos gráficos em seus pontos médios: 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85% e 95%, respectivamente.

A taxa metabólica dos filhotes recém nascidos foi aferida nos primeiros 10 dias após a eclosão dos ovos, período durante o qual os filhotes não foram alimentados. As medidas foram realizadas sob uma temperatura constante de 30°C, e com utilização de gás atmosférico, com a utilização de um sistema de respirometria automatizado, intermitentemente fechado (DATACAN V, Sable Systems), conforme mostrado no esquema abaixo (Figura 6).

Após a realização das medidas de taxa metabólica dos filhotes, estes foram marcados e mantidos em uma caixa plástica com acesso à água. Sobre a caixa foi utilizada uma lâmpada de 40W ligada em ciclo 12-12 horas para manter o local aquecido, respeitando o ciclo dia/noite dos animais. Nestas condições os filhotes foram alimentados *ad libitum* com ração própria diariamente.

As comparações dos dados referentes ao tempo de incubação dos ovos, massa dos filhotes na eclosão, metabolismo dos neonatos e ao aumento de massa dos filhotes, foram realizadas com ANOVA One Way. A comparação entre o ganho de peso dos ovos entre os grupos foi feita com ANOVA One Way e o teste Kruskal-Wallis. Os dados da evolução da massa dos ovos e dos filhotes foram comparados com ANOVA Two Way para medidas repetidas e o teste Holm-Sidak. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão.

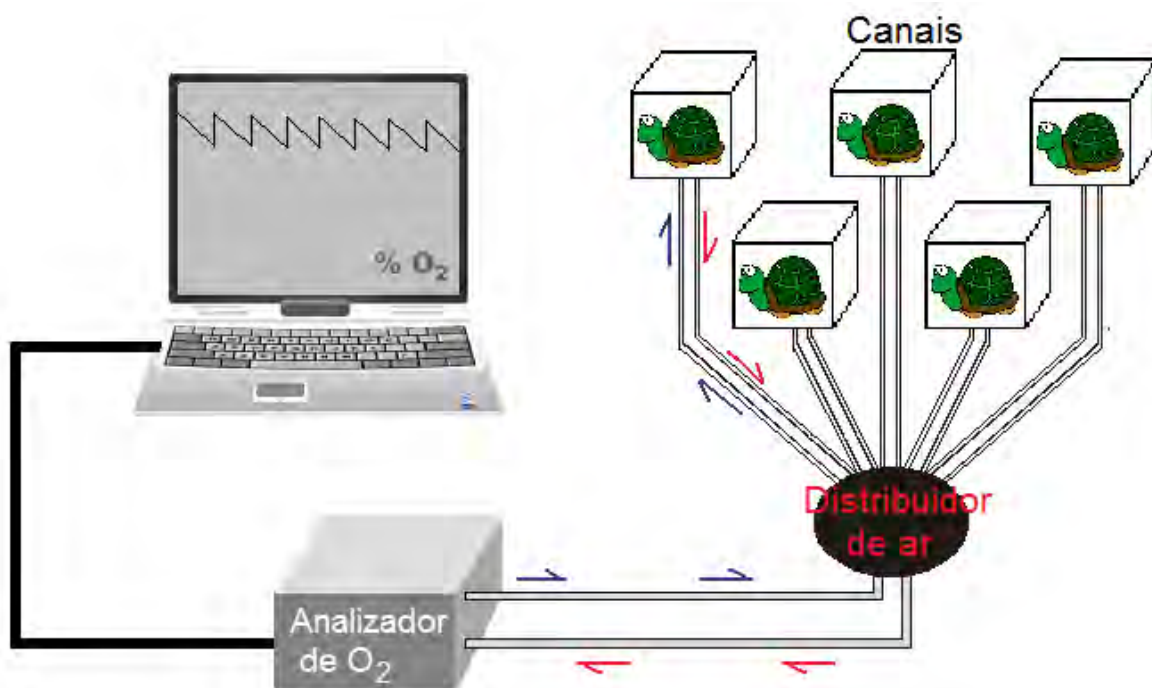


Figura 6: Esquema simplificado do sistema de respirometria automatizado, utilizado para coleta de dados de VO_2 , dos filhotes recém eclodidos.

4. RESULTADOS

O tempo de incubação dos ovos variou entre 55 e 63 dias. A média para o grupo controle (GC) foi de $60,12 \pm 0,97$ dias. Os grupos incubados com 3% CO₂ (G3%) e 6% CO₂ (G6%) não apresentaram alteração em relação ao GC. Suas médias foram, respectivamente, $59,00 \pm 0,98$ dias e $60,80 \pm 1,14$ dias (figura 7).

Dos 45 ovos selecionados, apenas 29 eclodiram. A mortalidade total do GC foi de 43%, nos grupos submetidos a tratamentos de 3% e 6% a mortalidade total foi inferior, 27% e 37%, respectivamente (figura 8).

A média do peso dos ovos ao longo do tempo de incubação no GC apresentou aumentos gradativos durante o desenvolvimento, com aumento pouco mais pronunciado entre 85% e 95% de desenvolvimento. Entretanto este aumento no final da incubação não foi observado nos G3% e G6%. Nesses dois grupos a média do peso dos ovos permaneceu estável no fim da incubação (figura 9).

O perfil de ganho de peso é similar entre os grupos. O aumento total de peso de cada grupo durante a incubação foi calculado e obtivemos que o grupo controle aumentou 4,76 g enquanto os grupos 3% e 6% aumentaram 4,28 g e 3,45 g, respectivamente. Não foram encontradas diferenças entre o ganho de peso dos ovos entre os grupos (ANOVA One Way e Kruskal-Wallis).

A massa dos filhotes foi medida logo após a eclosão. A média das massas do GC foi $9,89 \pm 0,81$ g; e não foi diferente nos outros dois grupos, que tiveram as seguintes médias: G3% $10,11 \pm 0,60$ g e G6% $10,58 \pm 0,36$ g (figura 10). A massa das cascas não foi considerada pelo variado grau de dessecação no momento da medida.

O consumo de O₂ dos filhotes recém eclodidos foi medido e obteve-se a seguinte média para o GC: $71,60 \pm 6,07$ mlO₂·Kg⁻¹·h⁻¹; este valor não foi diferente das médias dos grupos 3% e 6%, que foram, respectivamente, $80,92 \pm 8,01$ mlO₂·Kg⁻¹·h⁻¹ e $77,10 \pm 6,43$ mlO₂·Kg⁻¹·h⁻¹ (figura 11).

A massa dos filhotes foi medida nos três meses seguintes ao nascimento e observou-se um aumento gradativo ao longo dos meses de forma semelhante em todos os grupos (figura 12).

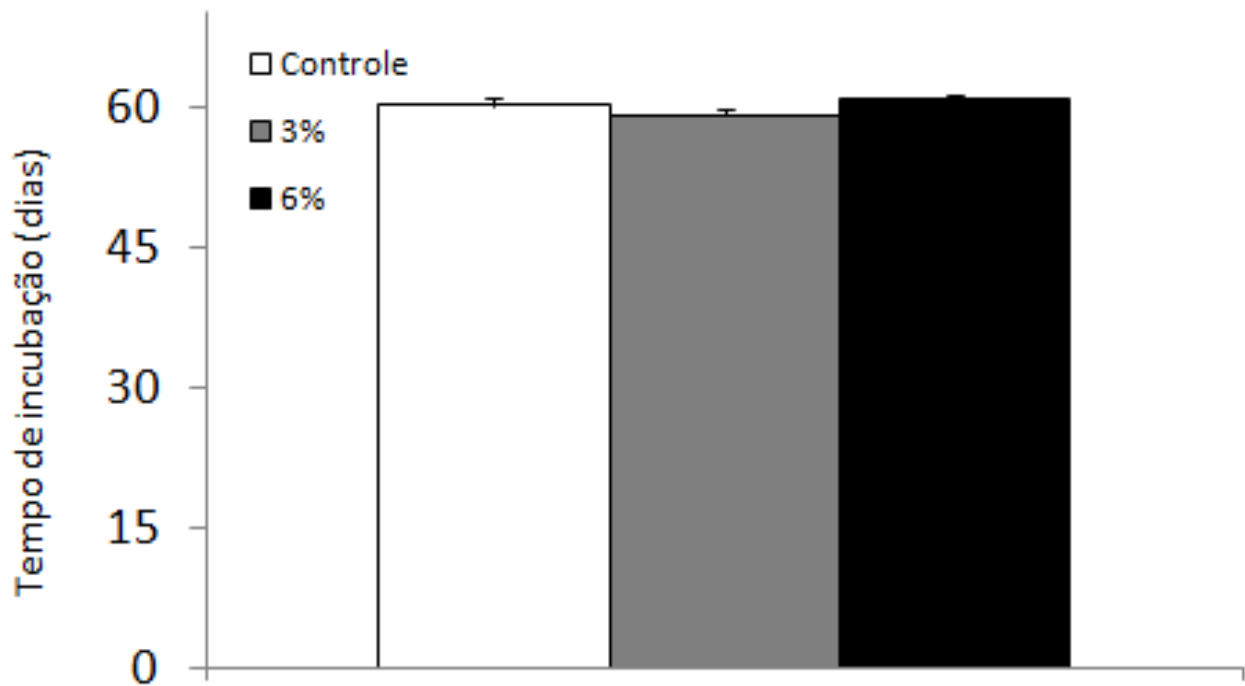


Figura 7: Tempo de incubação dos ovos de *Trachemys scripta*, expresso em dias. Em branco observamos o GC, com uma média de $60,12 \pm 0,97$ dias, em cinza o G3% com um valor médio de $59,00 \pm 0,98$ dias e o grupo com a coloração preta é o G6%, com uma média de $60,80 \pm 1,14$ dias. A comparação foi realizada com uma ANOVA One Way, e não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores. Dados expressos como média \pm erro padrão.

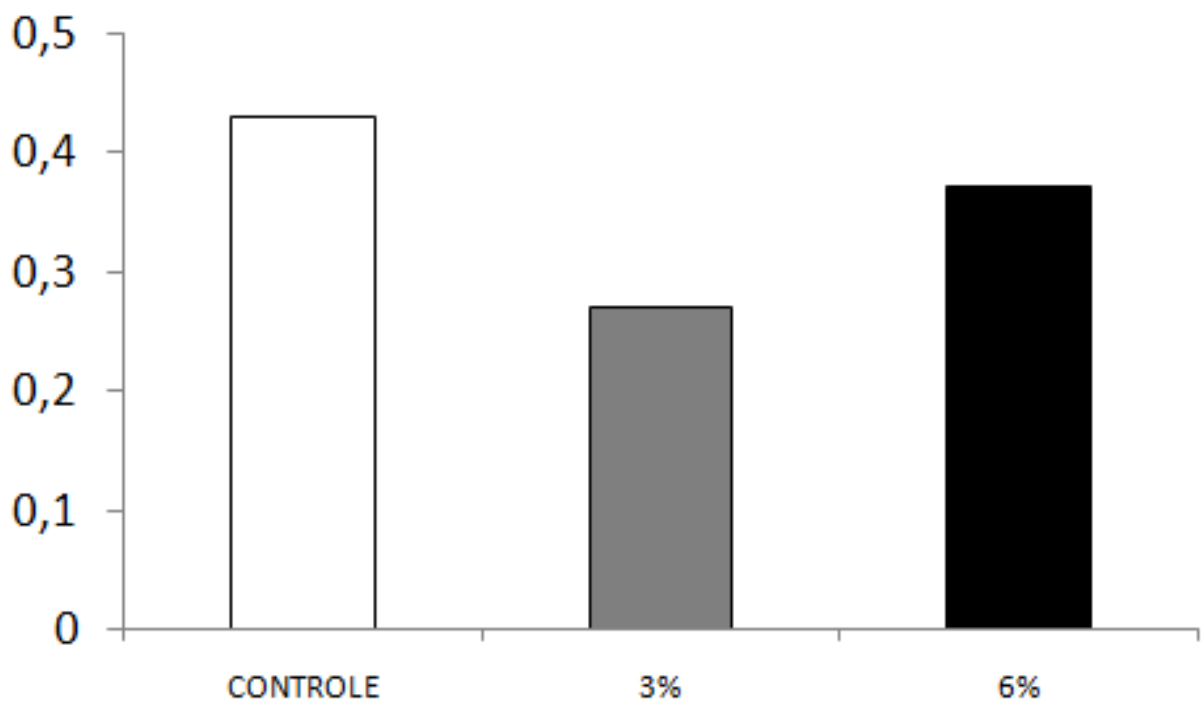


Figura 8: Mortalidade total de cada grupo. Em branco observamos o GC, com mortalidade de 0,43 (43%), em cinza o G3%, mortalidade de 0,27 (27%) e em preto é o G6%, com uma mortalidade de 0,37 (37%).

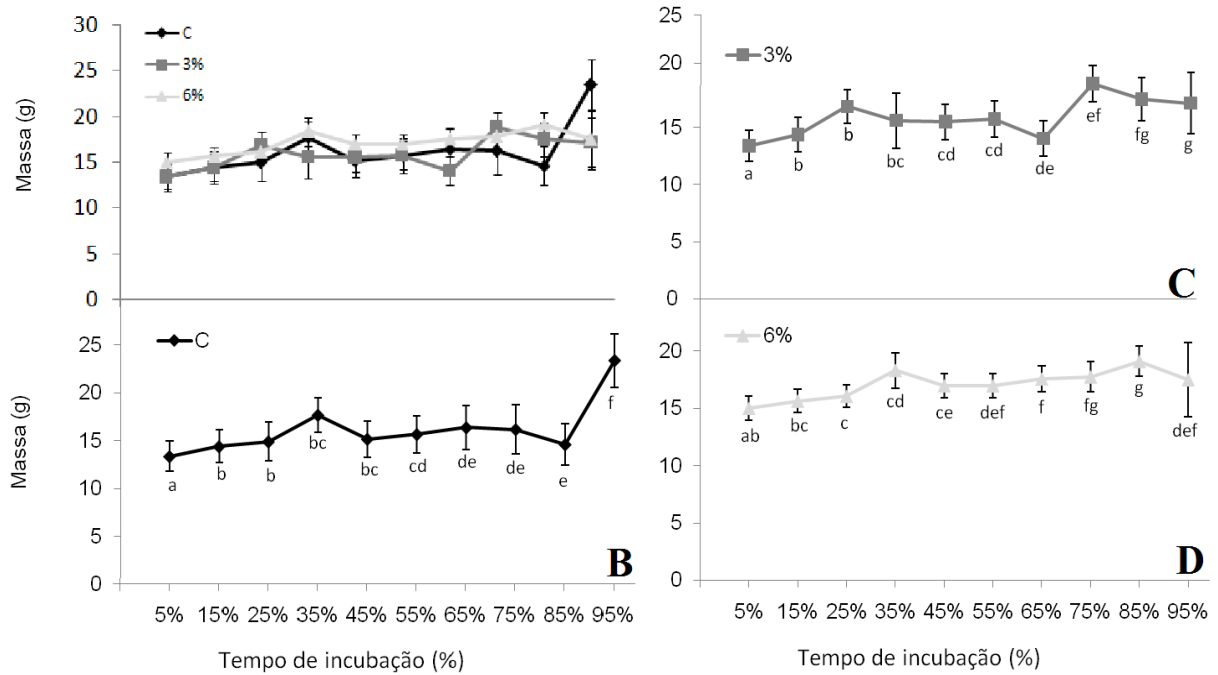


Figura 9: Evolução da massa (g) dos ovos de *Trachemys scripta* ao longo da incubação (expressa em porcentagem). Em A temos os três grupos experimentais, em preto temos os dados referentes ao GC, em cinza escuro temos os dados do G3%, e em cinza claro temos os dados do G6%. O gráfico B é referente ao GC, C ao G3% e D ao G6. Os valores foram comparados através do teste ANOVA Two Way para medidas repetidas e o Método Holm-Sidak, e as letras iguais mostram as medidas que foram estatisticamente consideradas semelhantes, e as letras diferentes mostram as medidas significativamente diferentes. Dados expressos como média \pm erro padrão.

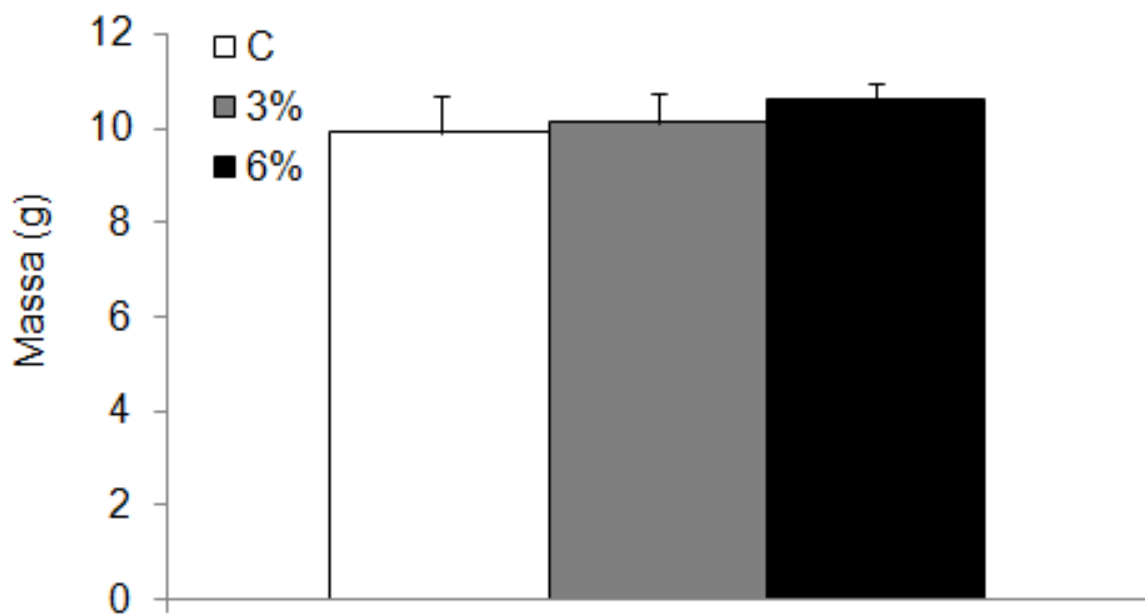


Figura 10: Massa (g) dos filhotes recém eclodidos. Em branco observam-se os dados do GC, em cinza os dados do G3%, e em preto os dados do G6%. Os valores das médias de massa dos filhotes recém eclodidos foi GC=9,89±0,81 g; G3%=10,11±0,60 g e G6%=10,58±0,36 g, estes valores foram testados com ANOVA One Way, e não foram observadas diferenças significativas entre eles. Dados expressos como média ± erro padrão.

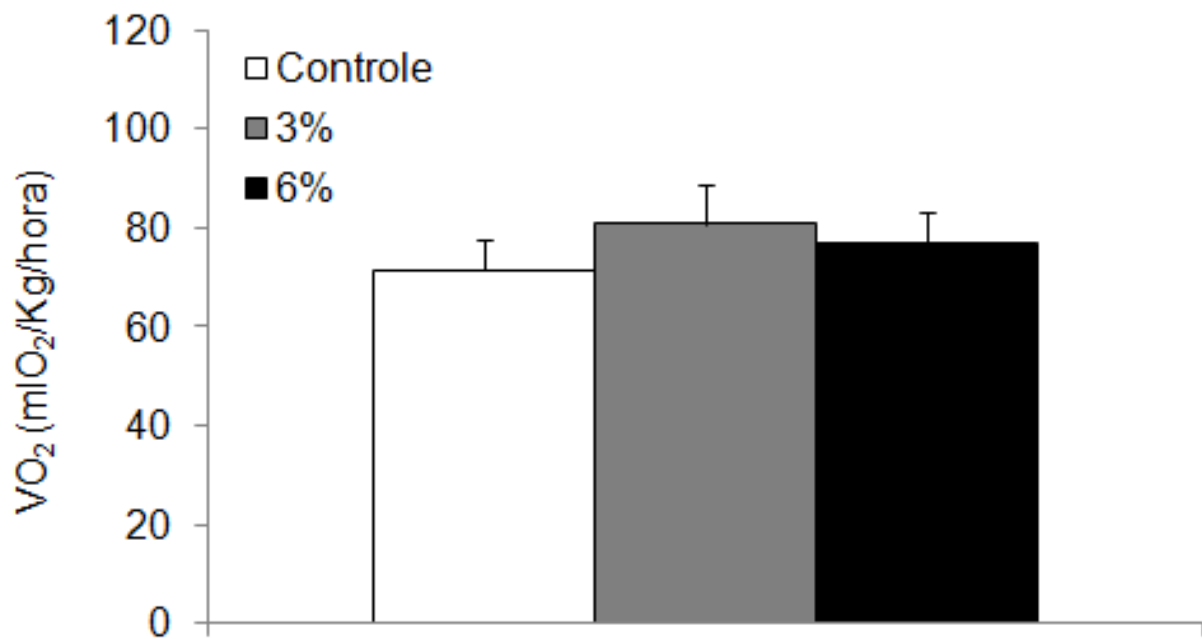


Figura 11: Consumo de O₂, expresso em mlO₂/Kg/hora, dos filhotes recém eclodidos de cada grupo. Em branco observamos os dados do GC, que obteve uma média de 71,60±6,07 mlO₂/Kg/hora; em cinza o G3%, que obteve uma média de 80,92±8,01 mlO₂/Kg/hora e em preto o G6% com uma média de 77,10±6,43 mlO₂/Kg/hora. Entretanto com a utilização do teste ANOVA One Way, não foram observadas diferenças significativas entre os valores. Dados expressos como média ± erro padrão.

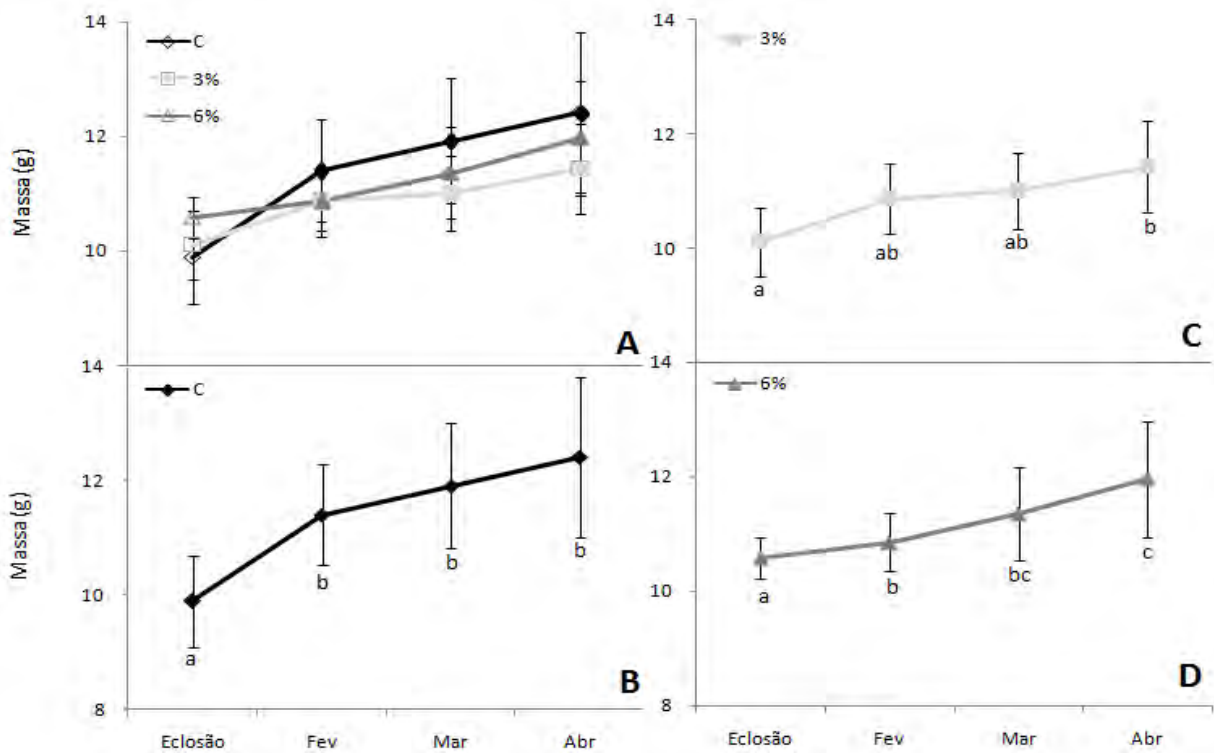


Figura 12: Evolução da massa (g) dos filhotes, da eclosão aos meses seguintes. O gráfico A representa em preto o GC, em cinza claro o G3%, e em cinza escuro o G6%, as marcações preenchidas mostram que são estatisticamente diferentes do peso inicial. Os gráficos B, C e D, são referentes ao GC, G3% e G6%, respectivamente, e as letras iguais mostram as medidas que foram estatisticamente consideradas semelhantes, e as letras diferentes mostram as medidas significativamente diferentes (ANOVA Two Way para medidas repetidas e o Método Holm-Sidak). Dados expressos como média \pm erro padrão.

Calculando o ganho de peso de cada grupo após o nascimento, obtemos que a partir da data da eclosão até o mês de abril o grupo controle teve uma média de aumento de 2,53 g, enquanto os grupos 3% e 6% aumentaram, em média, 1,32 g e 1,38 g, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Ovos de *Trachemys scripta*, assim como de outros répteis, por serem enterrados no solo ficam submetidos a condições que podem gerar um micro-ambiente hipercárbico e hipóxico no interior do ninho, ou seja, estes ovos ficam sujeitos a pressões mais elevadas de CO₂ (hipercarbia) e pressões reduzidas de O₂ (hipóxia) (ACKERMAN, 1977). Esta situação pode ocorrer devido a diversos fatores, como características de permeabilidade do solo, profundidade do ninho, metabolismo dos embriões, chuvas que molham o ninho (CHABRECK, 1975) e alagamentos (PLUMMER, 1976), conforme explicado na introdução deste trabalho.

Entretanto, até o presente momento, nenhum trabalho quantificou os valores das pressões de CO₂ e de O₂ que podem ser encontrados no interior deste tipo de ninho. Etchberger et al (2002) incubaram ovos de *T. scripta* em concentrações de 0%, 10% e 15% de CO₂ e ovos de *Graptemys pseudogeographic kohnii* com 0% e 10% de CO₂, e observaram um aumento na taxa de mortalidade em concentrações elevadas de CO₂, entretanto estes dados diferem do que foi encontrado neste trabalho, já que a mortalidade total do GC foi 0,43, ou seja, maior do que nos grupos tratamento, G3% 0,27 e G6% 0,37 (figura 8).

Congdon et al (1994) e Frazer et al (1991) explicam que tartarugas são animais que apresentam uma quantidade reduzida de ovos viáveis para eclosão, são organismos de vida adulta longa, porém com baixas taxas de sobrevivência quando jovens, o que pode explicar as altas taxas de mortalidade observadas neste trabalho. Os ovos do presente experimento não passaram por nenhum tipo de seleção antes de serem incorporados nos grupos CG, G3 e G6. Contudo, as ninhadas apenas foram igualmente separadas entre os grupos. Outros trabalhos encontrados na literatura não apresentam informações sobre a ocorrência de algum tipo de seleção prévia dos ovos.

Segundo Congdon et al (1999), animais sem cuidado parental podem desenvolver duas táticas para garantir o sucesso reprodutivo. Uma delas seria aumentar a fecundidade, a outra seria aumentar a probabilidade de sobrevivência da prole pelo aumento do tamanho corporal e da qualidade dos filhotes.

Esta segunda estratégia está em acordo com uma hipótese chamada “maior é melhor” (“bigger is better”). Segundo esta hipótese, quanto maior forem os filhotes,

maiores são suas chances de sobrevivência. Esta hipótese ainda é bastante discutida. Para Jazen et al (2000), filhotes maiores têm maior chance de sobrevivência. Apesar disto Congdon (1989) acredita que o tamanho corporal não é a única variável que afeta a taxa de sobrevivência. Para ele, como os filhotes sempre nascem com uma reserva de vitelo, ainda poderiam sobreviver independente do tamanho. Trabalho realizado por Congdon et al (1999) mostrou que a seleção por tamanho corporal em *Chelydra serpentina*, tartaruga mordedora, não ocorre de forma constante. Em um de seus experimentos ele não observou correlação entre o tamanho corpóreo e taxa de sobrevivência. Apesar disto, em outro experimento, foi observada uma correlação entre tamanho corporal e sobrevivência. Segundo os autores a topografia do local pode ter auxiliado os neonatos. Este aparente conflito enfatiza que o tamanho seria importante sempre que um fator seletivo estiver presente.

Devido às dificuldades de inferência de *fitness* (capacidade adaptativa de um animal ao meio) com dados anatomo-fisiológicos gerais dos quelônios, é de uso freqüente testar a habilidade do animal de voltar o corpo para a posição normal após ter sido virado de cabeça para baixo, chamada de “righting response”. Em condições naturais, filhotes de tartarugas estão expostas ao risco de virar de cabeça para baixo, principalmente durante o percurso do ninho até uma poça d’água próxima (BURGER, 1976). E como esta capacidade está relacionada, também, com o tamanho corporal do animal (BURGER, 1998) acredita-se que filhotes maiores tenham maiores chances de sobrevivência quando comparados com animais menores, confirmando a teoria “bigger is better”. Além disso, a taxa de crescimento dos filhotes afetou o “righting response”, portanto é possível confirmar a validade deste teste para inferências sobre o *fitness* (DELMAS et al, 2007).

Diversos estudos procuram identificar quais são os efeitos da hipercarbia em animais adultos. Segundo Klein et al (2002), de forma geral, com o aumento da concentração de CO₂ no ar inspirado observa-se um aumento progressivo do volume respiratório e uma alteração na freqüência respiratória, que ocorre de maneira variada em diferentes espécies. Apesar disto, os efeitos encontrados ainda não são um consenso. Para Andrade et al (2004) diferentes respostas à hipercarbia ocorrem devido a diferenças nos quimiorreceptores pulmonares, ou seja, cada animal processa a informação aferente de forma diferente no sistema nervoso

central. A exposição de cascavéis (*Crotalus durissus*) a diferentes concentrações de CO₂ (3%, 5% e 7%) gerou um aumento do volume respiratório e uma redução da frequência respiratória (ANDRADE et al, 2004).

Um trabalho realizado com tartarugas da espécie *Chrysemys picta dorsalis* mostrou que os efeitos do aumento da concentração de CO₂ para 3% foram imperceptíveis. Em concentrações mais elevadas, de 5% e 7%, os resultados foram longos períodos de apneia seguidos de um aumento da frequência e do volume respiratório, e ainda, em concentrações mais elevadas, 10%, 15% e 20% de CO₂, observou-se uma redução da duração da apneia e um aumento do volume respiratório (RANDALL et al, 1944).

Observando os resultados dos trabalhos citados, é possível inferir que se a hipercarbia tem efeitos sobre o animal adulto, de alguma maneira, o aumento da concentração de CO₂ no ambiente cause alterações no desenvolvimento embrionário, já que apesar dos embriões não apresentarem respiração pulmonar eles realizam trocas gasosas por difusão.

Em um trabalho realizado com *T. scripta*, que utilizou concentrações de 0%, 5%, 10% e 15% de CO₂ durante a incubação, observou-se que maiores concentrações de gás carbônico (10% e 15%) durante a incubação acarretam maior tempo de incubação, redução da massa de eclosão e do comprimento do casco e, aumento da mortalidade, quando comparados com 0% de CO₂ (ETCHBERGER et al, 1992), no entanto, na comparação entre 0% e 5% de CO₂ essas alterações ocorreram, mas de forma reduzida, o que não nos permite afirmar que foram devido as diferentes concentrações de gás carbônico.

Novamente, estes dados diferem do que foi obtido no presente estudo. Não encontramos diferenças entre os grupos de estudo em relação ao tempo de incubação ou massa dos filhotes após a eclosão. As pressões parciais de CO₂ utilizadas em cada estudo foram diferentes. Isso pode significar que alterações significativas só ocorrem com pressões bem mais elevadas de CO₂, da ordem de 10% e 15%. Resta saber se pressões desta magnitude poderiam ser desenvolvidas dentro dos ninhos.

Isso nos mostra que caso o micro-ambiente hipercárbico formado no interior dos ninhos atinja concentrações baixas de CO₂, de até 6%, o efeito nos filhotes não seria suficiente para afetar a capacidade de sobrevivência dos mesmos nos

parâmetros estudados. Entretanto, os resultados deste trabalho, até este ponto, nos levam a pensar que, apesar de não terem sido verificadas diferenças nos parâmetros analisados, de alguma forma esses filhotes devem estar realizando algum tipo de compensação para atenuar os efeitos da hipercarbica.

Foram realizados testes para medir o metabolismo basal dos filhotes recém eclodidos, para verificar se seria possível observar alguma alteração sistêmica, os animais poderiam aumentar os valores do metabolismo basal para aumentar as taxas de trocas gasosas através do sangue, e desta maneira, mitigar os efeitos da hipercarbica. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os valores de metabolismo basal dos filhotes entre os grupos.

Esses resultados não excluem a hipótese de que estes animais realizem algum tipo de compensação fisiológica para minimizar os efeitos da hipercarbica, seria importante também realizar uma análise do sangue dos filhotes, pois o que pode ocorrer é uma alteração na concentração de eritrócitos que aumentaria a capacidade de transporte de gases pelo sangue, e assim suprir a falta de O₂ no caso da hipóxia, e facilitar a difusão de CO₂ no caso da hipercapnia. Em um trabalho realizado com ovos de galinha, foi observado um aumento da vascularização da membrana cório-alantóica no ovos que foram submetidos a uma incubação sem ventilação durante os primeiros 10 dias (Smith et al, 2006).

O aumento da massa dos filhotes durante 3 meses após a eclosão foi acompanhado pra verificar se a hipercarbica poderia afetar o crescimento dos mesmos. Não foram observadas diferenças entre o padrão do aumento de massa dos filhotes. Isto mais uma vez indica que o desenvolvimento ocorreu normalmente e que qualquer compensação durante o período embrionário não refletiu no desenvolvimento inicial pós-eclosão.

A partir da realização deste trabalho podemos concluir que as concentrações de CO₂ utilizadas não foram suficientes para causar alterações no desenvolvimento embrionário e dos filhotes. Entretanto não é possível descartar a hipótese de que os ovos, em ambiente natural, sejam incubados em condições de hipercapnia, e que isto acarrete alterações. Além disso, ficou clara a necessidade da realização de um trabalho para avaliar os possíveis efeitos da incubação dos ovos em hipóxia e, posteriormente, a interação destes dois fatores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN, R. A. The respiratory gas exchange of sea turtle nests (Chelonia, Caretta). *Respiration Physiology*, 31:19-38. 1977.
- ACKERMAN, R. A.; LOTT, D. B. Thermal, hydric and respiratory climate of nests. In D. C. Deeming & M. W. J. Ferguson, *Egg Incubation: Its Effects in Embryonic Development in Birds and Reptiles*, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1991.
- ANDRADE, D. V.; TATTERSALL, G. J.; BRITO, S. P.; SONCINI, R.; BRANCO, L. G.; GLASS, M. L.; ABE, A. S.; e MILSOM, W. K. The ventilatory response to environmental hypercarbia in the South American rattlesnake, *Crotalus durissus*. *Journal of Comparative Physiology Part B*, 174:281–291. 2002.
- ARESCO, M. J. Reproductive Ecology of *Pseudemys floridana* and *Trachemys scripta* (Testudines: Emydidae) in Northwestern Florida. *Journal of Herpetology*, 38(2):249-256. 2004.
- BAGER, A.; FREITAS, T. R. O.; KRAUSE, L. Nesting Ecology of a population of *Trachemys dorbignyi* (Emydidae) in Southern Brazil. *Herpetologica*, 63(1):56-65. 2007.
- BURGER, J. Behavior of Hatchling Diamondback Terrapins (*Malaclemys terrapin*) in the Field. *Copeia*, 4: 742-748. 1976.
- BURGER, J. Effects of lead on behavior, growth and survival of hatchling slider turtles. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 55:495-502. 1998.
- CHABRECK, R. H. Moisture variation in nests of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Herpetologica*, 31:385-389. 1975.
- CONGDON, J. D.; DUNHAM, A. E.; VAN LOBEN SELS, R. C. Demographics of Common Snapping Turtles (*Chelydra serpentina*): Implications for

- Conservation and Management of Long-Lived Organisms. *American Zoologist*, 34(3):397:408. 1994.
- CONGDON, J. D.; NAGLE, R. D.; DUNHAM, A. E.; BECK, C. W.; KINNEY, O. M.; e YEOMANS, S. R. The relationship of body size to survivorship of hatchling snapping turtles (*Chelydra serpentina*): an evaluation of the “bigger is better” hypothesis. *Oecologia*, 121:224-235. 1999.
 - CONGDON, J. D. Proximate and evolutionary constrains on energy relations of reptiles. *Physiological Zoology*, 62:356-373. 1989.
 - CONGDON, J. D.; GIBBONS, J. W. Relationships of reproductive characteristics to body size in *Pseudemys scripta*. *Herpetologica*, 39:151-162. 1983.
 - ETCHBERGER, C. R.; EWERT, M. A.; PHILLIPS, J. B.; NELSON, C. E. Carbon dioxide influences environmental sex determination in two species of turtles. *Amphibia-Reptilia*, 23:169-175. 2002.
 - ETCHBERGER, C. R.; EWERT, M. A.; PHILLIPS, J. B.; NELSON, C. E.; PRANGE, H. D. Physiological Responses to Carbon Dioxide in Embryonic Red-Eared Slider Turtles, *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Zoology*, 264:1-10. 1992.
 - FERRONATO, B. O.; MARQUES, T. S.; GUARDIA, I.; LONGO, A. L. B.; PIÑA, C. I.; BERTOLUCI, J.; VERDADE, L. M. The turtle *Trachemys scripta elegans* (Testudines, Emydidae) as an invasive species in a polluted stream of southeastern Brazil. *Herpetological Bulletin*, 109:29-34. 2009.
 - FRAZER, N. B.; GIBBONS, J. W.; GREENE, J. L. Growth, Survivorship and Longevity of Painted Turtles *Chrysemys picta* in a Southwestern Michigan Marsh. *American Midland Naturalist*, 125(2):245-258. 1991.
 - GIBBONS, J. W. Reproductive patterns in fresh-water turtles. *Herpetologica*, 38:222-227. 1982.
 - GOIN, C. J.; GOIN, O. B.; e ZUG, G. R. *Introduction to herpetology*. 3 ed, San Francisco, W. H. Freeman and Company. p378. 1978.

- IUCN. Tortoise & Freshwater Turtle Specialist Group 1996. *Trachemys scripta*. Em: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 05 ago. 2010.
- JACKSON, D. R. Reproductive strategies of sympatric freshwater emydid turtles in northern peninsular Florida. *Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences*, 33:113-158. 1988.
- JAZEN, F. J.; TUCKER, J. K.; e PAUKSTIS, G. L. Experimental Analysis of an Early Life-History Stage: Selection on Size of Hatchling Turtles. *Ecology*, 81(8):2290-2304. 2000.
- KAM, Y. C. Critical oxygen tension of reptilian embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105A(4):777-783. 1993.
- KAM, Y. C. Environmental influences on the water exchange and growth of turtle eggs and embryos. M. S. thesis, Iowa State University, Ames. 1988
- KLEIN, W.; ANDRADE, D. V.; WANG, T.; e TAYLOR, E. W. Effects of temperature and hypercapnia on ventilation and breathing pattern in the lizard *Uromastix aegyptius microlepis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132:847–859. 2002.
- MOLL, D. Population Sizes and Foraging Ecology in a Tropical Freshwater Stream Turtle Community. *Journal of Herpetology*, 24(1):48-53. 1990.
- OLIVEIRA, P. *Metabolismo respiratório ao longo do desenvolvimento embrionário em teiú, Tupinambis teguixin (Reptilia: Teiidae)*. 1993. Tese de Mestrado – Instituto de Biocências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.
- PLUMMER, M. V. Some aspects of nesting success in the turtle, *Trionyx muticus*. *Herpetologica*, 32:353-359. 1976.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B; e MCFARLAND, W. N. *A vida dos vertebrados*. 1 ed, São Paulo, Atheneu. 1993.

- RANDALL, W. C.; STULLKEN, D. E.; e HIESTAND, W. A. Respiration of Reptiles as Influenced by the Composition of the Inspired Air. *Copeia*, 3:136-144. 1944
- SEYMOUR, R. S.; VLECK, D.; E VLECK, C. M. Gas exchange in the incubation mounds of megapode birds. *Journal of Comparative Physiology*, 156:772-782. 1986.
- SMITH, L.; BRUGGEMAN, V.; TONA, J. K.; DEBONNE, M.; ONAGBESAN, O.; ARCKENS, L.; BAERDEMAEKER, J.; E DECUYPERE, E. Embryonic developmental plasticity of the chick: Increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145A:166-175. 2006.
- TAZAWA, H. T. Oxygen and CO₂ exchange and acid-base regulation in the avian embryos. *American Zoologist*, 20:395-404. 1980.
- WANGENSTEEN, O. D.; WILSON, D.; e RAHN, H. Diffusion of gases across the shell of the hen's egg. *Respiration Physiology*, 11:16-30. 1970/71.

Orientador: _____
Augusto Shinya Abe

Co-orientador: _____
Cléo Alcântara Costa Leite

Orientada: _____
Juliana Della Nina Pistoni